



T.C

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**STAPHYLOCOCCUS AUREUS İZOLATLARINDA BİYOFİLM
OLUŞUMU İLE ANTİBİYOTİK DİRENCİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DR. BAHİSE ÇAĞLA TAŞKIN DALGIÇ

UZMANLIK TEZİ

TOKAT-2020



T.C

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

***STAPHYLOCOCCUS AUREUS* İZOLATLARINDA BİYOFİLM
OLUŞUMU İLE ANTİBİYOTİK DİRENCİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN
ARAŞTIRILMASI**

DR. BAHİSE ÇAĞLA TAŞKIN DALGIÇ

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANLARI

PROF. DR. YUNUS BULUT

PROF.DR. GÜLGÜN YENİŞEHİRLİ

TOKAT-2020

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimde bilgi birikimleri ve tecrübeleriyle mesleki gelişimime katkıda bulunan, tezimin hazırlanmasında büyük katkıları olan değerli hocam Prof. Dr. Yunus BULUT'a, gerek Tıbbi Mikrobiyoloji eğitimim konusunda gerekse hayatımla ilgili konularda her türlü desteği sağlayan, bilgi birikimi ve deneyimleriyle önüme ışık tutan, çalışkan ve güçlü kişiliğini her daim örnek alacağım çok değerli hocam Prof. Dr. Gülgün YENİŞEHİRLİ'ye,

Kendisiyle kısa süre çalışma fırsatı bulduğum Sayın hocam Prof. Dr. Meryem ÇETİN'e, uzmanlık eğitimim boyunca desteğini yanımda hissettiğim değerli hocam Doç. Dr. Umut Safiye ŞAY COŞKUN'a

Tez sürecimde Moleküler Mikrobiyoloji konusunda bilgi ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Barış Otlu'ya

Tezimin istatistik analizine katkıda bulunan Sayın Doç. Dr. Aydan YENİŞEHİRLİ hocama,

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, güler yüzleri ve tecrübeleriyle bana güzel bir çalışma ortamı sağlayan Mikrobiyoloji Laboratuvarı çalışanlarına,

Tıp Fakültesini seçmemde etkileri büyük olan, tercih ettiğim her yolda karşılıksız sevgi ve desteklerini her daim hissettiğim canım babama, anneme ve kardeşime,

Uzmanlık eğitimimin hem zorlu hem keyifli zamanlarının en kuvvetli destekçisi, sevgisiyle her zorluğu aşabileceğimi hissettiğim değerli eşim Sertaç Dalgıç'a

Yoğun çalışma sürecimde en büyük fedakarlığı yapan, hayatımın neşesi, güzel kızım Defne' me sonsuz teşekkür ederim.

Dr.Bahise Çağla TAŞKIN DALGIÇ

ÖZET

Çalışmamızda *Staphylococcus aureus* izolatlarında biyofilm oluşumu ile antibiyotik direnci arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya 50 metisilin dirençli *S.aureus* (MRSA) ve 50 metisilin duyarlı *S.aureus* (MSSA) izolatı dahil edildi. İzolatların vankomisin ve teikoplanin için MİK değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle, diğer antimikrobiyaller için duyarlılık testleri ise disk difüzyon testi (DDT) yöntemiyle belirlendi. hVISA taramasında pozitif bulunan izolatlar populasyon profili analizi-eğri altında kalan alan (PAP-AUC) yöntemi ile doğrulandı. İzolatların biyofilm oluşumu Kongo kırmızısı agar (CRA) besiyerinde fenotipik olarak değerlendirildi. Biyofilm oluşumu ile ilişkili *icaA*, *icaD*, *eno* ve *IS256* gen bölgeleri Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi ile araştırıldı.

S.aureus izolatlarının penisilin, tetrasiklin, siprofloksasin, levofloksasin, eritromisin, rifampisin, gentamisin, amikasin, klindamisin, iMLSB, seftarolin, trimetoprim-sulfametaksazole direnç oranları sırasıyla %87, %51, %44, %42, %38, %36, %35, %35, %32, %29, %20, %6 olarak saptandı. Kloramfenikol ve linezolid dirençli izolat bulunmadı. İzolatların vankomisin ve teikoplanin MİK değerleri, vankomisin 0,25-1 µg/ml ve teikoplanin 0,125-2 µg/ml arasında olup duyarlı olarak bulunurken, dirençli izolat bulunmadı. hVISA taraması sonucunda 11 MRSA ve 7 MSSA izolatı hVISA şüpheli olarak tespit edildi. PAP-AUC yöntemi sonucu 2 MRSA ve 2 MSSA izolatı (%4) hVISA olarak bulundu.

İzolatların %98 i CRA besiyerinde fenotipik olarak biyofilm üretti. (%93 pozitif + %5 borderline) İzolatların %2 sinde ise biyofilm üretimi gözlenmedi. MRSA ile MSSA izolatları arasında biyofilm üretimi açısından anlamlı fark gözlenmedi ($p>0.05$). İzolatların biyofilm ilişkili genlere sahip olma oranı *icaA* %99, *icaD* %100, *eno* %100 ve *IS256* %35 olarak bulundu. Biyofilm üreten izolatların antibiyotik direnç oranları penisilin %86,7, tetrasiklin %52, siprofloksasin %44,8, levofloksasin %42,8, eritromisin %38,7, rifampin 36,7, amikasin ve gentamisin %35,7, klindamisin %32,6 ve

SXT % 6,1 olarak bulundu. Biyofilm üretmeyen 2 izolat ise penisilin dışında diğer antimikrobiyallere duyarlı bulundu. IS256'ya sahip *S.aureus* izolatlarının penisilin, rifampisin, eritromisin, klindamisin, iMLSB, tetrasiklin, levofloksasin, siprofloksasin, gentamisin ve amikasin direnç oranları IS256 içermeyen gruba göre anlamlı ölçüde yüksek bulundu ($p<0.02-0.0001$).



ABSTRACT

In our study, we aimed to investigate the relationship between biofilm formation and antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* isolates. 50 methicillin-resistant *S.aureus* (MRSA) and 50 methicillin-susceptible *S.aureus* (MSSA) isolates were included in the study. MIC values of the isolates for vancomycin and teicoplanin were determined by broth microdilution method and susceptibility tests for other antimicrobials were determined by disk diffusion test (DDT) method. Isolates found positive in hVISA screening were confirmed by population profile analysis-area under the curve (PAP-AUC) method. Biofilm formation of the isolates was evaluated as phenotypic on Congo Red Agar (CRA). The *icaA*, *icaD*, *eno* and *IS256* gene regions associated with biofilm formation were investigated by Polymerase Chain Reaction (PCR) method.

Penicillin, tetracycline, ciprofloxacin, levofloxacin, erythromycin, rifampicin, gentamicin, amikacin, clindamycin, iMLSB, ceftaroline, trimethoprim-sulfamethaxazole resistance rates of *S.aureus* isolates were determined as 87%, 51%, 44%, 42%, 38%, 36%, 35%, 35%, 32%, 29%, 20%, 6% respectively. No isolates resistant to chloramphenicol and linezolid were found. While vancomycin and teicoplanin MIC values of the isolates were found to be sensitive between 0.25-1 µg / ml for vancomycin and 0.125-2 µg / ml for teicoplanin, no resistant isolate was found. As a result of hVISA screening, 11 MRSA and 7 MSSA isolates were detected as hVISA. As a result of the PAP-AUC method, 2 MRSA and 2 MSSA isolates (4%) were found as hVISA.

98% of the isolates phenotypically produced biofilms in the CRA medium. (93% positive + 5% borderline) Biofilm production was not observed in 2% of the isolates. There was no significant difference between MRSA and MSSA isolates in terms of biofilm production ($p > 0.05$). The ratio of isolates having biofilm related genes was found to be %99 *icaA*, %100 *icaD*, %100 *eno* and %35 for *IS256*. Antibiotic resistance rates of biofilm producing isolates was penicillin 86.7%, tetracycline 52%, ciprofloxacin 44.8%, levofloxacin 42.8%, erythromycin 38.7%, rifampin 36.7%, amikacin and gentamicin 35.7%, clindamycin 32% , and SXT 6.1%. Two isolates that did not produce biofilm were sensitive to antimicrobials other than

penicillin. The resistance rates of *S.aureus* isolates with *IS256* penicillin, rifampicin, erythromycin, clindamycin, iMLSB, tetracycline, levofloxacin, ciprofloxacin, gentamicin and amikacin resistance rates were found to be significantly higher than the group without *IS256* ($p < 0.02-0.0001$).



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT.....	iv
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR.....	ix
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Staphylococcus'ların Genel Özellikleri:	3
2.2. Staphylococcus Aureus'un Neden Olduğu Enfeksiyonlar	5
2.2.1. Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları.....	5
2.2.2. Kan Dolaşımı Enfeksiyonları	6
2.2.3. İnfektif Endokardit (İE)	6
2.2.4. Alt Solunum Yolu Enfeksiyonları	7
2.2.5. Kemik-Eklemler Enfeksiyonları.....	7
2.2.6. Diğer Enfeksiyonlar	7
2.3. <i>S.aureus</i> 'un Antibiyotik Direnci.....	8
2.3.1. Penisilin Direnci.....	8
2.3.2. Metisilin Direnci	9
2.3.3. Glikopeptid Direnci	11
2.3.4. Beşinci Kuşak Sefalosporin Direnci.....	14
2.3.5. Makrolid-Linkozamid-Streptogramin B (MLSB) Direnci	15
2.3.5.1. Makrolid Direnci.....	15
2.3.5.2 Streptogramin Direnci:.....	16
2.3.6. Oksazolidinon Direnci	17
2.3.7. Tetrasiklin Direnci	18
2.3.8. Glisilsiklin Direnci	18
2.3.9. Kinolon direnci	19
2.3.10. Rifampin direnci	20
2.3.11. Sülfonamid ve trimetoprim direnci.....	20

2.4. <i>Staphylococcus Aureus</i> 'un Virulans Faktörleri	21
2.4.1. Peptidoglikan, Teikoik Ve Lipoteikoik Asitler:	21
2.4.2. Yüzey Adezyon Proteinleri:	21
2.4.3. Enzimler:	22
2.4.3.1. Katalaz	22
2.4.3.2. Koagülaz	22
2.4.3.3. Fibrinolizin	23
2.4.3.4. Hiyalüronidaz	23
2.4.3.5. Lipaz, Fosfolipaz C, Nükleaz	23
2.4.3.6. Beta-laktamaz	23
2.5. Hemolizinler ve Lökositinler:	23
2.5.1. Alfa-hemolizin	23
2.5.2. Beta-hemolizin	24
2.5.3. Delta-hemolizin	24
2.5.4. Gama Hemolizin Ve Panton Valentine Lökositin (PVL)	24
2.6. Toksinler:	25
2.6.1. Eksfoliyatif Toksinler:	25
2.6.2. Enterotoksinler	25
2.6.3. Toksik Şok Sendromu Toksini (TSST-1)	26
2.7. Kapsül polisakkaritler ve biyofilm oluşumu	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. İzolatlarının Toplanması Ve Saklanması	30
3.2. Mikrobiyolojik Kültür Ve Tanımlama İşlemleri	30
3.2.1. İzolatların Canlandırılması	30
3.2.2. Bakteri Tanımlama Yöntemleri	30
3.2.2.1. Konvansiyonel Bakteri Tanımlama Yöntemleri	31
3.2.2.2. Otomatize Bakteri Tanımlama Yöntemleri	32
3.3. <i>S. Aureus</i> İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi	32
3.3.1. <i>S. Aureus</i> İzolatların Metisilin Direncinin Ve Glikopeptid Dışı Antibiyotikler İçin Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Kirby-Bauer Disk Difüzyon Testi Yöntemi İle Belirlenmesi	32
3.3.2. <i>S. Aureus</i> İzolatlarının Glikopeptid Duyarlılıklarının Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi İle Tespiti	33

3.4. <i>S.Aureus</i> İzolatlarında Teikoplanin Tarama Agar Yöntemi İle hVISA Taranması:	34
3.5. <i>S.Aureus</i> İzolatlarında Populasyon Profili Analizi-Eğri Altında Kalan Alan (Population Profile Analysis-Area Under The Curve; PAP-AUC) Yöntemi İle hVISA Varlığı Araştırılması	35
3.6. <i>S. Aureus</i> İzolatlarında Biyofilm Oluşumunun Araştırılması.....	35
3.6.1. Biyofilm Oluşumunun Kongo Kırmızısı Agar (CRA) Metodu İle Fenotipik Olarak İncelenmesi:	35
3.6.2 <i>S.Aureus</i> İzolatlarında Biyofilm Oluşumunun Moleküler Yöntemlerle İncelenmesi :	36
3.6.2.1 <i>S.aureus</i> İzolatlarından DNA elde edilmesi:	36
3.6.2.2 PZR ile <i>IS256</i> ve <i>eno</i> gen bölgelerinin araştırılması:.....	36
3.6.2.3 PZR ile <i>ica A</i> ve <i>icaD</i> gen bölgelerinin araştırılması:.....	38
3.6.2.4 Elde Edilen PZR Ürünlerinin Jel Elektroforezi İle Görüntülenmesi:.....	39
3.7 İstatistiksel Metod:	40
4.BULGULAR.....	40
4.1. Çalışmaya Dahil Edilen <i>S.Aureus</i> İzolatlarının Özellikleri:	40
4.2. İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları:	42
4.3. İzolatların hVISA tarama bulguları:	46
4.4. PAP-AUC Çalışması Bulguları:.....	47
4.5. Kongo Kırmızısı Agar (CRA) Metodu Bulguları:	48
4.6. CRA Metodu İle Biyofilm Üretme Durumu Belirlenen İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Profillerinin İncelenmesi:	50
4.7. İzolatların PZR bulguları:	51
4.7.1 <i>IS256</i> ve <i>eno</i> geni bulguları:	51
4.7.2. <i>İcaA</i> Geni Bulguları:.....	53
4.7.3. <i>İcaD</i> Geni Bulguları:.....	54
4.8. İzolatların Biyofilm Üretiminin Fenotipik Ve Genotipik Sonuçlarının Değerlendirilmesi:	55
4.9. <i>IS256</i> Geni Pozitif Ve Negatif <i>S.Aureus</i> İzolatlarının Antibiyotik Direnç Profillerinin Karşılaştırılması:	56
4.10. <i>IS256</i> Geni Pozitif Ve Negatif <i>S.Aureus</i> İzolatlarının Vankomisin Ve Teikoplanin MİK Ortalamalarının Karşılaştırılması:.....	58
5. TARTIŞMA.....	60
6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	69
7.KAYNAKLAR	71

KISALTMALAR

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

ATCC: American Type Culture Collection

BHIA6V: 6 mg/L Vankomisin içeren Beyin Kalp İnfüzyon Agar

BKİ: Beyin Kalp İnfüzyon

Ca: Kalsiyum

CA-MHB: Katyon Katkılı Mueller Hinton Broth

CDC: Hastalık Kontrol Merkezi

CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute

cMLSB: Konstitüsyonel Makrolid-Linkozamid-Streptogramin B

CNA: Kolistin-Nalidiksik Asit

CRA: Kongo Kırmızısı Agar

CRF: Coagulase-Reacting Factor

DDT: Disk Difüzyon Testlerine

DHPS: Dihidropteroat Sentazı

DNA: Deoksiribonükleik asit

DYDE: Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları

EARSS: Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi

EMB: Eosin Methylene Blue

ET: Eksfoliyatif Toksin

EUCAST: The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FDA: Gıda ve İlaç Dairesi

Feniletil Alkol: FEA

GISA: Glikopeptid-İntermediate *S. aureus*

H₂O₂: Hidrojen peroksit

hGISA: heterojen Glikopeptid İntermediate *S.aureus*

HK: Hastane Kaynaklı

HK-MRSA: Hastane Kaynaklı Metisilin dirençli *S.aureus*

HKP: Hastane Kaynaklı Pnömoni

IgG: İmmünglobulin G

IL-1: İnterlökin 1

IS256: İnsersiyon Sekansı 256

IU: İnternasyonal Ünite

IWG-SCC. Uluslararası Stafilokok Kaset Kromozom Elemanları Sınıflandırma Ç

İE: İnfektif Endokardit

iMLSB: İndüklenebilir-Makrolid-Linkozamid-Streptogramin B direnci

İYE: İdrar Yolu Enfeksiyonları

K: Potasyum

KKa: Koyun Kanlı Agar

KNS: Koagülaz Negatif Stafilokok

KOB: Koloni Oluşturan Birim

LA-MRSA: Çiftlik Hayvancılığı İlişkili MRSA

MET: Makro E-Test

mg/L: miligram/Litre

MHA5T: 5 mg/L Teikoplanin içeren Mueller Hinton Agar

MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon

MLSB: Makrolid-Linkozamid-Streptogramin B

mm: milimetre

MRKNS: Metisilin Dirençli Koagülaz Negatif Stafilokok

MRSA: Metisilin Dirençli *S.aureus*

MS: Metisilin Duyarlı

MSCRAMM: Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecule

MSSA: Metisilin Duyarlı *S.aureus*

Na: Sodyum

NAG: N-asetilglukozamin

NAMA: N-asetilmuramik asit

OM: Osteomiyelit

PAP-AUC: Profili Analizi-Eğri Altında Kalan Alan

PBP: Penisilin Bağlayan Protein

PBS: Phosphate Buffered Saline

PIA: Polisakkarit İntersellüler Adezin

PNAG: N-asetil-beta-1-6-glukozamin

PVL: Panton-Valantine Lökosidin

PYR: Prolidonil arilamidaz

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

rRNA: ribozomal RNA

SAE: *S.aureus* endokarditi

SCCmec: Stafilokok Kaset Kromozom mec

SDA: Sabouraud Dekstrozu Agar

SMX: Sülfametoksazole

SXT: Trimetoprim-Sulfametaksazol

TBE: Tris-Borate-EDTA

TK: Toplum Kaynaklı

TK-MRSA: Toplum Kaynaklı Metisilin dirençli *S.aureus*

TK-MRSA: Toplum Kökenli Metisilin Dirençli *S.aureus*

TK-MSSA: Toplum Kaynaklı Metisilin duyarlı *S.aureus*

tRNA: aminoasit-transfer RNA

TSB: Triptik Soy Buillon

TSST-1: Toksin Şok Sendromu Toksin 1

UAMDSS: Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi

VISA: Vankomisine azalmış duyarlı *S.aureus*

VİP: Ventilator İlişkili Pnömoni

VP: Voges-Proskauer

VRSA: Vankomisine dirençli *S. aureus*

VSSA: Vankomisine duyarlı *S.aureus*

µg/ml: mikrogram/mililitre

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1 Çalışmada kullanılan antibiyotikler, içeriği ve markası	33
Tablo 2 <i>IS256</i> ve <i>eno</i> genleri primer dizisi, bağlanma ısısı, ampikon büyüklüğü ve referans.....	37
Tablo 3 <i>IS256</i> ve <i>eno</i> genleri PZR protokolü için reaksiyon karışımı.....	37
Tablo 4 <i>IS256</i> ve <i>eno</i> genleri için PZR döngü koşulları	37
Tablo 5 <i>icaA</i> ve <i>icaD</i> genleri primer dizisi, bağlanma ısısı ve ampikon büyüklüğü	38
Tablo 6 <i>icaA</i> geni PZR protokolü için reaksiyon karışımı.....	38
Tablo 7 <i>icaD</i> geni PZR protokolü için reaksiyon karışımı	39
Tablo 8 <i>icaA</i> ve <i>icaD</i> genleri için PZR döngü koşulları	39
Tablo 9 Çalışmaya dahil edilen <i>S. aureus</i> izolatlarının yıllara göre dağılımı.....	41
Tablo 10 Örneklerin gönderildiği bölümler	41
Tablo 11 Bakterilerin izole edildiği örnek türü.....	42
Tablo 12 Çalışmaya dahil edilen <i>S. aureus</i> izolatların antibiyotik direnç profili	43
Tablo 13 CRA besiyerinde biyofilm üretimi bulguları	49
Tablo 14 Biyofilm üretmeyen izolatların antibiyotik duyarlılık profili	50
Tablo 15 Borderline biyofilm üreten izolatların antibiyotik duyarlılık profili	51
Tablo 16 Biyofilm üreten izolatların antibiyotik direnç profili	51
Tablo 17 <i>IS256</i> geni tespit edilen suşların dağılımı	52
Tablo 18 <i>IS256</i> geni tespit edilen izolatların izole edildikleri örnek türü.....	53
Tablo 19 <i>icaA</i> geni tespit edilen izolatlar.....	53
Tablo 20 <i>icaD</i> geni tespit edilen izolatlar	54
Tablo 21 CRA’da biyofilm üretmeyen izolatların biyofilm ilişkili genleri	55
Tablo 22 CRA ‘da biyofilm üreten izolatların biyofilm ilişkili genleri	56
Tablo 23 <i>IS256</i> geni pozitif ve negatif MRSA izolatlarının antibiyotik direnç profili	57
Tablo 24 <i>IS256</i> geni pozitif ve negatif izolatların antibiyotik direnç profili	58
Tablo 25 <i>IS256</i> geni pozitif ve negatif MRSA izolatlarının vankomisin ve teikoplanin MİK ortalaması	59
Tablo 26 <i>IS256</i> geni pozitif ve negatif <i>S.aureus</i> izolatlarının vankomisin ve teikoplanin MİK ortalaması	59

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1 MRSA izolatlarının vankomisin MİK dağılımı	44
Şekil 2 MRSA izolatlarının teikoplanin MİK dağılımı.....	45
Şekil 3 MSSA izolatlarının vankomisin MİK dağılımı.....	45
Şekil 4 MSSA izolatlarının teikoplanin MİK dağılımı	46
Şekil 5 Mu3 pozitif kontrol suşu, <i>S.aureus</i> ATCC 29213 negatif kontrol suşu, negatif ve pozitif izolatlara ait teikoplanin tarama agar görüntüsü.....	47
Şekil 6 En düşük PAP-AUC alanına sahip izolat (2 numara), en yüksek PAP-AUC alanına sahip izolat (1 numara) ve mu3 pozitif kontrol suşuna ait PAP-AUC grafiği	48
Şekil 7 CRA besiyerinde biyofilm üretimi pozitif, borderline ve negatif izolatların görüntüleri	49
Şekil 8 <i>IS256</i> ve <i>eno</i> geni için yapılan PZR' a ait jel görüntüsü.....	52
Şekil 9 <i>icaA</i> geni için yapılan PZR' a ait jel görüntüsü	54
Şekil 10 <i>icaD</i> geni için yapılan PZR'a ait jel görüntüsü.....	55

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Staphylococcus aureus, sağlıklı bireylerin %20-40'ının cilt ve mukozasında kolonize olan, uygun koşullarda önemli enfeksiyonlara neden olan gram pozitif bakteridir. Bakteri selülit, fronkül, karbonkül gibi deri enfeksiyonlarının yanı sıra pnömoni, kan dolaşımı enfeksiyonları, endokardit, osteomyelit gibi ciddi pek çok akut ve kronik enfeksiyona neden olmaktadır. *S.aureus* izolatlarının patojenitesinden, bakteri tarafından üretilen toksin ve enzimler, adherens ve biyofilm oluşumu gibi virulans faktörleri sorumludur (1).

Biyofilm oluşumu *S.aureus*'un en önemli virulans faktörlerinden biri olup, persistent ve kronik enfeksiyonlarla ilişkili olduğu bilinmektedir. Biyofilm, canlı veya cansız bir yüzeye tutunarak kendi ürettikleri organik bir ekzopolisakkarid matriks içine gömülü hâlde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluktur (2, 3). Stafilokokların biyofilm oluşumundaki ilk aşama, bakterinin uygun yüzeylere yapışmasını sağlayan polisakkarit intersellüler adezin (PIA) molekülü üretimidir. PIA, *icaADBC* operon ürünüdür ve bu tabaka ikinci aşamada hücreler arası iletişimi sağlar (4). *IcaA* ve *icaD* genlerinin *S. aureus* ve *S. epidermidis* suşlarının biyofilm oluşumunda önemli rolü bulunmaktadır (5). *IcaA* geni, biyofilm tabakasının ana maddesi olan N-asetil-beta-1-6-glukozamin (PNAG) oligomerlerinin sentezinde görevli N-asetilglukozamil transferaz enzimini kodlar (6, 7). *IcaD* geninin ise N-asetilglukozamil transferaz'ın maksimum ekspresyonunda rol oynamaktadır (6). Yapılan çalışmalarda, *icaA* geninin tek başına ekspresyonu, düşük N-asetilglukozamin transferaz aktivitesine neden olurken, *icaD* geni ile ko-ekspresyonunun enzim aktivitesinde önemli artış yaptığı gösterilmiştir (7, 8). Ayrıca insersiyon sekansı (IS) 256'nın, *ica* operonuna eklenerek gen kümesinin ekspresyonunu etkilediği ve biyofilm oluşumuyla ilişkili olduğu bulunmuştur (9). *IS256*'nın, *ica* gen kümesine insersiyon ve eksizyonu, *S. aureus*'un biyofilm fazlarını değişikliğe uğratmaktadır (10).

S.aureus'un konak matriks proteinlerine tutunmasını sağlayan adezyon proteinleri de bakterinin biofilm oluşumuna katkı sağlamaktadır. Alfa-enolaz, elastin bağlayıcı protein ve fibrinojen bağlayıcı protein gibi yüzey adezyon proteinlerini kodlayan genlerin (*eno*, *ebps*, *fib*) biyofilm oluşumu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (11).

Biyofilm tabakası konağın normal immün cevabını önler ve antibiyotiklerin penetrasyonunu bozar bu nedenle biyofilm oluşturan bakteri enfeksiyonlarının ortadan kaldırılması son derece zordur (12-14). Biyofilm içindeki bakterinin mikrobiyal ajanlara duyarlılığın azalması: (i) antimikrobiyal ajanların difüzyonunun fiziksel olarak bozulması; (ii) bakteriyel büyüme oranlarının azalması; ve (iii) antimikrobiyal ajanın aktivitesini bozabilecek mikroçevrenin lokal değişiklikleri gibi pek çok faktörden kaynaklanmaktadır (15). Ayrıca biyofilm içindeki bakterilerin antibiyotiklere dirençli hâle gelmesinde, biyofilmin antibiyotik direnç genlerinin bakteriler arasında aktarım kolaylığı sağlaması önemli rol oynamaktadır (16).

Yapılan çalışmalarda, metisilin dirençli *S.aureus* izolatlarında biyofilm pozitifliği metisilin duyarlı *S.aureus* izolatlarından anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (9, 17). Ayrıca *Staphylococcus* izolatlarının çoklu ilaç direnci ile *ica* locus varlığı ve biyofilm gelişimi arasında pozitif bir ilişki olduğu gösterilmiştir (9, 18). Hastane kökenli *S. epidermidis* izolatlarında *IS256* varlığı biyofilm oluşumu ve aminoglikozid direnci ile ilişkili bulunmuştur(19). Ülkemizde yapılan bir çalışmada, *icaA*, *icaD* ve *IS256* genleri hVISA ve MRSA izolatlarda, MSSA izolatlarına göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (20).

S.aureus un antibiyotik direnci biyofilm oluşumu gibi bir faktörle birleştiğinde enfeksiyonun antibiyotikle tedavisi güçleşmekte kronik ve persistant enfeksiyonlara zemin hazırlamaktadır. Antibiyotik tedavisinin yetersiz kalması, biyofilm oluşumu ile antibiyotik direnci arasındaki ilişkisinin araştırılması ve yeni tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Bu araştırmada, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gelen çeşitli klinik örneklerden izole edilen *S.aureus* izolatlarının, antibiyotik duyarlılık testleriyle duyarlılık profilleri belirlenmiş ve Kongo kırmızısı

besiyerinde fenotipik olarak ayrıca polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemiyle *icaA*, *icaD*, *IS256* ve *eno* gen bölgeleri bakılarak genotipik olarak biyofilm oluşumları gösterilmiş, *S.aureus* bakterisinin antibiyotik direnci ile biyofilm oluşumu arasındaki ilişki araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Staphylococcus'ların Genel Özellikleri:

Stafilokoklar hareketsiz, sporsuz, katalaz-pozitif koklardır. Gram boyama yaymalarında, çapları 0,5-1,5 µm arasında değişen tekli, çiftler, kısa zincirler ya da küme halinde görülebilmektedir. *S.aureus anaerobius* ve *S.saccharolyticus* dışında, türlerin çoğu fakültatif anaeroptur. Bu iki tür diğerlerinden farklı olarak anaerop şartlarda ürer ve sıklıkla katalaz negatiftir. Bu bakteriler doğada çok yaygındır ve gerek çevreden gerekse insan ve hayvanların deri, mukoz membran ve diğer vücut bölgelerinden, kommensal olarak izole edilebilirler. Stafilokokları izole etmek için klinik örnekler mutlaka Koyun Kanlı Agar (KKA) ve diğer seçici besiyerlerine (mannitol-tuz agar) ekilmelidir. Yoğun bir şekilde kontamine olmuş örnekten stafilokokları izole edebilmek için, örnekler gram negatif bakterilerin üremesini inhibe eden Kolistin-Nalidiksik Asit (CNA) ya da Feniletil Alkol agar (FEA) besiyerlerine ekilmelidir. KKA plaklarında 24-48 saatte sarı, kirli beyaz ya da gri renkli 4-6 mm çapında düzgün kenarlı, alçak-konveks yapıda koloniler oluştururlar. Bazı *S.aureus* ve koagülaz negatif stafilokok (KNS) türlerinde koloni etrafında belirgin ya da silik bir beta hemoliz zonu olabilir (21) (22).

S.aureus, stafilokoklar içinde en önemli insan patojenidir. Bu mikroorganizma normal mikroflora elemanı olmasına rağmen, uygun koşullarda

görece olarak iyi huylu deri enfeksiyonlarından hayatı tehdit eden sistemik hastalıklara kadar değişen çeşitli enfeksiyonlara neden olabilmektedir (22).

S.aureus'un laboratuvarında diğer stafilokoklardan ayrılmasında ilk olarak koagülaz enzimi varlığına bakılmaktadır. Koagülaz enzimi, plazmadaki fibrinojeni fibrine dönüştürerek hücre aglütinasyonuna neden olur. *S.aureus* suşlarında bağlı (kümeleşme faktörü) ve serbest koagülaz olmak üzere iki çeşit koagülaz vardır (22).

Bağlı koagülaz direkt olarak plazmadaki fibrinojen ile reaksiyona girer ve hızlı aglütinasyona neden olur. Bağlı koagülaz laboratuvarında lamda koagülaz testi ile tespit edilmektedir. *S.aureus* un yanında *S.lugdunensis* ve *S.schleiferi subsp.* de kümeleşme faktörü oluşturmakta ve lamda koagülaz testi pozitif çıkabilmektedir. Lamda koagülaz testi negatif çıkan suşlar serbest koagülaz üretebildiğinden mutlaka tüpte koagülaz yöntemiyle doğrulanmalıdır (22).

Serbest koagülaz enzimi ise tüpte koagülaz testi ile tespit edilmektedir. Bu koagülaz, hücre dışına salgılandıktan sonra plazmada bulunan 'coagulase-reacting factor' (CRF) ile birleşip fibrinojeni fibrin formasyonuna dönüştürmektedir. 35⁰C' de 4 saat inkübasyon sonrası test çoğunlukla pozitifdir. 4 saat sonrasında negatif sonuçlanan testler 8, 16 ve 24. saatlerde kontrol edilmelidir. Bazı *S.aureus* suşları koagülaz-negatif olabilir. Bunun yanında *S.intermedius*, *S.hyicus*, *S.delphini* ve *S.schleiferi subsp. coagulans*'ın tüpte koagülaz testi pozitif olabilir. Bu suşlar birbirinden fenotipik testlerle ayrılabilir (22).

Koagülaz pozitif stafilokoklar olan *S. aureus* ile *S. lugdunensis*, *S. intermedius*, *S. schleiferi* birbirinden pirolidonil arilamidaz aktivitesi (PYR testi) ile ayrılabilir. *S.aureus* PYR negatif, diğerleri PYR pozitifdir. Ayrıca Voges-Proskauer (VP) testi ile *S. aureus* ve *S. intermedius* ile *S.hyicus* izolatları birbirinden ayrılabilir. *S.aureus* VP pozitif, *S. intermedius* ile *S.hyicus* VP negatifdir (22).

S. aureus izolatlarını koagülaz negatif stafilokoklardan (KNS) ayırt etmede kullanılan çok sayıda ticari hızlı aglütinasyon kiti mevcuttur. Bu yöntemde plazma ile kaplı latex boncuklar kullanılmaktadır. Taşıyıcı proteine bağlı fibrinojen, kümeleşme faktörünü tespit ederken, yine taşıyıcı üzerinde bulunan IgG molekülleri, stafilokok hücre duvar proteini olan Protein A'nın tespit edilmesini sağlar. Test

sonucunda hızlı bir şekilde aglütinasyonun görülmesi pozitif kabul edilir ve izolat *S.aureus* olarak tanımlanır (22).

S.aureus ve diğer KNS lerin tanımlanmasında pek çok biyokimyasal test (PİR, alkalen fosfataz, üreaz, ornitin dekarboksilaz, arjinin dihidrolaz, nitrat redüksiyonu, asetoin üretimi) karbonhidratlardan asit oluşumu (laktoz, maltoz, D-mannitol, D-mannoz, D-riboz, sükroz, D-trehaloz, D-ksiloz) ve duyarlılık testleri (novobiosin 5 µg, polimiksin B 300 IU) kullanılabilir. Ancak konvansiyonel tanımlama, klinik laboratuvarlar için çok zaman alıcıdır ve yoğun iş yükü getirmektedir. Bu nedenle pek çok firma tarafından geliştirilen otomatize ve manuel ticari tanımlama sistemleri rutin laboratuvarlarda öncelikli tercih edilmektedir (22).

2.2. Staphylococcus Aureus'un Neden Olduğu Enfeksiyonlar

İnsan nüfusunun yaklaşık %30 u *Staphylococcus aureus* ile kolonizedir. *S.aureus* hem normal flora elemanı hem de insan patojeni olan bir bakteridir. Bakteriyemi ve infektif endokarditin (İE) yanı sıra osteoartiküler, deri ve yumuşak doku, plöropulmoner ve cihaz ilişkili enfeksiyonların önde gelen nedenidir (23). *Staphylococcus aureus*'un neden olduğu enfeksiyonlar aşağıda başlıklar halinde incelenmiştir:

2.2.1. Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları

Staphylococcus aureus, hastanın yaşı, iklimi veya coğrafi bölgesine bakılmaksızın dünya çapında cilt enfeksiyonlarından en sık izole edilen patojendir(24). İyi huylu deri enfeksiyonlarından (folikülit, impetigo ve komplikasyonsuz selülit vb.) yaşamı tehdit eden ciddi pek çok deri ve yumuşak doku enfeksiyonuna neden olmaktadır. Cerrahi bölge enfeksiyonları, kutanöz apseler ve pürülan selülitin en yaygın patojenidir (25). *S.aureus* ile ilişkili dermatolojik belirtiler, bakteri tarafından üretilen Panton-Valantine lökosidin (PVL), eksfoliatif toksin (ET), enterotoksinler ve toksin şok sendromu toksin 1 (TSST-1) gibi birkaç toksine bağlanabilir (24). Son yıllarda en önemli sorun toplum kökenli metisilin

dirençli *S.aureus*'un (TK-MRSA) neden olduğu cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarının dünya çapında artmasıdır (24, 25).

2.2.2. Kan Dolaşımı Enfeksiyonları

S.aureus, hastane kaynaklı (HK) ve toplum kaynaklı (TK) kan dolaşımı enfeksiyonlarına neden olmaktadır (22). Dünya çapında her yıl, her 100.000 kişide 20-30 kan dolaşımı enfeksiyon epizodundan sorumludur ve %20-30 mortaliteyle ilişkilidir(26, 27). Vasküler kateterle ilişkili enfeksiyonlar, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları (DYDE) ve pleuropulmoner enfeksiyonlar, *S.aureus* bakteriyemisinde en sık saptanan primer odaklardır (28-30). Bununla birlikte, yapılan çalışmalarda *S.aureus* ilişkili bakteriyemilerin yaklaşık %25 inde primer odak bulunamamıştır (25). *S.aureus* un neden olduğu kan dolaşımı enfeksiyonlarında mortalite oranları primer odağa bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Kateter ilişkili bakteriyemi (%7 ila 21), DYDE (%15 ila 17) ve idrar yolu enfeksiyonları (İYE) (% 10) daha düşük mortalite oranlarıyla ilişkiliyken, odağı bilinmeyen bakteriyemi (% 22-48), İE (% 25-60) ve pulmoner enfeksiyonlar (%39-67) daha yüksek mortalite oranları göstermiştir (31). Kan dolaşımı enfeksiyonlarının antibiyotik tedavi süresi, komplikasyon gelişimine göre değişiklik göstermektedir. Kutanöz enfeksiyonlarda 10-14 günlük antibiyotik tedavisi yeterliyken, derin yerleşimli enfeksiyonlarda (apse, kemik enfeksiyonları) 4-6 hafta gibi uzun süreli antibiyotik tedavisi gereklidir (32).

2.2.3. İnfektif Endokardit (İE)

Tarihsel olarak, Viridans streptokoklar infektif endokarditin (İE) en yaygın nedeniydi, ancak bugün *S. aureus* dünyanın birçok bölgesinde İE'nin önde gelen etkeni haline gelmiştir. *S. aureus* tüm İE vakalarının %15-40'ını oluşturmaktadır (33). Sol kalp kapakları (mitral ve aort kapağı) *S.aureus* endokarditinden daha sıklıkla etkilenirken, sağ kalp kapakları (triküspit ve pulmoner kapak) intravenöz ilaç kullanıcılarında daha çok etkilenmektedir(32, 34). *S.aureus* endokarditi (SAE), *S.aureus* bakteriyemisinin en ciddi komplikasyonlarından biridir. Diğer birçok bakteriyel patojenin neden olduğu İE'den daha kötü sonuçlarla da ilişkilidir (35, 36).

Yapılan çalışmalarda; SAE hastane içi mortalitenin %20-30'u ile ilişkili bulunmuştur (36, 37).

2.2.4. Alt Solunum Yolu Enfeksiyonları

S. aureus hem TK hem de HK pnömoninin önemli bir nedenidir. Toplumdan kazanılan *S.aureus* pnömonisi çoğunlukla yaşlı bireylerde influenza pnömonisinin komplikasyonu olarak görülmektedir. Hastaneye yatırılan hastalar, nozokomiyal flora ile hızla orofaringeal kolonizasyon geliştirir ve daha sonra bu organizmalarla ilişkili alt solunum yolu enfeksiyonları ortaya çıkabilir(38-40). *S. aureus*'un hastane kaynaklı pnömoni (HKP) olgularında en yaygın patojenlerden biri olduğu bilinmektedir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)' nde yapılan retrospektif kohort çalışmasında, *S.aureus* kültür pozitif HKP vakalarının %40'ını oluşturmuştur ve olgular yaklaşık eşit MRSA ve MSSA dağılımına sahiptir (41). Yine ABD'de yapılan çok merkezli bir çalışmada, *S.aureus*'un ventilatör ilişkili pnömoni (VİP) vakalarının %28'ine neden olduğu gösterilmiştir (42).

2.2.5. Kemik-Eklem Enfeksiyonları

S. aureus, osteomyelit (OM), septik artrit ve protez eklem enfeksiyonlarının en yaygın sebebidir (43-45). *S.aureus* osteomyeliti, sıklıkla lokal enfeksiyonun doğrudan yada hematogen yayılımla komplikasyonu olarak meydana gelir. TK-MRSA ve TK-MSSA' nın neden olduğu osteomyelit ve septik artrit başlıca çocuklarda nadiren yetişkinlerde görülür (46, 47).

2.2.6. Diğer Enfeksiyonlar

S.aureus'un menenjit, perikardit, üriner sistem enfeksiyonları gibi diğer sistem ve organları tutan enfeksiyonları da bildirilmiştir (48-50). Ayrıca bakterinin ürettiği toksinler, stafilokokal haşlanmış deri sendromu, toksik şok sendromu ve besin zehirlenmesi tablolarından sorumludur (21).

2.3. *S.aureus*'un Antibiyotik Direnci

Antibiyotik direnci, bir bakterinin antimikrobiyal bir ajanın bakterisid veya bakteriostatik etkisine karşı koyabilme yeteneğidir. Günümüzde antibiyotiklerin düzensiz kullanımının artması, yoğun bakım ünitelerinde yatış sürelerinin uzunluğu, immün sistemi baskılanmış hasta sayısının artması, gıda endüstrisi ve hayvancılıkta antibiyotik kullanımı gibi nedenlerle mikroorganizmalardaki antibiyotik direnci giderek artmaktadır. Dünyada, antimikrobiyal ajanlara hızla direnç geliştiren mikroorganizmalarla ilişkili enfeksiyonlar bildirilmekte ve hem toplum kökenli hem de hastane kökenli enfeksiyonların tedavisinde önemli sorunlar yaşanmaktadır.

S.aureus, mobil genetik elemanlar yoluyla direnç genlerinin transferi, antibiyotiğin hedefi olan yapılarda meydana gelen mutasyonlar ve endojen efflux pompa ekspresyon artışı gibi mekanizmalarla pek çok antibiyotiğe direnç geliştirmektedir (51).

Son zamanlarda *S. aureus*'un, özellikle MRSA'nın epidemiyolojisinde önemli değişimler meydana gelmiştir. *S. aureus* suşları hızlı bir şekilde antibiyotiklere direnç geliştirir ve MRSA suşları karakteristik olarak çoklu ilaca dirençlidir. MRSA, önceleri daha sıklıkla nozokomiyal enfeksiyonlardan izole edilirken, son yıllarda toplum kökenli enfeksiyonlarda da önemli etken haline gelmiştir. Vankomisine dirençli suşlar nadirdir, ancak vankomisine duyarlılığı azalmış izolatlar birçok bölgede bildirilmiştir. Linezolid ve daptomisine dirençli suşlar ortaya çıksa da, bu antibiyotikler MSSA ve MRSA'nın büyük çoğunluğuna karşı etkilidirler. Yeni anti-stafilokokal ilaçlar geliştirilmiştir, ancak klinik kullanımları çok sınırlı olduğundan, direncin durumu hakkında çok fazla bilgi bulunmamaktadır (52).

2.3.1. Penisilin Direnci

Penisilin direnci, *S.aureus*' un penisilin hidrolize edici bir enzim olan penisilinaz üretiminden kaynaklanır. Bu enzimi kodlayan *blaZ* geni, transpozon *Tn552* yada *Tn552* benzeri elemanlar tarafından taşınır (51). Hem HK hem de TK enfeksiyonlardan izole edilen penisilin dirençli *S. aureus* suşu, faj tip 80/81 dir (53,

54). Penisilin klinik kullanıma girmeden önce, *S.aureus* enfeksiyonlarında mortalite oranı % 80 idi (55). 1940'ların başında, *S. aureus* enfeksiyonları tedavisinde penisilinle başarılı sonuçlar alınmış ancak 1942'de penisiline dirençli ilk suşlar, önce hastanelerde ve daha sonra toplumdan izole edilmiştir (56). 1950'de, tüm stafilokok izolatlarının % 50'sinden fazlası penisiline dirençliken, günümüzde bu oran %90-95 lere ulaşmıştır (57).

2.3.2. Metisilin Direnci

Penisilin dirençli *S.aureus* suşlarıyla ortaya çıkan tedavi sorunu, 1959 yılında beta-laktamaza dayanıklı bir penisilin türevi olan metisilin kullanıma girmesiyle çözülmüştür. Ancak 1961 yılında ilk MRSA suşu İngiltere' de ortaya çıkmıştır (58). İlk tanımı izleyen on yıl içinde MRSA, dünyanın birçok yerinde hastane salgınlarından hastane kaynaklı MRSA (HK-MRSA) suşları sorumluydu (59). Daha sonra 1980'lerde Avustralya'da ve 1990'larda Amerika Birleşik Devletleri'nde sağlık hizmeti ile ilişkisi olmayan bireylerde toplum kaynaklı MRSA (TK-MRSA) suşları tespit edilmiş, MRSA epidemiyolojisinde önemli değişiklikler meydana gelmiştir (60, 61). Gelişmeleri takip eden 20 yıl içinde, çeşitli uluslararası MRSA suşları, hem hastanelerde ve hem de toplumda pek çok enfeksiyona sebep olarak, pandemik mikroorganizmalar haline gelmiştir (62).

Diğer yandan hayvancılıkta ve diğer tarımsal faaliyetlerde antimikrobiyal ajanların gelişigüzel kullanımı, pek çok hayvan türünde MRSA kolonizasyonu ve enfeksiyonu gelişimine katkıda bulunmuştur. Almanya'da domuzların % 40'ından fazlası, sığırların % 20'si etkilenmiştir (63, 64). Araştırmalar, hayvancılıkla uğraşan insanların da çiftlik hayvancılığı ilişkili MRSA (LA-MRSA) ile kolonize veya enfekte olma riskinin yüksek olduğunu göstermiştir (65, 66). Bu durum, MRSA'nın yayılımında hayvanların önemli bir rezervuar olduğunu göstermektedir.

Beta-laktam grubu antibiyotikler, *S.aureus*'un hücre duvarında bulunan penisilin bağlayan protein (PBP) lere (PBP1, PBP2, PBP3 ve PBP4) bağlanır, bu da peptidoglikan tabakanın sentezinin bozulmasına ve bakterinin ölümüne yol açar. *S.*

aureus'un metisilin direnci, penisilin bağlayıcı protein 2a (PBP2a) yı kodlayan *mecA* geninin varlığından kaynaklanır. PBP2a, beta-laktam grubu antibiyotikler için son derece düşük bir afiniteye sahiptir; beta-laktam antibiyotiklerin varlığında PBP2a, peptidoglikan biyosentezinin transpeptidaz işlevini devralır (67, 68).

Metisilin direncinden sorumlu *mecA* geni, hareketli bir genetik eleman olan *stafilokok kaset kromozom mec (SCCmec)* üzerinde taşınır. Metisiline dirençli stafilokok suşlarının ortaya çıkması, bu mobil genetik elemanların duyarlı suşlar tarafından edinilmesinden kaynaklanmaktadır. Bugüne kadar MRSA suşları için toplam 13 tip *SCCmec* tanımlanmıştır.(I-XIII) HK-MRSA izolatları Tip I, II, III *SCCmec* bölgesi bulundururken, TK-MRSA izolatlarında ise daha çok Tip IV, V ve VII *SCCmec* bulunmaktadır (69).

Stafilokoklarda, *mecA* ile aktarılan direnç, seftarolin ve seftobiprol hariç tüm beta-laktam antibiyotiklere direnç gelişimine neden olur. *SCCmec* ayrıca beta-laktam dışı antibiyotiklere direnç gelişimine neden olan *Tn554*, *pT181* ve *pUB110* gibi diğer genetik yapıları da içerebilir (70). TK-MRSA suşlarında görülen *SCCmec* tipleri, HK-MRSA suşlarında görülen çoklu antibiyotik direnci genlerine sahip değildir. TK-MRSA *SCCmec* tipleri Panton-Valentine-lökositin (PVL) geni taşırlar (22).

İngiltere’de 2007 yılında mastitli sığırların süt örneğinden izole edilen, metisilin dirençli *S.aureus* LGA251 suşu, oksasiline ve sefoksitine dirençliydi fakat *mecA* geni ve PBP2a için yapılan testler tekrarlı negatif bulundu. *S.aureus* LGA251’in genom dizisi analiz edildiğinde, *mecA* ya yaklaşık %69 oranında benzeyen yeni bir *mecA* geni gösterildi (71). Daha sonra bu *mecA* homoloğu, Uluslararası Stafilokok Kaset Kromozom Elemanları Sınıflandırma Çalışma Grubu (IWG-SCC) tarafından *mecC* olarak adlandırılmıştır (72). Garcia-Alvarez ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, bu suş sadece sığırlardan değil insan örneklerinde de izole edilmiştir (71).

Üçüncü bir *mec* geni, *Macroccoccus caseolyticus*’un hem kromozom hem de plazmidi üzerinde rapor edilmiştir. Baba ve arkadaşları, 2009 yılında Japonya’da bir tavuğun derisinden izole edilen metisiline dirençli *M. caseolyticus* JCSC5402 suşunun genom dizisini belirlediler. Bu suş tarafından taşınan bir *mecA* gen

homologu tanımladılar. Homolog, *S. aureus* N315'in orijinal *mecA*'sına % 62 nükleotit sekans benzerliği göstermiştir (73). Bu gen 2012'de IWG-SCC tarafından *mecB* olarak adlandırılmıştır (72). Daha sonra, 2018 yılında, 67 yaşında bir kardiyoloji hastasının burun sürüntüsünde, plazmid ile taşınan *mecB* geni bulunmuştur. İzolat *mecA* ve *mecC* genleri negatif iken metisiline direnç göstermiştir. Bu izolatın *mecB* geni analizinde, *M. caseolyticus*'dan rapor edilen *mecB* geni ile % 100 sekans benzerliği gösterdiği tespit edilmiştir (74).

Laboratuvarlarda MRSA tespiti için, The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) tarafından önerilen 30 ug sefoksitin içeren disk ile yapılan disk difüzyon yöntemi uygulanmaktadır. Oksasilin disk difüzyon yöntemi ise EUCAST tarafından artık önerilmemektedir. Sefoksitin (30 ug) zon çapı <22 mm olan *S.aureus* suşları metisilin dirençli olarak raporlanır (75).

Direnç gelişiminden sorumlu olan *mecA* geninin PZR yöntemleriyle genotipik olarak tespit edilmesi de mümkündür. Ayrıca günümüzde PBP2a proteini lateks aglütinasyon kitleri kullanılarak tespit edilebilmektedir (75). Stafilokoklarda, *mecA*, *mecB* ve *mecC* gen bölgeleri ile aktarılan direnç, antibiyotik duyarlılık testleri ile tespit edilebilir. Ancak moleküler yöntemlerle MRSA suşları araştırılırken, gen bölgesine özgü primerler kullanılmalıdır (69).

2.3.3. Glikopeptit Direnci

Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*'un (MRSA) çok ilaca dirençli ve epidemik klonları, 1990'ların sonunda, hem hastanelerde hem de toplumda *S. aureus* ile ilişkili enfeksiyonların en sık nedeni olmuştur (76). MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde en sık kullanılan ajan başta vankomisin olmak üzere glikopeptid grubu antibiyotiklerdir (52).

Vankomisin dirençli enterokokların 1980' lerde ortaya çıkmasından sonra, *S.aureus*'un *vanA* genini enterokoklardan edinmesiyle ilgili endişeler gündeme gelmiştir (77). 2002 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde *vanA* geninin vankomisine dirençli enterokoklardan transferi ile ortaya çıkan vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA) suşu ilk kez bildirilmiştir (78). Direnç mekanizması önemli

olmasına rağmen, dünya genelinde sınırlı sayıda VRSA izolatu bildirilmiştir (79, 80). Direnç mekanizması VRSA dan farklı olan vankomisin-intermediate *S.aureus* (VISA) ve heterojen vankomisin-intermediate *S.aureus* (hVISA) suşları da 1997'den bu yana bildirilmektedir (81).

Literatürde hem glikopeptid-intermediate *S. aureus* (GISA) hem de vankomisin-intermediate *S. aureus* (VISA) terimleri kullanılmaktadır. Genel olarak VISA suşları azalmış teikoplanin duyarlılığı göstermektedir bu nedenle her iki terim birbirinin yerine kullanılabilir ancak *S. aureus*'ta azalmış teikoplanin duyarlılığının vankomisine duyarlılıkta belirgin bir azalma olmaksızın olabileceği de gösterilmiştir (81).

EUCAST ve 'Clinical Laboratory Standards Institute' (CLSI) rehberlerinde vankomisine duyarlı *S.aureus* (VSSA) suşları için minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) ≤ 2 mg/L'dir(75). EUCAST rehberinde vankomisin MİK >8 mg/L olan *S.aureus* izolatları glikopeptid dirençli *S.aureus* (GRSA), MİK 4-8 mg/L olan, düşük düzey vankomisin dirençli izolatlar glikopeptit intermediate *S.aureus* (GISA) olarak tanımlanmıştır. Ayrıca VISA suşları içerisinde heterojen bir grupta tanımlanmıştır. Vankomisin duyarlı (MİK ≤ 2 mg/L) ancak popülasyon profili analizi ile vankomisin MİK >2 mg/L olan suşlar heterojen glikopeptid intermediate *S.aureus* (hGISA) olarak adlandırılmıştır (75).

hVISA/VISA fenotipinin aydınlatılmasıyla ilgili pek çok araştırma yapılmaktadır. Bu çalışmaların çoğu direnç mekanizması ile ilişkili hücre duvarı değişikliklerine odaklanmıştır (81).

Bakterilerin hücre duvarının temel bileşeni, birbirini takip eden NAG (N-asetilglukozamin) ve NAMA (N-asetilmuramik asit) molekülleri ile bunlara çapraz bağlanmış pentapeptitlerden (UDP-MurNAc-L-Ala-D-iso-Gln-L-Lys-D-Ala-D-Ala) oluşan peptidoglikan yapısıdır. Gram pozitif bakterilerde vankomisin, yeni sentezlenmiş UDP-MurNAc-pentapeptit yapının sondan bir önceki D-Ala-D-Ala ucu ile kovalent olmayan hidrojen bağları oluşturarak, geç evre peptidoglikan sentezini engeller. Böylece, bakteri hücre duvar sentezi gerçekleşemez ve bağlı vankomisin-pentapeptit kompleksleri hücre içinde birikir (81). hVISA/ VISA izolatların ortaya

çıkmasına, hücre duvar döngüsünün azalması, azalmış otolitik aktivite ve bazen hücre duvar sentezinin aktive olması sonucu hücre duvarının kalınlaşarak bölünme septumundaki vankomisin bağlanma bölgesine, vankomisin erişiminin azalmasının neden olduğu düşünülmektedir (81).

Yapılan çalışmalarda hVISA suşları VISA suşlarının öncülü gibi görünmektedir ve hücre duvarına etkili antibiyotiklere maruz kaldıktan sonra bu suşların VISA suşlarına dönüştüğü gösterilmiştir (82, 83).

hVISA/ VISA fenotipinin moleküler mekanizmalarıyla ilgili birkaç gen bölgesi sorumlu tutulmaktadır. *GraRS* ve *walKR* gibi düzenleyici sistemleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonların azalmış glikopeptit duyarlılığına neden olduğu gösterilmiştir. *GraRS* sistemi hücre duvar sentezinde görevli genlerin transkripsiyonunu farklı şekillerde düzenleyerek, VISA izolatlarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Ayrıca *GraRS* sistemi kapsül sentezinde görevli genlerin ekspresyonunu artırarak direnç gelişimine katkıda bulunmaktadır. Ayrıca VISA fenotipiyle ilişkili diğer bir gen düzenleyici sistem olan *WalKR* operonunun edinilmiş mutasyonlarının, artmış kapsül sentezine, hücre duvarı kalınlığında artışlara ve azalmış otolize yol açtığı gösterilmiştir (81).

hVISA ve VISA suşlarının neden olduğu enfeksiyon için ana risk faktörleri, önceki MRSA enfeksiyonu ve önceki vankomisin kullanımıdır (84). Hastanelerde vankomisinin yaygın kullanımı sonucu, *S.aureus* izolatlarının vankomisin MİK'lerinde artış meydana gelmekte ve sonuç olarak hVISA suşları ortaya çıkmaktadır (85).

hVISA ve VISA suşlarının neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde vankomisinin etkisiz kaldığı saptanmıştır (86, 87). Bu suşların neden olduğu enfeksiyonların vankomisin ile tedavisi muhtemelen terapötik başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Ayrıca bakteri yükünün fazla olduğu enfeksiyonlar ve düşük vankomisin serum düzeylerine maruz kalma, bu suşlar ile re-enfeksiyon riskini artırarak kalıcı enfeksiyonla sonuçlanabilmektedir. Bakteriyel yoğunluğu yüksek olan MRSA enfeksiyonlarında, debridman ve yeterli vankomisin dozu ile tedavi,

hVISA ve VISA izolatlarının ortaya çıkmasını önlemek için muhtemelen en önemli yollardır (88).

Avrupa’ da yapılan bir tek merkezli çalışma sonuçlarına göre; MRSA izolatları içinde hGISA prevelansı $\leq 2\%$ olup GISA %0.1’den düşüktür. Yüksek MİK değerine sahip GISA ve hGISA izolatların neredeyse tamamı MRSA dır (75, 81).

EUCAST rehberinde glikopeptitlere duyarlı olmayan *Staphylococcus aureus* saptanması için aşağıda bahsedeceğimiz yöntemler önerilmektedir. Disk difüzyon yöntemi hGISA ve GISA saptanması için kullanımı önerilmemektedir. hGISA ve GISA saptanmasında EUCAST uluslar arası rehberi tarafından önerilen altın standart yöntem buyyon mikrodilüsyondur. hGISA mekanizması karışıktır ve saptanmasının zorluğu nedeniyle testler tarama ve doğrulama olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. hGISA taramasında, Makro G-test, teikoplanin tarama agar ve glikopeptit direnci saptanması için G- test önerilen yöntemlerdir. Laboratuvarı hGISA saptanması için altın standart yöntem yoğun emek, özel ekipman ve tecrübeli uzmanlık gerektiren eğri altındaki alan popülasyon profili analizi (PAP-AUC) yöntemidir. Taramayla pozitif bulunan izolatlar eğri altındaki alan popülasyon profili analizi (PAP-AUC) yöntemi ile doğrulanmalıdır (75).

2.3.4. Beşinci Kuşak Sefalosporin Direnci

Hem gram pozitif, hem de gram negatif bakterilerin hızla gelişen beta-laktam direncine karşı daha geniş antimikrobiyal etki spektrumuna sahip birçok semi-sentetik türev üretilmiştir. Seftarolin ve seftabiprol MRSA üzerine etkili paranteral kullanılan 5. kuşak sefalosporinlerdir. Her ikisi de toplum kökenli streptokok pnömonisi tedavisinde kullanılırken, seftarolin, *S.aureus*’a bağlı deri ve yumuşak doku enfeksiyonları tedavisinde Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onayı almıştır (51).

Seftobiprol-medokaril, plazma esterazları tarafından parçalanarak aktif formu seftobiprole dönüştürülür. Seftobiprol, MRSA nın PBP2a’sı, penisiline dirençli *Streptococcus pneumoniae*’nin PBP2x ve *Enterococcus faecalis* izolatlarında

bulunan PBP5'e yüksek afinite gösterir. Ayrıca *E.coli* ve *P.aeruginosa*'nın PBP 3'üne de yüksek afinite ile bağlanmaktadır. Gram negatif bakterilerin ürettiği *AmpC* beta laktamazlara dayanıklı iken, GSBL, karbapenemaz ve *OXA-10* üreten suşlara karşı etkisizdir. Böylece MRSA a dahil pek çok dirençli gram pozitif bakteriye ve duyarlı gram negatif bakterilere karşı etkindir (89).

Seftarolin, ön maddesi seftarolin fosamil den açığa çıkan diğer MRSA üzerine etkili 5.kuşak sefalosporindir. Yapılan çalışmalarda, MRSA, VISA ve VRSA suşlarına in-vitro etkili bulunmuştur (90). Seftarolin in iki yapısal molekülünün, MRSA'nın PBP2a sına bağlandığı gösterilmiştir. Bunlardan biri aktif bölge serinini inaktive ederken, diğeri bir allosterik bölgeye bağlanır. Hem aktif bölgeye yakın, hem de PBP2a'nın allosterik bölgesindeki aminoasitlerde meydana gelen mutasyonlarla ilaca dirençli suşlar oluşmaktadır (51).

2.3.5. Makrolid-Linkozamid-Streptogramin B (MLSB) Direnci

2.3.5.1. Makrolid Direnci:

Makrolidler, bakteri ribozomunun 50S alt ünitesinin 23S ribozomal RNA(rRNA)'sına geri dönüşebilir olarak bağlanır ve protein sentez inhibisyonuna neden olarak etkilerini gösterirler (21). Stafilocoklarda makrolid direnci, 3 mekanizmayla ortaya çıkmaktadır. Hedef molekül değişikliği makrolid direncinde en sık görülen mekanizmadır. Ribozomal 50S subünitin 23S rRNA'sının adenin rezidüleri bakterinin metilaz enzimi tarafından metillenir. Böylece antibiyotik hedefi olan yapıya bağlanamaz. Stafilocoklarda metilaz enzimi başlıca *ermA*, *ermB* ve *ermC* genleri tarafından kodlanmaktadır. Metilaz enzimi makrolidler tarafından indüklenebilir ya da bir makrolid olmadan da sürekli ortama salınabilir (91).

Ribozomda meydana gelen metillenme sonucu makrolid, linkozamid ve streptograminlere karşı direnç gelişir (MLSB fenotipi). MLSB direnci konstitüsyonel (cMLSB) veya indüklenebilir (iMLSB) şekilde görülebilir. Konstitüsyonel dirençte MLSB grubu antimikrobiyallere direnç gelişir. İndüklenebilir dirençte de durum benzer olmasına rağmen *erm* genlerini hızla uyaran 14-15 üyeli makrolidlere direnç daha önce gözlenir (91, 92).

iMLSB fenotipinin tespit edilmesi için D-test adı verilen bir test yapılmaktadır. Bu testte kenardan kenara 12-20 mm olacak şekilde eritromisin ve klindamisin diskleri yerleştirilir. Diğer disk difüzyon testlerine (DDT) benzer şekilde normal atmosfer şartlarında, 35 ± 2 C°'de, 18 ± 2 saat inkübasyon sonunda sonuçlar değerlendirilir. Klindamisin zonunun eritromisine bakan tarafında bir düzleşme olması durumunda test pozitifdir ve klindamisin dirençli olarak raporlanarak “komplike olmayan deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının kısa süreli tedavisinde klindamisin kullanılabilir, bu şekilde kullanımlarda yapısal direnç gelişmesi beklenmez” notu düşülebilir. D-test fenomeni tespit edilmeyen izolatlar ise klindamisine duyarlı olarak raporlanır. Eritromisin ve klindamisine dirençli bulunan izolatlar cMLSB fenotipidir ve her iki antibiyotiğe dirençli olarak raporlanır (75).

Diğer direnç mekanizmaları ise; makrolidlerin enzimlerle inaktivasyonu (örn: esterazlar, fosforilazlar, glikozidaz) ve antibiyotığın aktif taşıma sistemi ile dışa atımıdır (21).

2.3.5.2 Streptogramin Direnci:

Streptograminler, *Streptomyces pristinaspiralis*'ten elde edilen antibiyotiklerdir. Kinupristin-dalfopristin, kinupristin (streptogramin-B) ve dalfopristinin (streptogramin-A) 30:70 oranında biraraya gelmiş şeklidir. Bu iki bileşik birlikte sinerjik etki ederek bakterisidal etki gösterirler. 50S ribozomal alt ünitesine bağlanarak hem peptid zincir uzamasını hem de peptidil transferaz enzimini inhibe eder. *S. pneumoniae*, β - ve α -hemolitik streptokoklar, *E. faecium*, koagülaz negatif ve pozitif stafilokoklar gibi gram pozitif bakterilere etkilidir (21).

Stafilokoklarda kinupristin direnci, *ermA*, *ermC* genleri tarafından kodlanan ribozomal metilazların ilacın hedefi olan bölgeye bağlanmasını engellemesiyle gelişmektedir. Ayrıca *vgb* ve *vgbB* genleri tarafından kodlanan laktonaz enzimi streptogramin B'yi hidroliz eder. Streptogramin-B direncine neden olan genler kinupristin-dalfopristine direnç gelişimi için yeterli olmamaktadır. Kinupristin-dalfopristin direnci her zaman streptogramin-A direnç genleri ile birliktedir. Dalfopristin (streptogramin-A) direncine ise asetiltransferaz kodlayan *vatA*, *vatB*,

vatC, *vatD* ve *satA* genleri neden olmaktadır. Ayrıca *vga/vgaB* genleri ATP bağımlı dışa atım pompaları ile dalfopristin direncine neden olur. Bu genler plazmid üzerinde taşınır ve konjugasyon ile aktarılabilir (93).

2.3.6. Oksazolidinon Direnci

Bu grubun kullanımında olan tek üyesi olan linezolid gram pozitif ve anaerob bakterilere etkili bir antibiyotiktir. Linezolid, 50S ribozomal alt ünitesinin 23S rRNA'sına bağlanarak aminoasil-transfer RNA(tRNA) 'ya bağlanma alanının şeklini bozar ve 70S başlangıç kompleksinin oluşumu önlenir. MRSA ve VISA dahil *S. aureus*, metisilin duyarlı (MS) ve Metisilin dirençli koagülaz negatif stafilokoklar (MRKNS), *S. pneumoniae* (penisiline dirençli ve çoklu dirençli suşlar dahil), beta-hemolitik ve viridans streptokoklar, *Enterococcus* spp. (vankomisine dirençli olanlar dahil), *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp. ve *Listeria monocytogenes* linezolide duyarlı mikroorganizmalar arasındadır. Gram-negatif bakteriler dışa atım pompası yoluyla linezolide doğal direnç gösterirler. Atipik mikroorganizmalara (*Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumonia*, *Chlamydia pneumoniae*) etkili görünmekle birlikte, *in-vivo* etkinliğine dair yeterli çalışma bulunmamaktadır. *Nocardia* türlerine de *in-vitro* etkinliği bulunmaktadır (21).

Linezolid, toplum ve hastane kaynaklı pnömonilerin ve deri-yumuşak doku enfeksiyonlarının tedavisinde kullanım onayı almıştır. Özellikle MRSA kaynaklı ventilatör ile ilişkili pnömoni (VİP) olgularının tedavisinde önemli bir yere sahiptir. Yapılan çeşitli çalışmalarda MRSA'nın etken olarak saptandığı hastane kaynaklı pnömoni ile VİP olgularında vankomisine kıyasla linezolid ile tedavi sonucunda daha yüksek sağkalım ve kür oranları elde edilmiştir (94, 95).

Klinik izolatlarda linezolid direnci hala çok nadirdir ve ancak yurtdışında plasmid ile aktarılan *cfr* geni kaynaklı linezolid dirençli MRSA ların bildirildiği birkaç rapor bulunmaktadır (96).

Cfr proteini 23S rRNA'da A2503' ün C-8 ini metilleyen bir metiltransferazdır. Bu değişiklik sonucunda fenikol, linkozamid, oksazolidinon,

plöromutilin ve streptogramin A gibi antibiyotik gruplarının hedef bölgeye bağlanması engellenmiş olur (51).

Aynı zamanda *S.aureus*'ta linezolid direnci, 23S rRNA da meydana gelen nükleotid değişiklikleri sonucunda da ortaya çıkmaktadır. *S.aureus*' larda en sık G2576T mutasyonu saptanmıştır. Ribozomal proteinler olan L3 ve L4 te meydana gelen değişiklikler de linezolid direncine neden olmaktadır. *S.aureus*' larda 23S rRNA'nın beş ya da altı kopyası bulunmaktadır. Bu genlerde ki mutasyon artışı ile linezolid MİK değerlerinde artış arasında pozitif korelasyon gösterilmiştir. Üstelik linezolid kullanım süresi ile mutasyona uğrayan rRNA gen sayısı arasında ilişki saptanmıştır (51).

2.3.7. Tetrasiklin Direnci

Tetrasiklinler, geniş spektrumlu bakteriyostatik antibiyotiklerdir ve 30S ribozomal alt üniteye geri dönüşülebilir olarak bağlanıp, aminoasıl-transfer RNA (tRNA)' nın 30S ribozom-mRNA kompleksine bağlanmasını bloke ederek, protein sentezini inhibe ederler. Tetrasiklinler *Chlamydia*, *Mycoplasma* ve *Rickettsia* türleri ve diğer bazı gram pozitif ve gram negatif bakterilerin oluşturduğu enfeksiyonların tedavisinde etkilidir. Tetrasiklinlere karşı direnç; antibiyotiğin bakteri hücresi içine girişinin azaltılması, hücre dışına aktif atılımın artması, ribozomal hedefte değişiklik veya antibiyotiğin enzimatik modifikasyonu gibi mekanizmalarla gelişebilir (21).

Stafilokoklarda plazmid aracılı *tetK* ve *tetL* genlerinin kazanılmasıyla aktifleşen dışa atım pompaları ilacın hücre dışına atılımına ve tetrasiklin direncine neden olmaktadır. Ayrıca kromozomal ya da transpozon aracılı *tetM* ve *tetO* genleri aracılığıyla ribozomal koruma proteinleri sentezi direnç gelişinde diğer mekanizmadır (51).

2.3.8. Glisilsiklin Direnci

Tigesiklin, glisilsiklinler sınıfının ilk üyesidir. Yarı sentetik bir minosiklin türevidir. Tetrasiklinlerle aynı şekilde protein sentezini inhibe eder. Tigesiklinin

ribozoma bağlanma afinitesi daha yüksektir ve hücreden dışa atım ve enzimatik modifikasyon mekanizmalarından daha az etkilenir. Dolayısıyla tetrasiklin direnci gösteren izolatlar karşı daha potent bir etkiye sahiptir (21).

Tigesiklin, komplike intraabdominal enfeksiyonların ve komplike deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının tedavisinde oldukça etkilidir. Yapılan çalışmalarda komplike deri/yumuşak doku enfeksiyonlarının tedavisinde vankomisin kadar başarılı olduğu gösterilmiştir (97).

Ülkemizde *S.aureus* izolatlarında tigesiklin direnci saptanmamakla birlikte yurtdışında direnç bildirilen çalışmalar mevcuttur (98, 99). Ribozomal protein S10'u kodlayan *rpsJ* genindeki mutasyonlara bağlı olarak tigesiklin direnci gelişebilmektedir. Direnç için mekanik açıklama belirsizdir, ancak büyük olasılıkla tigesiklin bağlanma bölgesinde ilacın erişimini azaltan yapısal bir değişiklikten kaynaklanmaktadır. Diğer bir direnç mekanizması ise dışa atım pompasının ekspresyonundaki artış ile ilişkilidir (51).

2.3.9. Kinolon direnci

Kinolonlar hem gram pozitif hem gram negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla kullanılan antibiyotiklerdir. Bakteride Deoksiribonükleik asit (DNA) replikasyonu, rekombinasyonu ve tamiri için gerekli DNA topoizomera II (giraz) ve topoizomera IV enzimlerini inhibe ederek etki gösterirler. Stafilokoklarda dahil olmak üzere gram pozitif bakterilerde ilacın primer hedefi topoizomera IV enzimidir (21).

İlk kullanıma giren kinolon nalidiksik asittir. Günümüzde bu ilaç yerini geniş etki spektrumuna sahip siprofloksasin, levofloksasin ve moksifloksasin gibi kinolonlara bırakmıştır.

Stafilokoklarda kinolon direnci topoizomera enzimlerinde mutasyonel değişiklik ve ilacın dışa atım pompalarının yüksek düzey ekspresyonundan kaynaklanmaktadır.

İlacın bağlanma bölgesindeki (topoizomeraz enzimi) aminoasitlerde meydana gelen mutasyonel değişiklik en sık karşılaşılan mekanizmadır. Stafilokoklarda topoizomeraz IV, en yüksek hassasiyete sahip topoizomerazdır ve bu nedenle birincil hedeftir. DNA giraz daha az duyarlıdır ve ikincil hedeftir. Stafilokoklar florokinolonlara karşı çok duyarlıdır, bu nedenle MİK sınır değerini aşan bir direnç geliştirmek için her iki enzimde de değişiklik yapılması gerekir (51).

S.aureus izolatlarının kinolon direncinde, kromozom aracılı gerçekleşen dışa atım pompalarının üretiminde artış önemli bir mekanizmadır. NorA pompası norfloksasin ve siprofloksasini, NorB ve NorC ise moksifloksasini hedef alır. Bu pompaların artmış ekspresyon düzeyleri MİK değerlerinde 4-8 kat artışa neden olmaktadır (51).

2.3.10. Rifampin direnci

Rifampin *Streptomyces mediterranei*'nin ürettiği rifampin B'nin yarı sentetik türevidir. İlaç bakterinin DNA'ya bağlı RNA polimeraz enzimine bağlanıp RNA sentezini inhibe eder. Stafilokoklar ve streptokoklar başta olmak üzere gram pozitif bakterilere etkili bir antibiyotiktir. Ayrıca *Mycobacterium tuberculosis* bakterisidal etkinlik gösterir (21).

Stafilokoklarda rifampisin direnci ilacın hedef bölgesi olan RNA polimerazın beta alt ünitesini kodlayan gende meydana gelen mutasyon sonucu ortaya çıkmaktadır. Rifampisine çok hızlı direnç geliştiği için, *S.aureus*'un neden olduğu endokardit ve bakteriyemi tedavisinde beta laktam ve glikopeptit grubu ilaçlarla birlikte kullanılmasına onay verilmiştir (51).

2.3.11. Sülfonamid ve trimetoprim direnci

Sülfonamidler, folik asidin öncüsü olan dihidropteroatı oluşturmak için gerekli dihidropteroat sentazı (DHPS) inhibe eder. Böylece mikroorganizmaların yaşamı için gerekli folik asit sentezi bozulmuş olur. Trimetoprim ise folik asit sentezinde görevli dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe eder ve böylece

dihidrofolatın tetrahidrofolata dönüşümü engellenerek folik asit metabolizması bozulur. Sülfonamidler *Nocardia* ve *Chlamydia*'yı da içeren geniş gram negatif ve gram pozitif etkinlik gösterirler. Stafilokok izolatlarında sülfametoksazole (SMX) direnç, muhtemelen ilacın enzime bağlanmasını önleyen kromozom olarak kodlanmış DHPS'deki amino asit değişikliklerinden kaynaklanır (21, 51).

2.4. *Staphylococcus Aureus*'un Virulans Faktörleri

2.4.1. Peptidoglikan, Teikoik Ve Lipoteikoik Asitler:

S.aureus hücre duvarı; diğer gram pozitif bakterilerdekine benzer şekilde N-asetil glukozamin ve N-asetil muramik asite çapraz bağlanmış polimerlerden oluşan peptidoglikan tabaka ve özgün ribitol teikoik asitten oluşur.. Teikoik asit konak hücreye tutunmada görev alır. Lipoteikoik asitler hücre zarında yer alır ve peptidoglikanın hücre zarına bağlanmasını sağlar. Peptidoglikan, teikoik ve lipoteikoik asitler bakteri hücre duvarına dayanıklılık sağlamanın yanında kompleman aktivasyonu, nötrofil kemotaksisi, makrofajdan IL-1 salınımı ve opsonik antikorların üretimini uyarak virulansta önemli rol oynamaktadır (21, 22).

2.4.2. Yüzey Adezyon Proteinleri:

S.aureus'ta konak dokularına tutunmada görev yapan çok sayıda yüzey proteini tanımlanmıştır. Adezif matriks moleküllerini tanıyan mikrobiyal yüzey komponentleri (MSCRAMM) olarak adlandırılan bu proteinler *S.aureus* hücre duvarı peptidoglikanına bağlıdır. Fibronektin, fibrinojen, elastin, kollojen gibi konak matriks proteinlerine ve plastik yüzeylere tutunmaya aracılık ederler. Ayrıca bazı adezinler, hemin, hemoglobin, transferrin ve haptoglobuline yapışmayı sağlar. Bu moleküllere ait genler bakterinin kromozomu üzerinde yer alır ve tüm *S.aureus* suşlarında bulunur. En iyi tanımlanmış MSCRAMM proteinleri; stafilokokal protein A, fibronektin bağlayan protein A ve B ile pıhtılaşma (clumping) faktör proteinleri A ve B dir. Bunlar dışında, *S.aureus* yüzey proteinleri B,C,D,F,G,H ve K da bulunur. Pıhtılaşma faktör proteinleri koagülaz olarakta bilinir ve fibrinojeni fibrine

dönüştürerek bakterinin kümeleşmesini sağlar. Bu proteinlerin saptanması *S.aureus* bakterisinin tanımlanmasında kullanılır (21, 22).

Protein A, bir MSCRAMM proteinidir ve IgG₁, IgG₂ ve IgG₄' ün Fc reseptörlerine bağlanır. Protein A, opsonizasyonu ve bakterinin PMNL'ler tarafından hidrolizini engeller ayrıca komplemanı aktive ederek hızlı ve gecikmiş tip aşırı duyarlılık reaksiyonlarına neden olur. Protein A, vonWillebrand faktör ve kompleman protein C3' e bağlanarak bakterinin trombositlere yapışmasını sağlar. Bu protein, bir B lenfosit süperantijenidir ve B lenfosit reseptörlerine bağlanarak özgül antikor üretimine engel olur. Kromozomal *spa* geni tarafından kodlanmaktadır. Protein A laboratuvarında *S.aureus*'un tanımlanmasında kullanılmaktadır (21, 22).

2.4.3 Enzimler:

2.4.3.1. Katalaz

S.aureus pek çok enzim üretmektedir. Bakteri tarafından oluşturulan katalaz, hidrojen peroksidi su ve oksijen gazına ayrıştıran bir enzimdir. Bakterinin sindiriminden sonra fagositik hücre içerisinde oluşan toksik hidrojen peroksit ve serbest radikallerin inaktivasyonunda görevlidir (21, 22).

2.4.3.2. Koagülaz

Diğer bir enzim bakterinin tanımlanmasında da kullanılan, koagülaz enzimidir. *S.aureus*'ta bağlı ve serbest olmak üzere iki tip koagülaz enzimi bulunmaktadır. Stafilokokların hücre duvarında bağlı olarak bulunan koagülaz, fibrinojeni fibrine dönüştürerek stafilokokların kümelenmesine neden olur. Serbest koagülaz ise, 'coagulase reacting factör' (CRF) ile etkileşerek trombin benzeri bir madde olan stafilotrombin oluşturur ve bu madde fibrinojeni fibrine dönüştürür. Böylece bakteri fagositoza karşı korunmuş olur (21, 22).

2.4.3.3. Fibrinolizin

Stafilokoklar çevre dokulara yayılmayı sağlayan çeşitli enzimler üretmektedir. Fibrinolizin, fibrin pıhtılarını parçalar ve çevre dokulara enfeksiyonun yayılımını kolaylaştırır (21, 22).

2.4.3.4. Hiyalüronidaz

Hiyalüronidaz enzimi, bağ dokusunun matriks komponenti hiyalüronik asiti parçalar ve bakterinin komşu dokulara invazyonu kolaylaştırır (21, 22).

2.4.3.5. Lipaz, Fosfolipaz C, Nükleaz

Kronik fronküle neden olan *S.aureus* suşlarının cilt ve cilt altı dokulara yayılımını sağlayan lipazlar ürettiği de gösterilmiştir. Bakteri tarafından üretilen fosfolipaz C, akut solunum yetmezliği sendromu ve yaygın damar içi pıhtılaşma öyküsü olan hastalardan izole edilen suşlarla ilişkili bulunmuştur. *S.aureus* DNA'yı hidroliz edebilen nükleaz da üretmektedir (21, 22).

2.4.3.6. Beta-laktamaz

S.aureus, antibiyotik direnciyle ilişkili pek çok beta-laktamaz enzimi de üretmektedir. Bu enzimleri kodlayan genler plazmidlerle taşınır ve beta laktam antibiyotiklere direnç gelişimine neden olur (21, 22).

2.5. Hemolizinler ve Lökositinler:

2.5.1. Alfa-hemolizin

S.aureus suşlarının çoğu tarafından yapılan, bakteri kromozomu veya plazmidler tarafından kodlanan 33.000 kDa ağırlığında bir polipeptittir. Bu toksin eritrosit, lökosit, hepatosit ve trombosit gibi pekçok hücre tipine karşı toksik etki

gösterir ve kan damarı düz kasını hasara uğratar. Alfa-toksin konak hücre membranında porlar oluşturarak K iyonlarının atılımına ve Na ve Ca iyonlarının hücre içine alınmasına izin verir ve böylece hücre osmotik şişmeye uğrayarak parçalanır. Alfa toksin stafilokok enfeksiyonlarında doku yıkımından sorumlu önemli bir medyatördür. Alfa-toksin ayrıca bakterinin koyun kanlı agarda yaptığı beta hemolizden sorumludur (21, 22).

2.5.2. Beta-hemolizin

Stafilokok suşlarının çoğu tarafından üretilen çeşitli hücre tipleri üzerine etkili bir nötral sfingomiyelinazdır. Bu enzim sfingomyeline özgüllük gösterir ve eritrosit, fibroblast, lökosit ve makrofaj gibi birçok hücre tipine karşı toksik etkilidir. Hücreler, üzerinde bulunan sfingomiyelin miktarına bağlı olarak beta hemolizinle parçalanmaya karşı değişik duyarlılıklar gösterir. Grup B streptokoklar tarafından üretilen beta hemolizin CAMP faktörü ile birlikte grup B streptokokların tanımlanmasında kullanılan CAMP testindeki sinerjistik hemolizden sorumludur (21, 22).

2.5.3. Delta-hemolizin

S.aureus suşlarının %97'si KNS suşlarının %50-70 inde bulunur. Geniş spektrumlu bir sitolitik aktiviteye sahiptir. Toksin sürfaktana benzer etkiyle deterjan gibi davranarak hücre membranları üzerine toksik etki gösterir (21, 22).

2.5.4. Gama Hemolizin Ve Panton Valentine Lökosidin (PVL)

Çift bileşenli por oluşturan toksinlerdir. Gama hemolizin HlgA veya HlgC polipeptitlerinin S bileşenleri kombinasyonları ile HlgB F bileşeninden oluşur. PVL stafilokok suşları arasında lizojenik bakteriyofajlarla taşınır ve LukS ve LukF kombinasyonundan oluşur. Bu iki toksin, etkilenen hücrelerde degranülasyon, şişme ve lizis ortaya çıkarır. PVL toksini lökotoksik olmasına karşılık hemolitik etki göstermez. PVL hayvan lökositlerine karşı litik etkili olmasına karşın insan

enfeksiyonlarının patogenezindeki rolü aydınlatılamamıştır. PVL nin TK-MRSA nın neden olduğu cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları, osteomyelit ve nekrotizan pnömonide rolü olduğu düşünülmüş ve bununla ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır (21, 22).

2.6. Toksinler:

2.6.1 Eksfoliyatif Toksinler:

Eksfoliyatifler veya epidermolitik toksinler, *S.aureus* suşlarının %1-2'si tarafından üretilir ve her biri 24.000 Da molekül ağırlığında, ET-A ve ET-B olarak adlandırılan iki proteinden oluşur. Isıya dirençli ET-A (*eta*) geni kromozoma entegre bir bakteriyofaj tarafından taşınırken, ısıya duyarlı ET-B (*etb*) geni plazmid üzerinde taşınır. Süperantijen aktivitesine sahip bu toksinler, serin proteaz olup epidermisin stratum granulosum tabakasında hücreler arası bağlantıyı sağlayan desmoglein 1'i hedef alır. Stafilokokal haşlanmış deri sendromu, eksfoliyatif toksin tarafından oluşturulan eksfoliyatif dermatit tablosudur (21, 22).

2.6.2. Enterotoksinler

S.aureus da on sekiz farklı stafilokok enterotoksin (A-R) tanımlanmış olup, gıda zehirlenmelerine en sık neden olan toksin enterotoksin A dır. Enterotoksin B ise psödomembranöz enterokolite neden olmaktadır. Bu enterotoksinlerin etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, bağırsak peristaltizmini arttırdığı gösterilmiştir. Enterotoksinler, 100⁰C de 30 dk ısıtılmaya dayanıklıdır ve gastrik ve jejunal enzimlerin hidrolizine dirençlidirler. Bu nedenle gıda, enterotoksin üreten *S.aureus* suşu ile kontamine olmuşsa ve toksin üretilmişse, gıdanın orta düzeyde ısıtılması toksini etkisiz hale getirmeyecek ve 2-8 saat içerisinde kusmanın ön planda olduğu gastroenterit tablosuna neden olacaktır (22).

Enterotoksinler, *S.aureus* suşlarının %30-50' si tarafından yapılmaktadır. Toksin süperantijen özelliğinde olup, T hücre aktivasyonunu indükleyerek yoğun sitokin salımına neden olur. Tüm gastrointestinal sistemde inflamatuvar değişiklikler;

hiperemik mukoza, nötrofilik infiltratlar, mukopürülan duodenal eksuda, fırçamsı kenarlı epitel harabiyeti gibi meydana gelir (21, 22).

2.6.3. Toksik Şok Sendromu Toksini (TSST-1)

Toksik Şok Sendromu Toksini (TSST-1), ısıya ve proteazlara dirençli, kromozom tarafından kodlanan 22.000 Da ağırlığında bir ekzotoksindir. *İn vitro* ortamda TSST-1 in oluşturulması için yüksek oksijen konsantrasyonu ve nötral pH gerekmektedir. Bir süperantijen olan TSST-1 yoğun sitokin salınımına. Endotel hücrelerinde sızıntı ve sitotoksisiteye ne. Ayrıca TSST-1 komşu hücreleri geçerek dolaşıma geçer ve hızlı bir şekilde çoklu organ yetmezliği ve toksik şok sendromu tablosuna neden olur (21, 22).

2.7. Kapsüler polisakkaritler ve biyofilm oluşumu

S.aureus bakterisinin çoğunluğu, konak hücrelere ve prostetik maddelere yapışmasını sağlayan ve polimorfonükleer hücreler tarafından fagositozunu önleyen ekzopolisakkaritler üretmektedir. Bu ekzopolisakkaritler, *S.aureus* ile enfekte kalp pilleri, peritoneal kateterler, intravenöz kateterler gibi cansız yüzeylerde gösterilmiştir (22).

Bu güne kadar *S.aureus* suşlarında 13 kapsül serotipi belirlenmiştir. Kalın bir kapsüle sahip olan ve mukoid koloniler oluşturan serotip 1 ve 2 nadiren enfeksiyonlarla ilişkili iken, serotip 5 ve 8 insan enfeksiyonlarına en çok neden olan serotiplerdir. Klinik izolatların %10-20 sinde kapsül açısından tiplendirilemez. Bu suşlar tip 5 ve 8 genlerine sahiptir ancak bu genler eksprese edilmemiştir. Kapsül bakteriyi fagositozdan korur ayrıca komplemanın bağlanmasını da engellemektedir (21).

Biyofilm, canlı veya cansız bir yüzeye yapışarak bakteri tarafından üretilen ekzopolisakkarid matriks içine gömülü halde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluktur (3). Bakterileri çevre şartlarından koruyan biyofilm tabakası

oluşumunda, protein ve ekzopolisakkaritten oluşan hücre dışı matriks ve tutunma yüzeyi önemli rol oynar (100). Biyofilm yapısının %97'si su, %2-5'i mikroorganizma, %1-2'si polisakkarid, %1-2'si protein ve %1-2'si DNA ve iyonlardan oluşmaktadır(101). Stafilokoklarda biyofilm oluşumu dinamik bir süreç olup, iki aşamada gerçekleşmektedir. İlk aşamada bakteriler, konak doku ligandları ve katı yüzeyler gibi uygun yüzeylere, adeziv matriks moleküllerini tanıyan mikrobiyal yüzey komponentleri (MSCRAMM) ile tutunmayı gerçekleştirmektedir. İkinci aşamada ise, bakteriler diğer bakterilere tutunarak çok tabakalı biyofilmi oluşturmaktadır (1, 102).

Yapılan genomik ve proteomik çalışmalar, biyofilm gelişimi ile ilişkili pek çok genin varlığını göstermiştir. *S. aureus* da, *icaADBC* gen kümesinin biyofilm oluşumunda rolü olduğu gösterilmiştir. Bakterinin uygun yüzeylere yapışmasını sağlayan polisakkarit intersellüler adezin (PIA) molekülü, *icaADBC* operon ürünüdür ve bu tabaka ikinci aşamada hücreler arası iletişimi sağlar. *ÍcaA* ve *icaD* genlerinin *S. aureus* ve *S. epidermidis* suşlarının biyofilm oluşumunda önemli rolü bulunmaktadır (5). *ÍcaA* geni, biyofilm tabakasının ana maddesi olan N-asetil-beta-1-6-glukozamin (PNAG) oligomerlerinin sentezinde görevli N-asetilglukozamil transferaz enzimini kodlar (6, 7). *ÍcaD* geninin ise N-asetilglukozamil transferaz'ın maksimum ekspresyonunda rol oynadığı gösterilmiştir (6).

S.aureus'un konak matriks proteinlerine tutunmasını sağlayan adezyon proteinleri de bakterinin biofilm oluşumuna katkı sağlamaktadır. Alfa-enolaz, elastin bağlayıcı protein ve fibrinojen bağlayıcı protein gibi yüzey adezyon proteinlerini kodlayan genlerin (*eno*, *ebps*, *fib*) biyofilm oluşumu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (11).

Mikroorganizmalarda biyofilm oluşumunun tespitinde pek çok farklı in vitro yöntem ve deney hayvanlarında biyofilm enfeksiyonu oluşturulmasına dayalı in-vivo yöntemler kullanılmaktadır. Kongo kırmızılı agar yöntemi, modifiye tüp aderans yöntemi (Modifiye Christensen yöntemi), standart cam tüp yöntemi ve mikropalak kullanılan yöntemler biyofilm oluşumunun tespit edilmesinde en sık kullanılan yöntemlerdir (103).

Kongo kırmızısı agar methodu: Bu yöntemde Kongo kırmızısı agar (CRA) besiyeri beyin kalp infüzyon buyyonu (37 g/L), sükröz (50 g/L), agar (10 g/L) ve Kongo kırmızısı boyası (0.8 g/L) kullanılarak hazırlanır. İzolatların KKA besiyerine ekimleri yapılarak 37°C de 24-48 saat inkübasyon sonucu plaklar değerlendirilir. Siyah renkli koloni oluşturan izolatlar biyofilm üretimi için pozitif, şeffaf-kırmızı renkli koloni oluşturan izolatlar biyofilm üretimi negatif olarak değerlendirilir (104).

Standart cam tüp yöntemi: Biyofilm oluşumu araştırılacak olan mikroorganizma Triptik soy buyyon (TSB) besiyeri içeren cam tüplere inoküle edilip 37°C lik etüvde 24-48 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda tüp boşaltılarak metilen mavisi eklenir ve bir süre bekledikten sonra tüp içeriği tekrar boşaltılır. Tüpün iç kısmında boyalı bir tabaka varlığı biyofilm oluşumu açısından pozitif olarak değerlendirilir (105).

Modifiye tüp aderans yöntemi (Modifiye Christensen yöntemi): Glikozlu TSB besiyeri içeren tüplere bakteri süspansiyonu hazırlanıp 37°C de 24-48 saat inkübe edilir. Daha sonra tüpler boşaltılıp fosfatla tamponlanmış salin (PBS) ile yıkanır. Her tüpe eşit miktrada trypan blue, safranin veya kristal viyole koyularak karışması sağlanır. Bir süre bekletildikten sonra tüp içerisindeki boya dökülür. Boşalan tüpler kurutma kağıdı üzerinde ters çevrilir ve kurumaya bırakılır. Tüplerin iç kısmında renkli tabaka varlığı pozitif sonuç olarak değerlendirilir. Ayrıca rengin koyuluğu ve kalınlığına göre suşların biyofilm oluşturma kapasitesi çok güçlü, güçlü ve zayıf olarak değerlendirilebilmektedir. Renk değişiminin oluşmaması ise negatif sonuç olarak kabul edilir (106).

Spektrofotometrik mikroplak yöntemi: Bu yöntemde 96 kuyucuklu mikroplaklar kullanılmaktadır. TSB veya %1-3 glukoz içeren beyin-kalp infüzyon buyyon içeren mikroplak kuyucuklarına bakteri süspansiyonu inokule edilir ve uygun koşullarda inkübasyona bırakılır. Sonrasında mikroplaklar ters çevrilerek kuyucuk içeriği boşaltılır ve kuyucuklar PBS gibi bir yıkama solüsyonuyla yıkanır. Metanol ile biyofilmin fiksasyonu sağlandıktan sonra Safranin, trypan blue veya kristal viyole gibi bir boyayla boyanır. Boyanın biyofilme penetrasyonu için belirli bir süre beklenir ve sonra kuyucuklar boşaltılarak yeniden yıkama işlemi yapılarak biyofilm oluşturmayan bakterilerin uzaklaştırılması sağlanır. Bu işlemlerden sonra

mikroplaklar oda ısısında kurumaya bırakılır. Etanol, asetik asit veya aseton gibi ajanlarla muamele edilir ve spektrofotometrik ölçüm yapan mikroplak okuyucu cihazda belirli bir dalga boyunda ölçüm yapılarak, her bir kuyucuk için optik dansite değeri belirlenir.

Cihaz tarafından kaydedilen bu değerler, kontrol kuyucuklarının ortalama optik dansite değerleriyle karşılaştırılarak biyofilm oluşumunun varlığı ve derecesi saptanabilir (107).

Biyofilm içerisinde bulunan bakteriler antibiyotiklere, planktonik formlarına göre 100-10000 kat daha dirençlidir (108). Biyofilm tabakası mekanik ve fizikokimyasal özellikleri nedeniyle antibiyotiklerin düşük penetrasyonuna neden olarak antibiyotiğin bakteriye ulaşmasına engel olmaktadır. Ayrıca biyofilm katmanları içerisindeki oksijen yoğunluğu, pH farkları ve besin yoğunluğu gibi faktörlerde antibiyotiklerin etkinliği azalmakta ve antimikrobiyal direnç gelişebilmektedir. Bunların yanında biyofilm içindeki bakterilerin antibiyotiklere dirençli hâle gelmesinde, biyofilmin antibiyotik direnç genlerinin bakteriler arasında aktarım kolaylığı sağlaması önemli rol oynamaktadır (16, 109). Tıbbi cihaz ve biyomateryaller üzerinde ve konakçı epitelyum hücreleri ve mukozal yüzeylerde oluşabilen biyofilmler, kronik yara enfeksiyonları, kan dolaşımı enfeksiyonları, endokardit gibi pek çok farklı hastalıkta rol oynamaktadır (110). Çeşitli hastalıkların tedavisinde implantların, yapay kalp kapakçıklarının, protezlerin yaygın kullanımı ile birlikte biyofilm enfeksiyonlarının görülme sıklığında artış göstermiştir.

Kalıcı tıbbi cihazlarda gelişen biyofilm enfeksiyonlarında, etken mikroorganizma normal flora üyesi veya nozokomiyal bir patojen olabilmektedir (110, 111). Kullanılan tıbbi araç veya biyomateryalde biyofilm oluşumu, cihazda fonksiyon kaybının yanı sıra hasta için sürekli bir enfeksiyon kaynağı olma riski taşımaktadır. Bu durumda hastanın antibiyotikle tedavisi güç olmakta ve çoğu zaman tıbbi cihazın çıkarılması gerekmektedir (110, 112).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. İzolatlarının Toplanması Ve Saklanması

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda 2009-2013 yılları arasında ve 2020 yılında çeşitli klinik örneklerden (burun sürüntüsü, balgam, trakeal aspirat, kan kültürü, idrar, yara kültürü..vb) izole edilen 50 MSSA ve 50 MRSA izolatu rastgele seçilerek çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen bakteriler çalışma gününe kadar süt besiyeri (Conda, İspanya) içerisinde -80 C°de saklandı.

3.2. Mikrobiyolojik Kültür Ve Tanımlama İşlemleri

3.2.1. İzolatların Canlandırılması

Çalışmaya dahil edilen izolatlara ait stok bakteri kültürleri 37°C'lik etüvde 2 saat bekletilerek çözülmeleri sağlandı ve %5 koyun kanlı agar (KKA) plağına tek koloni düşürme yöntemi ile pasajları yapıldı. Besiyerleri 37°C'lik etüvde 18-24 saat inkübe edildi. Pasajları karışık olan bakteri kültürlerinin saf pasajları yapıp, geleneksel ve otomatize yöntemlerle *S. aureus* olarak tanımlanan bakteriler çalışmaya dahil edildi.

3.2.2. Bakteri Tanımlama Yöntemleri

Hastanemizde izolatların tanımlanması amacıyla kullanılan yöntemler yıllara göre değişmekle birlikte konvansiyonel ve otomatize yöntemler bir arada kullanılmaktadır.

3.2.2.1. Konvansiyonel Bakteri Tanımlama Yöntemleri

Hastanemiz mikrobiyoloji laboratuvarına gelen çeşitli klinik örneklerin (burun sürüntüsü, balgam, endotrakeal aspirat, kan kültürü, idrar, yara kültürü ve tüm steril vücut sıvısı örnekleri) %5 koyun kanlı agar (KKA) ve eosin-methylene blue agar (EMB) besiyerlerine, gerekli durumlarda Sabouraud dekstrozu agar (SDA) ve çikolata agar besiyerlerine ekimleri yapılmaktadır. Normal atmosferik şartlar altında 37°C’de 18-24 saatlik inkübasyon sonrasında KKA’da *S. aureus* kolonilerine benzeyen 1-4 mm çapında, parlak, sarı renkli, düzgün kenarlı kolonilere gram boyama yapılarak boyada mor renkli, üzüm salkımı şeklinde kümeler oluşturmuş kolonilere katalaz ve tüpte koagülaz testleri uygulanarak test sonucu pozitif çıkan bakteriler *S.aureus* olarak isimlendirilmektedir.

Katalaz Testi: Temiz bir lam üzerine %3’lük hidrojen peroksit (H_2O_2) ten bir damla alınır. *S.aureus* olduğu düşünülen kolonilerden steril öze yardımıyla alınarak H_2O_2 ile karıştırılır. Bu işlem sonrası katalaz enzimine sahip stafilokok kolonileri H_2O_2 ’yi su ve oksijene parçalar ve hava kabarcıkları gözlenir.

Koagülaz Testi: Katalaz testi pozitif bulunan kolonilere *S. aureus*’u diğer KNS lardan ayırmak için koagülaz testi yapılmaktadır. Stafilocoklarda bağlı ve serbest koagülaz olmak üzere iki tip koagülaz enzimi bulunmaktadır. Lam koagülaz testi ile sadece bağlı koagülaz (clumping factor) tespit edilebilirken tüp koagülaz testi ile hem serbest hem bağlı koagülaz tespit edilebilmektedir. Laboratuvarımızda *S.aures* u tanımlamak için tüp koagülaz testi kullanılmaktadır.

Tüp Koagülaz Testi: Bu test için steril deney tüpüne 1 ml sitratlı insan plazması koyulur, 1:5 oranında steril fizyolojik tuzlu su ile sulandırılır. Bir öze dolusu mikroorganizma test tüpündeki plazma içerisinde ezilerek emülsifiye edilir. 37°C’de 4 saat inkübe edilir. Dört saat sonra pıhtı oluşumu açısından gözlemlenir. Pıhtı oluşumu görülemezse gecikmiş reaksiyonun değerlendirilmesi için bir gece inkübasyona devam edilir.

3.2.2.2. Otomatize Bakteri Tanımlama Yöntemleri

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda bakteri identifikasyonu için yıllar içerisinde farklı otomatize sistemler kullanılmıştır. Çalışmaya dahil edilen izolatlar konvansiyonel yöntemlere ek olarak, 2009-2012 yılları arasında BD Phoenix System (Becton Dickinson, ABD), 2012-2013 yılları arasında Vitek 2 ID/AST (bioMerieux, Fransa) ve 2020 yılında Microscan Walkaway 96 plus (BC, ABD) otomatize bakteri tanımlama sistemleri ile tanımlanmıştır. Bu sistemler fermentasyon, oksidasyon, degradasyon ve çeşitli sübstratların hidrolizi gibi biyokimyasal yöntemlerle bakterileri tanımlamaktadır.

3.3. *S. Aureus* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

3.3.1. *S. Aureus* İzolatların Metisilin Direncinin Ve Glikopeptid Dışı Antibiyotikler İçin Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Kirby-Bauer Disk Difüzyon Testi Yöntemi İle Belirlenmesi

Çalışmamızda, *S. aureus* izolatlarının antibiyotik duyarlılık profilleri, vankomisin ve teikoplanin dışındaki antibiyotikler için Kirby-Bauer disk difüzyon testi yöntemi ile çalışıldı. İzolatlar SF içerisinde homojenize edilerek bulanıklıkları Microscan Nephelometer (BC, ABD) ile 0,5 McFarlanda ayarlandı. Daha sonra eküvyon ile Mueller-Hinton agar üzerine 4 yöne homojen şekilde yayıldı ve besiyeri yüzeyi kuruduktan sonra antibiyotik diskleri steril bir pens yardımıyla agar yüzeyine yerleştirildi. Antibiyotikler yerleştirilirken diskler arasında 22 mm, petri kenarından ise 14 mm uzaklık olmasına dikkat edildi. Daha sonra besiyerleri 18-24 saat süreyle 37°C sıcaklıkta normal atmosferik koşullar altında inkübe edildi.

İnkübasyon sonrasında antimikrobiyal disklerle ait zonlar, ışıkla aydınlatılmış odada EUCAST uluslararası antimikrobiyal duyarlılık rehberine göre değerlendirdi (75). Çalışmamızda kullanılan antimikrobiyal diskler, içerikleri ve markaları Tablo 1'de gösterilmektedir.

Metisilin direncinin belirlenmesinde EUCAST önerileri doğrultusunda Sefoksitin (30 µg) diski ile disk difüzyon testi uygulandı. Sefoksitin (30 µg) zon çapı

<22 mm olan izolatlar metisilin dirençli olarak belirlendi. iMLSB direncini değerlendirmek için, eritromisin ve klindamisin diskleri kenardan kenara mesafeleri 16 (12-20) mm olacak şekilde yerleştirildi ve inkübasyon sonunda eritromisin diskinin klindamisin diskine bakan yüzünde düzleşme olması (D zon fenomeni) pozitif olarak kabul edildi (75).

Tablo 1 Çalışmada kullanılan antibiyotikler, içeriği ve markası

Antimikrobiyal Adı	İçeriği	Markası	Antimikrobiyal Adı	İçeriği	Markası
Benzilpenisilin	1 Ü	Bioanalyse(Türkiye)	Eritromisin	15 µg	Bioanalyse(Türkiye)
Sefoksitin	30 µg	Bioanalyse(Türkiye)	Klindamisin	2 µg	Bioanalyse(Türkiye)
Gentamisin	10 µg	Bioanalyse(Türkiye)	Rifampisin	5 µg	Bioanalyse(Türkiye)
Amikasin	30 µg	Bioanalyse(Türkiye)	Seftarolin	5 µg	Bioanalyse(Türkiye)
Kloramfenikol	30 µg	Bioanalyse(Türkiye)	Tetrasiklin	30 µg	Bioanalyse(Türkiye)
Siprofloksasin	5 µg	Bioanalyse(Türkiye)	Trimetoprim-sülfametoksazol	25 µg*	Bioanalyse(Türkiye)
Levofloksasin	5 µg	Bioanalyse(Türkiye)			
Linezolid	10 µg	Bioanalyse(Türkiye)			

*1,25/23,75µg

3.3.2. *S.Aureus* İzolatlarının Glikopeptid Duyarlılıklarının Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi İle Tespiti

S.aureus izolatlarının vankomisin ve teikoplanin için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin belirlenmesinde, EUCAST önerileri doğrultusunda sıvı mikrodilüsyon yöntemi yapıldı. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi, 96'lık mikropaklarda katyon katkılı Mueller Hinton Broth "CA-MHB" (Conda, İspanya) ile vankomisin (Sigma-Aldrich, ABD) ve teikoplanin (Carbosynth, İngiltere) toz antibiyotikleri kullanılarak çalışıldı. Vankomisin ve teikoplanin stok çözeltileri ml distile su içinde 640 µg (640 µg/ml) olacak şekilde hazırlandı. Stok çözeltilerden 1 ml ve CA-MHB den 9 ml alınarak stok çözelti 1:10 seyreltildi (64

$\mu\text{g/ml}$). Kullanılmayan stok antibiyotik çözeltisi -20°C 'ye kaldırıldı. Daha sonra aynı gün içerisinde ml sinde $64 \mu\text{g}$ antibiyotik içeren ($64 \mu\text{g/ml}$) çözeltiden CA-MHB ile iki katlık ara sulandırılar yapıldı. İlgili antimikrobiyal konsantrasyonundan $100 \mu\text{l}$ alınarak 96'lık mikropalakların her kuyucuğuna 8'li pipet (Corning, ABD) yardımıyla pipetlendi. Hazırlanan plaklar 100 bakteri izolatının canlandırma işlemi tamamlanana kadar -20°C 'de bekletildi. *S.aureus* izolatları stok besiyerinden KKA'a pasajlanıp, $35\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'de 1 gece inkübe edildi. Bakterilerin Beckman Coulter TurbidityMeter (MS, ABD) ile $0,5$ McFarland bulanıklıkta ($1,5 \times 10^8$ koloni oluşturan birim; KOB/ml) süspansiyonları hazırlandı. Bu karışım $1/10$ dilüe edilerek 10^7 KOB/ ml bakteri konsantrasyonu elde edildi. Kuyucuklardaki $100 \mu\text{l}$ antimikrobiyal çözeltisi içerisinde $5 \mu\text{l}$ bakteri süspansiyonundan pipetlendi ve kuyucuklardaki son bakteri konsantrasyonu 5×10^5 KBO/ml elde edildi. Mikropalaklar aerob koşullarda, 24 saat boyunca 35°C 'de inkübe edildi. Gözle görülür üremenin inhibe olduğu en düşük antimikrobiyal konsantrasyon değeri, MİK değeri olarak belirlendi. *S.aures* izolatlarının vankomisin ve teikoplanine duyarlılık kategorileri EUCAST'da belirtilen klinik duyarlılık sınır değerlerine göre belirlendi (75). Vankomisin ve teikoplanin için $\text{MİK} \leq 2 \mu\text{g/ml}$ bulunan izolatlar duyarlı olarak kabul edildi.

3.4. *S.Aureus* İzolatlarında Teikoplanin Tarama Agar Yöntemi İle hVISA Taranması:

hVISA taramasında EUCAST önerileri doğrultusunda 5 mg/L teikoplanin içeren Mueller Hinton plağı kullanıldı. 2.0 McFarland standarda eşit inokulum elde etmek için bakteri kolonileri $\%0.9$ serum fizyolojik içinde süspanse edildi. Bu inokulumdan $10 \mu\text{l}$ agar yüzeyine bir nokta şeklinde aktarıldı ve plak normal atmosferde 35°C 'de 48 saat inkübe edildi. 48 saat sonunda plaklarda üreme görülmesi azalmış glikopeptid duyarlılığı şüphesini uyandırdı. Çalışmada pozitif kontrol olarak *S.aureus* ATCC 700698 (Mu3) (hVISA) ve *S.aureus* ATCC 700699 (Mu50) (VISA) suşları, negatif kontrol olarak *S.aureus* ATCC 29213 suşu kullanıldı.

3.5. *S.Aureus* İzolatlarında Populasyon Profili Analizi-Eğri Altında Kalan Alan (Population Profile Analysis-Area Under The Curve; PAP-AUC) Yöntemi İle hVISA Varlığı Araştırılması

Teikoplanin tarama agar yöntemi ile hVISA şüpheli tespit edilen *S.aureus* izolatlarına hVISA varlığını doğrulamak için Wootton ve ark.nın uyguladığı şekliyle PAP-AUC yöntemi uygulandı.(113) İzolatların 0,5 McFarland'a eşdeğer bulanıklıkta süspansiyonları hazırlandı ($1,5 \times 10^8$ KOB/ml). Bu süspansiyon steril distile su içinde sulandırılarak 10^3 ve 10^6 'lık konsantrasyonlar elde edildi. Her izolat için hazırlanan bu 3 sulandırımından 100 µl alınarak 0; 0,5; 1; 2; 2,5; 4 ve 8 mg/L vankomisin içeren beyin-kalp infüzyon (BKİ) agara ekilerek normal atmosferik koşullarda 35 °C'de 48 saat inkübe edildi. 48 saat inkübasyon sonrasında plaklar üreme açısından değerlendirildi. Plaklarda her bir antibiyotik konsantrasyonu için üreme tespit edilen koloni sayısının logaritması göz önünde bulundurularak grafikler çizildi. Bu işlem hVISA kontrol kökeni Mu3 (ATCC 700698) ve MSSA kontrol kökeni ATCC 29213 içinde uygulandı. Grafikte her suş için elde edilen eğri altında kalan alan Microsoft 36 Excel 2016 MSO (Microsoft Office Professional Plus 2016, ABD) programı ile hesaplandı. Daha sonra her bir suşun eğri altında kalan alan (AUC) değeri, Mu3 kontrol suşunun AUC değerine oranlandı. Bu oran ≤ 0.90 ise VSSA, 0.90-1.3 ise hVISA, ≥ 1.3 ise VISA olarak kabul edildi.

3.6. *S. Aureus* İzolatlarında Biyofilm Oluşumunun Araştırılması

3.6.1. Biyofilm Oluşumunun Kongo Kırmızısı Agar (CRA) Metodu İle Fenotipik Olarak İncelenmesi:

Çalışmamızda *S.aureus* izolatlarının biyofilm oluşumunun fenotipik tespitinde Freeman ve ark. tarafından tanımlanan yöntem kullanıldı (104). Kongo Kırmızısı Agar (CRA) besiyeri; beyin kalp infüzyon buyyonu (Conda, İspanya) (37 g/L), sükroz (Isolab, Türkiye) (50 g/L), agar (10 g/L) ve Kongo kırmızısı boyası (CDH, Hindistan) (0.8 g/L) ile hazırlandı. Kongo kırmızısı boyası konsantre bir şekilde ayrı olarak hazırlandı ve her iki karışım otoklavda 121°C' de 15 dk steril

edildi. Besiyeri 55°C'ye soğutulduktan sonra Kongo kırmızısı boyası solüsyonu eklendi. Steril plastik petrilere dökülen besiyeri taze olarak kullanıldı.

İzolatların CRA besiyerine tek koloni düşürme tekniği ile ekimleri yapılarak 37°C'de 1 gece inkübasyon sonucu plaklar değerlendirildi. Siyah renkli koloni oluşturan izolatlar biyofilm üretimi için pozitif, şeffaf-kırmızı renkli koloniler biyofilm üretimi negatif ve bordo renkli koloni oluşturan izolatlar sınırda(borderline) biyofilm üreticisi olarak değerlendirildi (114). Pozitif kontrol olarak *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, negatif kontrol olarak *S.epidermidis* ATCC 12228 suşları kullanıldı.

3.6.2 S.Aureus İzolatlarında Biyofilm Oluşumunun Moleküler Yöntemlerle İncelenmesi :

S.aureus izolatlarında biyofilm oluşundan sorumlu *icaA*, *icaD*, *IS256* ve *eno* gen bölgeleri polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile araştırıldı.

3.6.2.1 S.aureus İzolatlarından DNA elde edilmesi:

Stok besiyerinden canlandırılan izolatların koyun kanlı agar (KKA) besiyerine ekimleri yapılarak normal atmosferik şartlar altında 37°C' de 18-24 saat inkübe edildi. İzolatların DNA ekstraksiyonu, High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Almanya) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı.

3.6.2.2 PZR ile IS256 ve eno gen bölgelerinin araştırılması:

Eno gen bölgesinin araştırılması için Vancraeynest ve ark. nın kullandığı primer dizisi ve bağlanma ısısı, *IS256* gen bölgesi araştırılması için Montanaro ve ark. nın kullandığı primer dizisi ve bağlanma ısısı kullanılarak 2 gen bölgesinin araştırılması için multipleks PZR yöntemi uygulandı (1, 18).

Çalışmamızda *IS256* ve *eno* gen bölgeleri içeren 50. izolat sekans analizi ile doğrulanarak pozitif kontrol suşu olarak belirlendi. Kullanılan primer dizileri ve

bağlanma ısıları Tablo 2’de, PZR protokolü için gerekli reaksiyon karışımı Tablo 3’te, PZR döngü koşulları Tablo 4’te gösterilmektedir.

Tablo 2 *IS256* ve *eno* genleri primer dizisi, bağlanma ısısı, ampikon büyüklüğü ve referans

Hedef gen	Primer dizisi	PZR bağlanma ısısı (°C)	Ampikon büyüklüğü (bp)	Referans
<i>IS256</i>	5'-TGA AAA GCGAAG AGA TTC AAAGC-3' 5'-ATG TAG GTC CAT AAG AAC GGC-3'	55	1102	Vancraeynest ve ark. (1)
<i>eno</i>	5'-ACGTGCAGCAGCTGACT-3' 5'-CAACAGCATYCTTCAGTACCTTC-3'	55	302	Montanaro ve ark. (18)

Tablo 3 *IS256* ve *eno* genleri PZR protokolü için reaksiyon karışımı

Bileşen	Miktar
2X HS Mastermix Clear/ Gold	25 µl
<i>IS256</i> -F	1 µl
<i>IS256</i> -R	1 µl
<i>eno</i> -F	1 µl
<i>eno</i> -R	1 µl
DNA	1 µl
H ₂ O	20 µl
Toplam hacim	50 µl

Tablo 4 *IS256* ve *eno* genleri için PZR döngü koşulları

Reaksiyon basamağı	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk denatürasyon	94.0	3 dk	1
Denatürasyon	94.0	30 sn	35
Bağlanma	55.0	30 sn	35
Uzama	72.0	1 dk	35
Son uzama	72.0	10 dk	1

3.6.2.3 PZR ile *icaA* ve *icaD* gen bölgelerinin araştırılması:

İzolatların *icaA* ve *icaD* gen bölgelerinin araştırılması için, Vasudevan ve ark. kullandığı yöntem (115). modifiye edilerek her iki gen bölgesi için monopleks PZR yöntemi uygulandı. Çalışmamızda *icaA* ve *icaD* gen bölgelerine sahip 5 numaralı izolat sekans analizi ile doğrularak pozitif kontrol suşu olarak belirlendi. Negatif kontrol olarak *S.epidermidis* ATCC 12228 suşu kullanıldı.

Çalışmada kullanılan primer dizileri ve bağlanma ısıları Tablo 5’de, PZR protokolü için gerekli reaksiyon karışımı Tablo 6 ve 7’de, PZR döngü koşulları Tablo 8’de gösterilmektedir.

Tablo 5 *icaA* ve *icaD* genleri primer dizisi, bağlanma ısısı ve ampikon büyüklüğü

Hedef gen	Primer dizisi	PZR bağlanma ısısı (°C)	Ampikon büyüklüğü
<i>icaA</i>	5’-CCTAACTAACGAAAGGTAG-3’ 5’-AAGATATAGCGATAAGTGC-3’	57.8	1315 bç
<i>icaD</i>	5’-AAACGTAAGAGAGGTGG-3’ 5’-GGCAATATGATCAAGATAC-3’	57.8	381 bç

Tablo 6 *icaA* geni PZR protokolü için reaksiyon karışımı

Bileşen	Miktar
2X HS Mastermix Clear/Gold	25 µl
<i>icaA</i> -F	1 µl
<i>icaA</i> -R	1 µl
DNA	1 µl
H ₂ O	32 µl
Toplam hacim	50 µl

Tablo 7 *icaD* geni PZR protokolü için reaksiyon karışımı

Bileşen	Miktar
2X HS Mastermix Clear/ Gold	25 µl
<i>icaD</i> -F	1 µl
<i>icaD</i> -R	1 µl
DNA	1 µl
H ₂ O	32 µl
Toplam hacim	50 µl

Tablo 8 *icaA* ve *icaD* genleri için PZR döngü koşulları

Reaksiyon basamağı	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
İlk denatürasyon	94.0	3 dk	1
Denatürasyon	94.0	30 sn	35
Bağlanma	57.8	30 sn	35
Uzama	72.0	1 dk	35
Son uzama	72.0	10 dk	1

3.6.2.4 Elde Edilen PZR Ürünlerinin Jel Elektroforezi İle Görüntülenmesi:

icaA, *icaD*, *IS256* ve *eno* genlerinin araştırılması için yapılan PZR sonrası elde edilen ürünler %1,5'lik agaroz jelde değerlendirildi. Agaroz jel için 150 ml 1X Tris-Borate-EDTA (TBE) (A.B.T, Türkiye) içerisine 1,5 gram (gr) moleküler grade agaroz (GeneOn, Almanya) eklenerek mikrodalga fırında ara ara hafifçe karıştırılıp berraklaşınca kadar eritildi. Agaroz jel oda sıcaklığında 45-50°C'ye soğuduktan sonra %5'lik etidyum bromid (Sigma-Aldrich, ABD) stok solüsyonundan 30 µl ilave edilerek karıştırıldı. Jel tabağına uygun taraklar yerleştirildikten sonra hazırlanan agaroz jel döküldü. Jel donduktan sonra taraklar çekildi ve jel, tabağıyla birlikte elektroforez tankı içerisine (Sigma-Aldrich, ABD) yerleştirildi. Tank 1X TBE tampon çözeltisiyle jelin üstünü hafifçe geçecek şekilde dolduruldu. İlk ve son kuyucuklara amplifikasyon ürünlerinin büyüklüklerinin değerlendirebilmek için 10µl 100 bp DNA ladder (Geneall, Kore) yerleştirildi. Diğer kuyucuklara 10 µl PZR ürünlerinden yerleştirildi. 2,5 saat 80 V elektrik akımında elektroforez işlemi

uygulandıktan sonra, 312 nm’de UV transillüminatör (Sigma-Aldrich, ABD) ile değerlendirildi. Elde edilen bantlar fotoğraf makinesi ile görüntüledi.

3.7 İstatistiksel Metod:

Bulguların istatistiksel analizi Ki-Kare (Chi-square) testi ve Student’s t testi ile yapıldı. Her iki test için de $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.BULGULAR

4.1. Çalışmaya Dahil Edilen *S.Aureus* İzolatlarının Özellikleri:

Çalışmamıza, Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Hastanesi bünyesindeki çeşitli poliklinik, servis ve yoğun bakım ünitelerinden 2009-2013 yılları arası ve 2020 yılında gönderilen burun sürüntüsü, balgam, endotrakeal aspirat, bronkoalveolar lavaj, püy ve yara yeri örnekleri, idrar ve kan kültürü örneklerinden, hastanemiz mikrobiyoloji laboratuvarında izole edilen 50 adet metisilin dirençli *S.aureus* (MRSA) ve 50 adet metisilin duyarlı *S.aureus* (MSSA) izolatu dahil edildi. İzolatların yıllara göre dağılımı Tabla 9’da, gönderilen bölümler Tablo’10 da ve *S.aureus* suşlarının izole edildiği örnek türü Tablo’11 de gösterilmektedir.

Tablo 9 Çalışmaya dahil edilen *S. aureus* izolatlarının yıllara göre dağılımı

Yıllar	İzolat Sayısı MRSA	İzolat Sayısı MSSA	İzolat Sayısı Toplam n (%)
2009	11	11	22 (22)
2010	21	2	23 (23)
2011	7	17	24 (24)
2012	5	8	13 (13)
2013	4	4	8 (8)
2020	2	8	10 (10)
Toplam	50	50	100 (100)

MRSA: metisilin dirençli *S.aureus*, MSSA: metisilin duyarlı *S.aureus*

Tablo 10 Örneklerin gönderildiği bölümler

Bölüm	İzolat Sayısı MRSA	İzolat Sayısı MSSA	Toplam n (%)
Poliklinik	7	15	22 (22)
Servis	24	29	53 (53)
Yoğun Bakım	19	6	25 (25)
Toplam	50	50	100 (100)

MRSA: metisilin dirençli *S.aureus*, MSSA: metisilin duyarlı *S.aureus*

Tablo 11 Bakterilerin izole edildiği örnek türü

Örnek Türü	İzolat Sayısı MRSA	İzolat Sayısı MSSA	Toplam n (%)
Burun sürüntüsü	1	0	1 (1)
Balgam	9	2	11 (11)
Endotrakeal aspirat	7	1	8 (8)
Bronkoalveolar lavaj	0	1	1 (1)
Püvy	9	10	19 (19)
Yara Yeri	14	17	31 (31)
İdrar	1	4	5 (5)
Kan Kültürü	9	15	24 (24)
Toplam	50	50	100 (100)

MRSA: metisilin dirençli *S.aureus*, MSSA: metisilin duyarlı *S.aureus*

4.2. İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları:

S.aureus izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları EUCAST uluslararası standartlarına göre değerlendirildi (75).

İzolatların metisilin direnci EUCAST önerileri doğrultusunda 30 µg'lık sefoksitin diski kullanılarak belirlendi. Zon çapı <22 mm olan izolatlar metisilin dirençli *S.aureus* (MRSA) olarak değerlendirildi. İzolatların Kirby-Bauer DDT yöntemi ile elde edilen sonuçları Tablo 12' de gösterilmektedir.

Tablo 12 Çalışmaya dahil edilen *S. aureus* izolatların antibiyotik direnç profili

Antibiyotik	MRSA Dirençli (n=50) n (%)	MSSA Dirençli (n=50) n (%)	TOPLAM (n=100) n (%)
Penisilin	50 (100)	37 (74)	87 (87)
Eritromisin	30 (60)	8 (16)	38 (38)
Klindamisin	27 (54)	5 (10)	32 (32)
İMLSB	26 (52)	3 (6)	29 (29)
Levofloksasin	40 (80)	2 (4)	42 (42)
Siprofloksasin	40 (80)	4 (8)	44 (44)
Tetrasiklin	43 (86)	8 (16)	51 (51)
Linezolid	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Rifampisin	36 (72)	0 (0)	36 (36)
Gentamisin	32 (64)	3 (6)	35 (35)
Amikasin	32 (64)	3 (6)	35 (35)
Kloramfenikol	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Trimetoprim- sulfametaksazol	5 (10)	1 (2)	6 (6)
Seftarolin	20 (40)	0(0)	20 (20)

MRSA: metisilin dirençli *S.aureus*, MSSA: metisilin duyarlı *S.aureus*

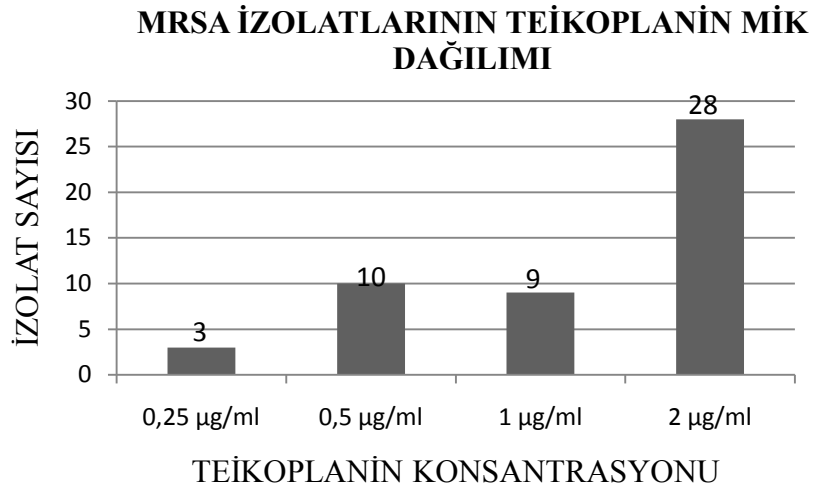
Çalışmamızda linezolid ve kloramfenikole dirençli izolat bulunmadı. MSSA izolatlarında penisilin direnci %74 dür. Çalışmaya dahil edilen *S.aureus* izolatlarında tetrasikline %51, siprofloksasine %44, levofloksasine %42, eritromisine %38, rifampisine %36, gentamisine %35, amikasinine %35, klindamisine %32, seftaroline %20 ve Trimetoprim-sulfametaksazole %6 oranında direnç görüldü. İzolatların D zon test yöntemi ile iMLSB direnci % 29 olarak tespit edildi.

S.aureus izolatlarının glikopeptid antibiyotikler için Minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri EUCAST önerileri doğrultusunda, 2 µg/ml ve altı

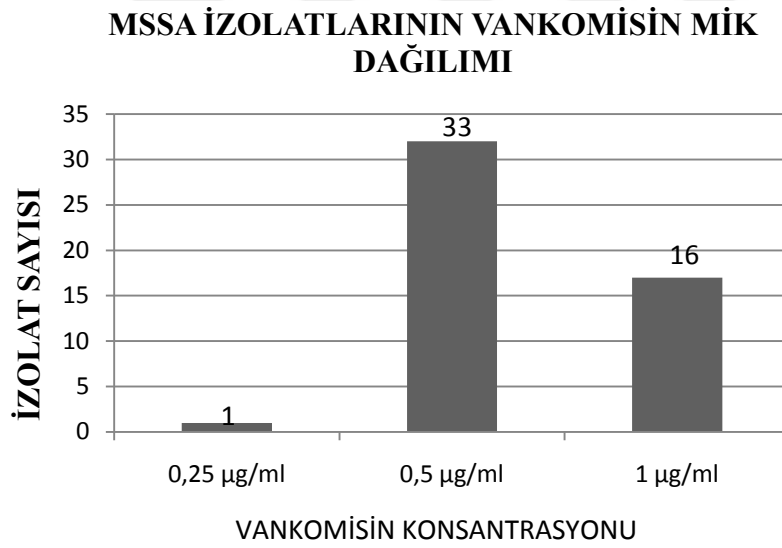
“duyarlı” olacak şekilde değerlendirildi (75). Bu sınır değerler ile çalışmadaki MRSA izolatları vankomisin 0,5-1 µg/ml ve teikoplanine 0,25-2 µg/ml MİK aralıklarında ve MSSA izolatları vankomisin 0,25-1 µg/ml ve teikoplanine 0,125- 1 µg/ml MİK aralıklarında duyarlı bulunurken, dirençli izolat bulunmadı. MRSA ve MSSA izolatlarının vankomisin ve teikoplanin için MİK değeri dağılımları sırasıyla Şekil 1, 2, 3, 4’ de gösterilmektedir.



Şekil 1 MRSA izolatlarının vankomisin MİK dağılımı

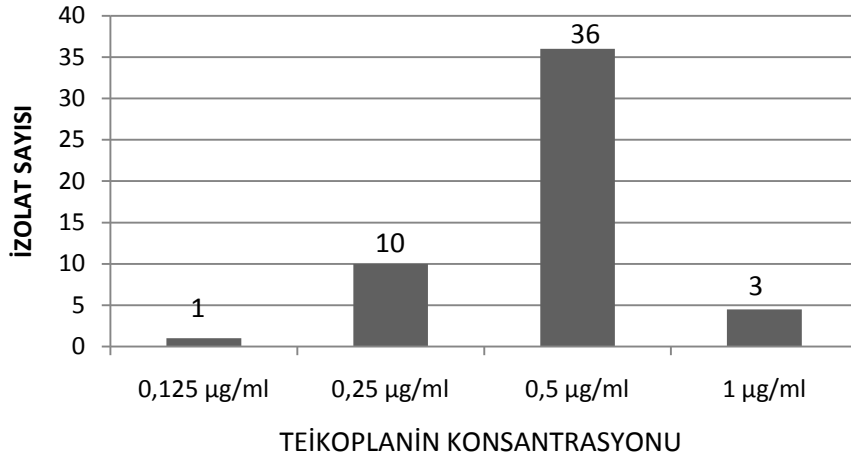


Şekil 2 MRSA izolatlarının teikoplanin MİK dağılımı



Şekil 3 MSSA izolatlarının vankomisin MİK dağılımı

MSSA İZOLATLARININ TEİKOPLANİN MİK DAĞILIMI



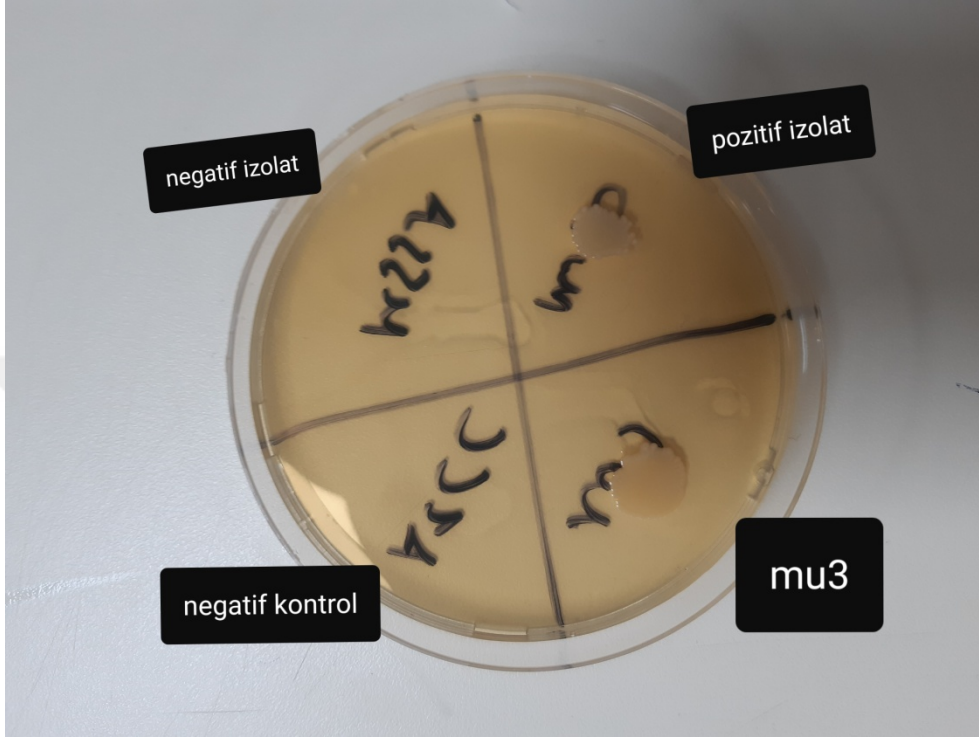
Şekil 4 MSSA izolatlarının teikoplanin MİK dağılımı

Çalışmamızda *S.aureus* izolatlarının vankomisin için MİK50 (izolatların %50 sini inhibe eden antibiyotik konsantrasyonu) ve MİK90 (izolatların %90 ını inhibe eden antibiyotik konsantrasyonu) değeri 1 µg/ml olarak bulundu. Teikoplanin için MİK50 değeri 0,5 µg/ml iken MİK90 değeri 2 µg/ml olarak bulundu.

4.3. İzolatların hVISA tarama bulguları:

Çalışmamıza dahil ettiğimiz 100 *S.aureus* izolatına EUCAST önerileri doğrultusunda 5 mg/L teikoplanin içeren Müller Hinton tarama yöntemi uygulandı. 48 saatlik inkübasyon sonrası 11 MRSA ve 7 MSSA izolatı hVISA şüpheli olarak değerlendirildi. Yöntem için pozitif kontrol olarak *S.aureus* ATCC 700698 (Mu3) (hVISA) ve *S.aureus* ATCC 700699 (Mu50) (VISA) suşları, negatif kontrol olarak *S.aureus* ATCC 29213 suşu kullanıldı. Mu3 pozitif kontrol suşu, *S.aureus* ATCC 29213 negatif kontrol suşu negatif ve pozitif izolatlara ait teikoplanin tarama agar görüntüsü Şekil 5’de gösterilmiştir.

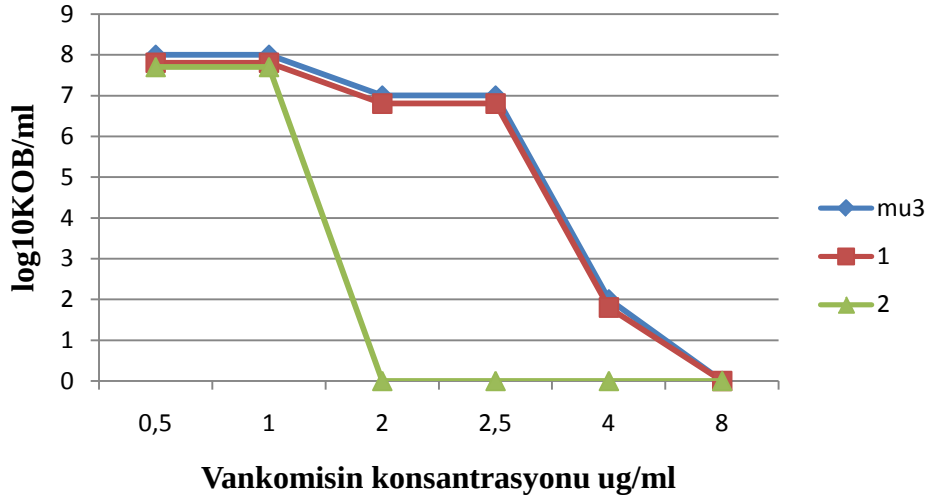
Tarama ile hVISA şüpheli bulunan izolatlara eğri altında kalan alan-populasyon profili analizi (PAP-AUC) yöntemi uygulandı.



Şekil 5 Mu3 pozitif kontrol suşu, *S.aureus* ATCC 29213 negatif kontrol suşu, negatif ve pozitif izolatlara ait teikoplanin tarama agar görüntüsü.

4.4. PAP-AUC Çalışması Bulguları:

hVISA varlığını doğrulamak için tarama ile pozitif bulunan 18 izolata referans yöntem olan PAP-AUC yapıldı ve her bir izolat için elde edilen grafiklerdeki eğri altında kalan alan, Mu3 (ATCC700698) hVISA standart suşunun grafiğinden elde edilen eğri altında kalan alana oranlandı. Bu oran $\geq 0,9$ olan ikisi MRSA ve ikisi MSSA olmak üzere toplam 4 *S.aureus* izolatu hVISA olarak değerlendirildi. En düşük PAP-AUC alanına sahip izolat (2 numaralı), en yüksek PAP-AUC alanına sahip izolat (1 numaralı) ve mu3 pozitif kontrol suşuna ait PAP-AUC grafiği Şekil 6’da gösterilmektedir.



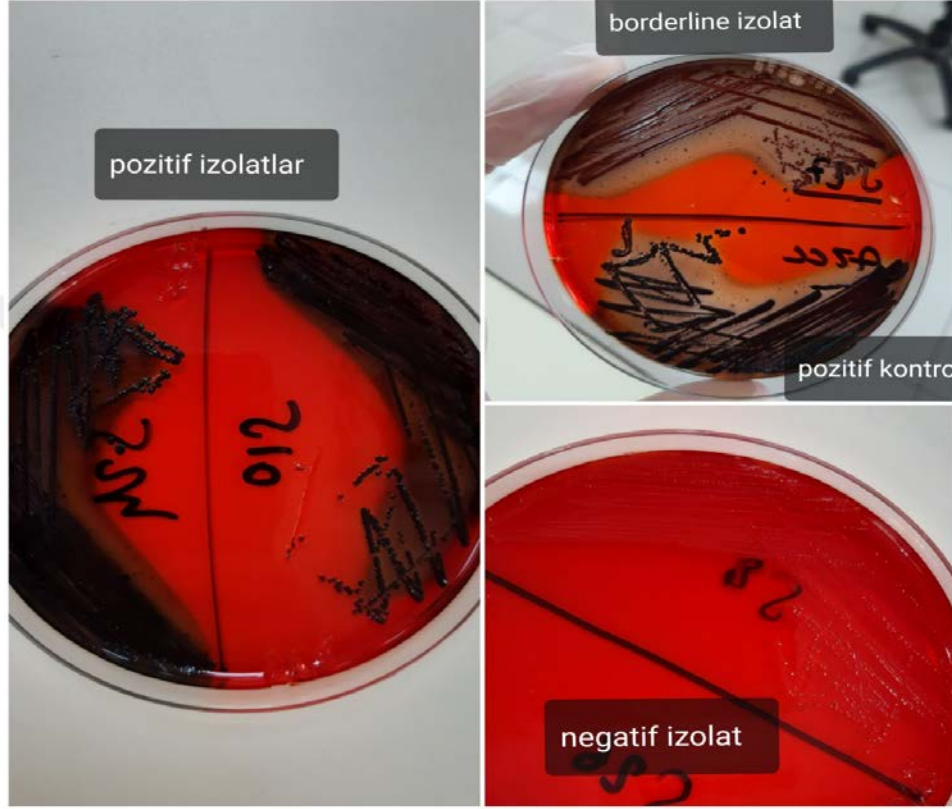
Şekil 6 En düşük PAP-AUC alanına sahip izolat (2 numara), en yüksek PAP-AUC alanına sahip izolat (1 numara) ve mu3 pozitif kontrol suşuna ait PAP-AUC grafiği

4.5. Kongo Kırmızısı Agar (CRA) Metodu Bulguları:

CRA besiyerine tek koloni düşürme tekniği ile ekimleri yapılan izolatlar 37 °C’de 1 gecelik inkübasyon sonrası biyofilm üretimi açısından incelendi. Siyah renkli koloni oluşturan izolatlar biyofilm üretimi için pozitif, şeffaf-kırmızı renkli koloniler biyofilm üretimi negatif ve bordo renkli koloni oluşturan izolatlar sınırda (borderline) biyofilm üreticisi olarak değerlendirildi (114). İzolatların KKA besiyerindeki görüntüleri Şekil 7’de ve biyofilm üretimi oranları Tablo 13’de gösterilmiştir.

Çalışmamıza dahil ettiğimiz *S.aureus* izolatlarının, CRA metodu ile %98’inde (98/100) biyofilm üretimi tespit edildi. Biyofilm üreten 98 izolatın 50’si (%51) MRSA ve 48’i (%49) MSSA idi. Biyofilm üreticileri arasında 5 izolat borderline biyofilm üreticisi olarak değerlendirildi. Bunlardan 1’i MRSA, diğer 4’ü MSSA idi. İki izolatta (%2) ise biyofilm üretimine rastlanmadı. Biyofilm oluşturmayan 2 izolat MSSA idi. Biyofilm oluşturmayan izolatlardan biri (S8 numara) 2009 yılında bir servis hastasının püy örneğinden izole edilmişti. Biyofilm oluşturmayan diğer izolat

ise (S18 numara) 2011 yılında bir yine bir servis hastasının yara kültüründen izole edilmişti. Kongo kırmızı agar metodu ile MRSA ve MSSA izolatları arasında biyofilm oluşumu açısından anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$).



Şekil 7 CRA besiyerinde biyofilm üretimi pozitif, borderline ve negatif izolatların görüntüleri

Tablo 13 CRA besiyerinde biyofilm üretimi bulguları

KKA metodu sonucu	MRSA (n=50) N (%)	MSSA (n=50) N (%)	TOPLAM (n=100) n (%)
Pozitif	49 (98)	44 (88)	93 (93)
Borderline	1 (2)	4 (8)	5 (5)
Negatif	0 (0)	2 (4)	2 (2)

MRSA: metisilin dirençli *S.aureus*, MSSA: metisilin duyarlı *S.aureus*

4.6. CRA Metodu İle Biyofilm Üretme Durumu Belirlenen İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Profillerinin İncelenmesi:

CRA besiyerinde biyofilm oluşturmayan 2 izolat penisilin dışında diğer antibiyotiklere duyarlı bulundu. Biyofilm üretmeyen izolatların antibiyotik duyarlılık profili Tablo 14’de gösterilmektedir.

Borderline biyofilm oluşturan 5 izolatın 2’si test edilen tüm antibiyotiklere duyarlıydı. Diğer 3 izolattan 2’si penisilin dışında tüm antibiyotiklere duyarlı bulunurken, 1 izolat MRSA idi ve penisilin, tetrasiklin ve trimetoprim-sulfametaksol dirençli diğer antibiyotiklere duyarlıydı. Bordine biyofilm üretimi gözlenen izolatların antibiyotik duyarlılık profili Tablo 15’te gösterilmektedir.

CRA besiyerinde biyofilm üretimi tespit edilen 98 izolatın (pozitif + borderline) antibiyotik direnci: Penisilin % 86,7, tetrasiklin % 52, siprofloksasin % 44,8, levofloksasin %42,8, eritromisin %38,7, rifampin 36,7, amikasin ve gentamisin %35,7, klindamisin %32,6 ve SXT % 6,1 olarak bulundu. İzolatların % 51’i MRSA idi. Vankomisin, teikoplanin, kloramfenikol ve linezolid dirençli izolat bulunmadı. Biyofilm üreten izolatların antibiyotik direnç profili Tablo 16’da gösterilmektedir.

Tablo 14 Biyofilm üretmeyen izolatların antibiyotik duyarlılık profili

İZOLAT NUMARASI	P	FOX T	AK	CN	CIP	LEV	DA	E	TE	LNZ	RA	SXT	CPT	VA	TEC	CRA
S8	R	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N
S18	R	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	N

P: penisilin, FOX T: sefoksitin tarama, AK: amikasin, CN: gentamisin, CIP: siprofloksasin, LEV: levofloksasin, DA: klindamisin, E: eritromisin, TE: tetrasiklin, LNZ: linezolid, RA: rifampisin, SXT: trimetoprim-sulfametaksazol, CPT: seftarolin, CRA: Kongo kırmızısı agar , N: negatif

Tablo 15 Borderline biyofilm üreten izolatların antibiyotik duyarlılık profili

İZOLAT NUMARASI	P	FOX T	AK	CN	CIP	LEV	DA	E	TE	LNZ	RA	SXT	CPT	VA	TEC	CRA
S34	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	B
S44	R	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	B
S50	R	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	B
S27	S	-	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	B
48	R	+	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	B

P: penisilin, FOX T: sefoksitin tarama, AK: amikasin, CN: gentamisin, CIP: siprofloksasin, LEV: levofloksasin, DA: klindamisin, E: eritromisin, TE: tetrasiklin, LNZ: linezolid, RA: rifampisin, SXT: trimetoprim-sulfametaksazol, CPT: seftarolin, CRA: Kongo kırmızısı agar, B: borderline

Tablo 16 Biyofilm üreten izolatların antibiyotik direnç profili

İZOLAT SAYISI	P R %	FOX T %	AK R %	CN R %	E R %	DA R %	LEV R %	CIP R %	TE R %	RA R %	SXT R %	CRA
N=98	86,7	51	35,7	35,7	38,7	32,6	42,8	44,8	52	36,7	6,1	POZ /B

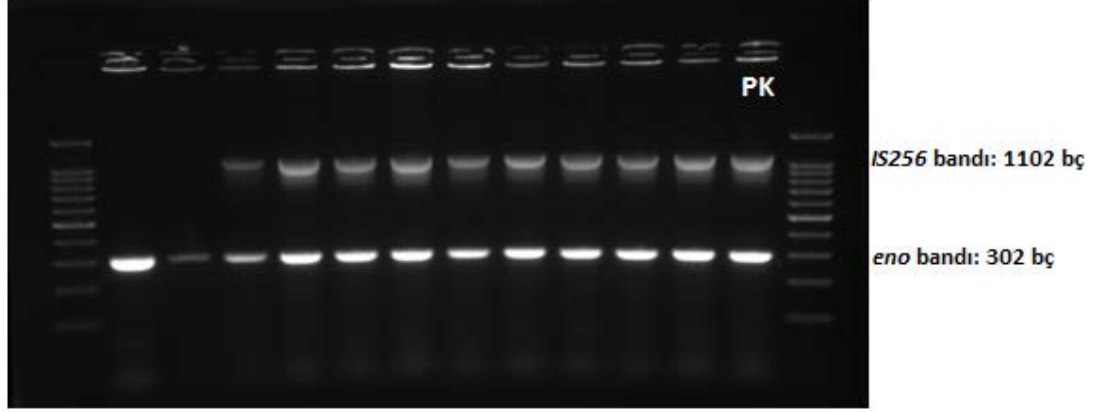
P R: penisilin direnci, FOX T: sefoksitin tarama, AK R: amikasin direnci, CN R: gentamisin direnci, CIP R: siprofloksasin direnci, LEV R: levofloksasin direnci, DA R: klindamisin direnci, E R: eritromisin direnci, TE R: tetrasiklin direnci, RA R: rifampisin direnci, SXT R: trimetoprim-sulfametaksazol direnci, CRA: Kongo kırmızısı agar, POZ/B: pozitif/borderline

4.7. İzolatların PZR bulguları:

4.7.1 IS256 ve eno geni bulguları:

IS256 ve eno genleri için yapılan multipleks PZR sonucu 35 MRSA izolatında (35/50, %70) IS256 geni tespit edilirken MSSA izolatlarının hiçbirinde IS256 geni tespit edilemedi (0/50, %0). eno geni ise, MRSA ve MSSA izolatlarının tamamında tespit edildi. MSSA izolatları ile karşılaştırıldığında, MRSA izolatlarında

IS256 geni saptanması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$) *IS256* ve *eno* geni için yapılan PZR' a ait jel görüntüsü Şekil 8'de gösterilmektedir.



PK: Pozitif Kontrol

Şekil 8 *IS256* ve *eno* geni için yapılan PZR' a ait jel görüntüsü

IS256 geni pozitif 35 MRSA izolatının 18'i yoğun bakım hastasından, 15'i servis hastasından, 2'si poliklinik hastasından izole edilmiştir. *IS256* geni tespit edilen suşların dağılımı Tablo 17'de, izole edildikleri örnek türü Tablo 18'de gösterilmektedir.

Tablo 17 *IS256* geni tespit edilen suşların dağılımı

İzolat	<i>IS256</i> (+)	<i>IS256</i> (-)	<i>P</i>
MRSA	35	15	<0.001
MSSA	0	50	
Toplam	35	65	

Tablo 18 *IS256* geni tespit edilen izolatların izole edildikleri örnek türü

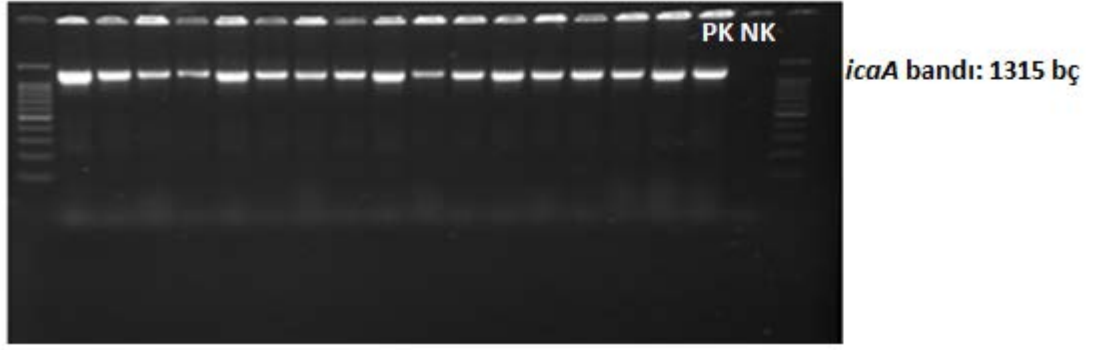
Örnek türü	İzolat sayısı
Balgam	6
Endotrakeal aspirat	6
Kan kültürü	8
Püy	6
Yara	7
Burun sürüntüsü	1
İdrar	1

4.7.2. *İcaA* Geni Bulguları:

icaA geni için yapılan monopleks PZR sonucu; 50 MRSA izolatının tamamında (%100) *icaA* geni tespit edilirken , 50 MSSA izolatından 49 ‘unda (%98) *icaA* geni tespit edildi. *İcaA* geni tespit edilmeyen MSSA izolatı, göğüs hastalıkları servisi hastanın bronkoalveolar lavaj örneğinden izole edilmiştir. *icaA* geni tespit edilen izolatlar Tablo 19’da gösterilmiştir. *İcaA* geni için yapılan PZR’ a ait jel görüntüsü Şekil 5’de gösterilmektedir.

Tablo 19 *icaA* geni tespit edilen izolatlar

İZOLAT	<i>icaA</i> (+) n (%)	<i>icaA</i> (-) n (%)
MRSA	50 (100)	0 (0)
MSSA	49 (98)	1 (2)
TOPLAM	99 (99)	1 (1)



PK: Pozitif Kontrol **NK:**Negatif Kontrol

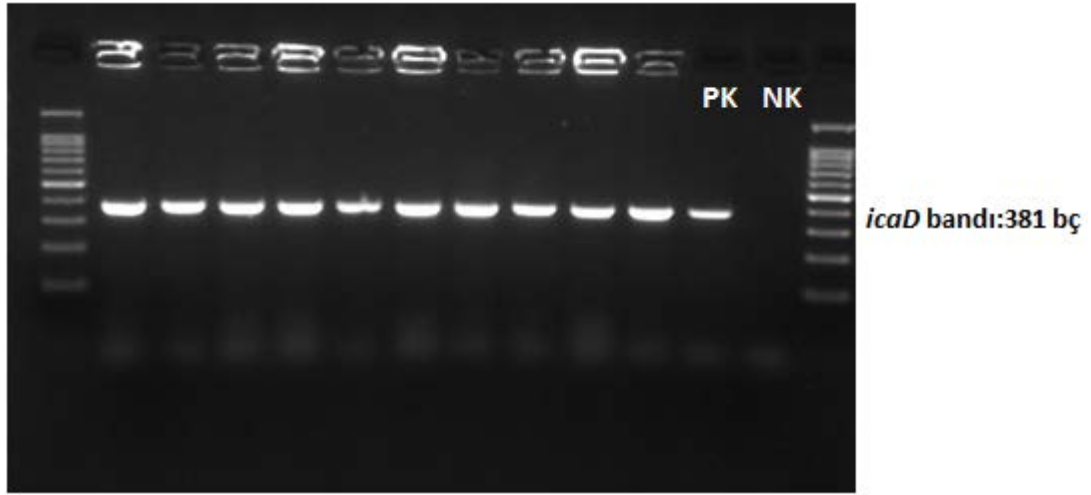
Şekil 9 *icaA* geni için yapılan PZR' a ait jel görüntüsü

4.7.3. *İcaD* Geni Bulguları:

50 adet MRSA ve 50 adet MSSA izolatının tamamında (%100,%100) *icaD* geni tespit edildi. *İcaD* geni tespit edilen izolatlar Tablo 20'de gösterilmiştir. *icaD* geni için yapılan PZR'a ait jel görüntüsü Şekil 6'de gösterilmektedir.

Tablo 20 *icaD* geni tespit edilen izolatlar

İZOLAT	<i>icaD</i> (+) n (%)	<i>icaD</i> (-) n (%)
MRSA	50 (100)	0 (0)
MSSA	50 (100)	0 (0)
TOPLAM	100 (100)	0 (0)



PK: Pozitif Kontrol NK: Negatif Kontrol

Şekil 10 *icaD* geni için yapılan PZR'a ait jel görüntüsü

4.8. İzolatların Biyofilm Üretiminin Fenotipik Ve Genotipik Sonuçlarının Değerlendirilmesi:

Çalışmaya alınan 100 *S.aureus* izolatının %98 i CRA besiyerinde fenotipik olarak biyofilm üretti (%93 pozitif + %5 borderline). İzolatların %2 sinde ise biyofilm üretimi gözlenmedi. Biyofilm üretimi gözlenen 98 izolatın biyofilm ile ilişkili genlere sahip olma oranı *eno* %100, *icaD* %100, *icaA* %99 ve *IS256* %36 olarak tespit edildi. Biyofilm üretmeyen 2 izolatın 2'si de *icaA*, *icaD*, *eno* genine sahipken *IS256* ikisinde de tespit edilmedi.

CRA'da biyofilm üretmeyen izolatların biyofilm ilişkili genleri Tablo 21' de gösterilmektedir.

Tablo 21 CRA'da biyofilm üretmeyen izolatların biyofilm ilişkili genleri

İZOLAT NUMARASI	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	<i>IS256</i>	<i>eno</i>	CRA
S8	+	+	-	+	N
S18	+	+	-	+	N

CRA: Kongo kırmızısı agar. N: negatif

CRA besiyerinde biyofilm üreten izolatların tamamı (%100) *icaD* ve *eno* genine sahiptir. İzolatların %99' unda *icaA* ve % 36'sında *IS256* tespit edildi. CRA 'da biyofilm üreten izolatların biyofilm ilişkili genleri Tablo 22' de gösterilmektedir.

Tablo 22 CRA 'da biyofilm üreten izolatların biyofilm ilişkili genleri

İZOLAT SAYISI	<i>icaA</i> (+) %	<i>icaD</i> (+) %	<i>IS256</i> (+) %	<i>eno</i> (+) %	CRA
N=98	99	100	36	100	POZ/B

CRA: Kongo kırmızısı agar, POZ/B: pozitif/Borderline

4.9. *IS256* Geni Pozitif Ve Negatif *S.Aureus* İzolatlarının Antibiyotik Direnç Profillerinin Karşılaştırılması:

IS256 geni pozitif izolatların tamamı (35/100) MRSA idi. Çalışmamızda *IS256* geni pozitif MRSA izolatları ile *IS256* geni negatif MRSA izolatlarının antibiyotik direnç profilinin karşılaştırılması ve *IS256* geni pozitif ve negatif *S.aureus* izolatlarının antibiyotik direnç profilinin karşılaştırılması ayrı ayrı ele alındı.

IS256 geni pozitif MRSA izolatlarında amikasin, gentamisin, siprofloksasin, levofloksasin, rifampin, klindamisin, iMLSB ve tetrasiklin direnci *IS256* geni negatif MRSA izolatlarından anlamlı oranda yüksek bulundu ($p<0.001$ - $p<0.05$). SXT direnci ise *IS256* negatif MRSA izolatlarında *IS256* pozitif izolatlara göre anlamlı oranda yüksek bulundu ($p<0.01$). İki grup arasında linezolid, eritromisin ve penisilin direnci arasında ise anlamlı fark bulunmadı. (p değeri sırasıyla >0.1 , >0.05 ve >0.05) *IS256* geni pozitif ve negatif MRSA izolatlarının antibiyotik direnç profilleri ve p değerleri Tablo 23'de gösterilmiştir.

Tablo 23 *IS256* geni pozitif ve negatif MRSA izolatlarının antibiyotik direnç profili

Antibiyotik	<i>IS256</i> (+) MRSA (n= 35) n (%)	<i>IS256</i> (-) MRSA (n=15) n (%)	<i>p</i>
Amikasin/ Gentamisin	29 (82,85)	3 (20)	<0.0001
Rifampin	34 (97,14)	3 (20)	<0.0001
Linezolid	0 (0)	0 (0)	>0.1
Levofloksasin/ Siprofloksasin	34 (97,14)	6 (40)	<0.0001
Eritromisin	24 (68,57)	6 (40)	>0.05
iMLSB*	23 (65,71)	3 (20)	<0.003
Tetrasiklin	34 (97,14)	9 (60)	< 0.0005
Penisilin	35 (100)	15 (100)	>0.05
Klindamisin	24 (68,5)	3 (20)	<0.002
Trimetoprim- Sulfametaksazol	1 (2,85)	4 (26,66)	<0.01

*indüklenebilir makrolid-linkozamid-streptogramin B direnci

IS256 geni pozitif *S.aureus* izolatlarının linezolid ve SXT dışındaki diğer antibiyotiklere direnç oranı *IS256* geni negatif *S.aureus* izolatlarından anlamlı derecede yüksek bulundu. ($p<0.05$) *IS256* geni pozitif ve negatif izolatların antibiyotik direnç profili Tablo 24' de gösterilmektedir.

Tablo 24 *IS256* geni pozitif ve negatif izolatların antibiyotik direnç profili

Antibiyotik	<i>IS256 (+) S.aureus</i> (n=35) n (%)	<i>IS256 (-) S.aureus</i> (n=65) n (%)	<i>p</i>
Amikasin/ Gentamisin	29 (82,85)	6 (9,23)	<0.0001
Rifampin	34 (97,14)	3 (4,61)	<0.0001
Linezolid	0 (0)	0 (0)	>0.05
Levofloksasin/ Siprofloksasin	34 (97,14)	10 (15,38)	<0.0001
Eritromisin	24 (68,57)	14 (21,53)	<0.0001
İmlsb*	23 (65,71)	6 (9,23)	<0.0001
Tetrasiklin	34 (97,14)	17 (26,15)	<0.0001
Penisilin	35 (100)	52 (80)	<0.02
Klindamisin	24 (68,5)	6 (9,23)	<0.0001
Trimetoprim- Sulfametaksazol	1 (2,85)	5 (7,69)	>0.05

4.10. *IS256* Geni Pozitif Ve Negatif *S.Aureus* İzolatlarının Vankomisin Ve Teikoplanin MİK Ortalamalarının Karşılaştırılması:

Çalışmada izolatların vankomisin ve teikoplaninin MİK ortalamalarının karşılaştırılması için ‘student’s unpaired t test’ istatistiksel yöntemi kullanıldı. MRSA izolatları arasında *IS256* pozitif olanların vankomisin ve teikoplanin MİK ortalaması *IS256* negatif olan gruba göre anlamlı oranda yüksek bulundu ($p < 0,002$, $p < 0,0001$). *IS256* geni pozitif ve negatif MRSA izolatlarının vankomisin ve teikoplanin MİK ortalaması Tablo 25’ de gösterilmektedir.

Tablo 25 *IS256* geni pozitif ve negatif MRSA izolatlarının vankomisin ve teikoplanin MİK ortalaması

	<i>IS256</i> (+) MRSA (n=35)	<i>IS256</i> (-) MRSA (n=15)	<i>p</i>
Vankomisin MİK Ortalaması	0,91 µg/ml	0,7 µg/ml	< 0,002
Teikoplanin MİK Ortalaması	1,75 µg/ml	0,63 µg/ml	<0,0001

IS256 geni pozitif *S.aureus* izolatlarının vankomisin ve teikoplanin MİK ortalaması, *IS256* negatif *S.aureus* izolatlarından anlamlı oranda yüksek bulundu ($p<0,0001$). *IS256* geni pozitif ve negatif *S.aureus* izolatlarının vankomisin ve teikoplanin MİK ortalaması tablo 26’ da gösterilmektedir.

Tablo 26 *IS256* geni pozitif ve negatif *S.aureus* izolatlarının vankomisin ve teikoplanin MİK ortalaması

	<i>IS256</i> (+) <i>S.aureus</i> İzolatu (n=35)	<i>IS256</i> (-) <i>S.aureus</i> İzolatu (n=65)	<i>P</i>
Vankomisin MİK Ortalaması	0,91 µg/ml	0,66 µg/ml	<0,0001
Teikoplanin MİK Ortalaması	1,75 µg/ml	0,50 µg/ml	<0,0001

5. TARTIŞMA

S. aureus, hem sağlık hizmeti ile ilişkili hem de toplum kaynaklı enfeksiyonların önde gelen patojenlerinden biridir. *S. aureus* enfeksiyonları, mikroorganizmanın bütünlüğü bozulmuş deri ve mukozalardan vücuda girmesiyle başlar ve lokal enfeksiyonlara neden olabileceği gibi uzak organlara yayılarak bakteremi, pnömoni ve osteomyelit gibi yaşamı tehdit eden invaziv enfeksiyonlar oluşturabilir. *Staphylococcus aureus* 'un bu denli önemli bir patojen olması, büyük ölçüde, yatay gen transferi sayesinde yeni DNA edinimi ile farklı ortamlara uyum sağlama ve klonal olarak yayılma kabiliyetinden kaynaklanmaktadır (52).

S. aureus, dünya çapında nozokomiyal bir patojen olarak ilk sıralarda yer almaktadır. Amerika Birleşik Devletleri' nde 2.000 e yakın hastaneden veri alan Ulusal Sağlık Güvenliği Ağı' nın verilerine göre *S. aureus*, hastanelerden izole edilen patojenler arasında ilk sıradadır. Özellikle, VİP ve cerrahi alan enfeksiyonlarının en yaygın patojenidir. Ayrıca izole edilen *S.aureus*' ların % 43- 58 ini MRSA oluşturmaktadır ve hastane ilişkili enfeksiyonların çoklu ilaca dirençli etkenleri arasında ilk sırada yer almaktadır(116). Avrupa Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (ECDC)' nin 2013 yılında yayınlanan bir çalışması, *S. aureus*'un *E. coli*'den sonra hastane enfeksiyonlarında en sık izole edilen ikinci mikroorganizma olduğunu ortaya koymuştur. ABD verilerine benzer şekilde Avrupa'da da *S.aureus* cerrahi alan enfeksiyonlarının ilk sıradaki etkenidir (117). Ülkemizde sağlık bakımı ile ilişkili enfeksiyonların sürveyans ağı 2018 raporuna göre ise *S. aures* sağlık bakımı ile ilişkili enfeksiyonların en sık etkenleri sıralamasında, *Acinetobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *E.coli*, *Pseudomonas aureginosa*, *Enterococcus spp* ve KNS'tan sonra 7. sırada yer almaktadır (118).

S. aureus izolatları arasında MRSA yüzdesi coğrafi olarak değişiklik göstermektedir; Avrupa'da %26,8'den Kuzey Amerika'da %47,0'a kadar değişen oranlarda MRSA bildirilmiştir(119). SENTRY surveyans programının 1997-2016 yılları arasında yürüttüğü çalışmasının sonuçlarına göre hem nosokomiyal hemde

toplum kökenli MRSA enfeksiyonlarında yıllar içinde azalma gözlemlenmiştir. Genel MRSA oranı 1997–2000'de %33.1'den 2005–2008'de %44.2'ye yükselme gösterirken 2009–2012 ve 2013–2016 yılları arasında bu oran %42.3 ve %39.0'a düşmüştür (120). Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi (EARSS) Türkiye verilerine baktığımızda 2003 yılında %43 olan MRSA prevelansının 2008 de %38 e gerilediğini görmekteyiz (121). 2016 yılına geldiğimizde ise Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi (UAMDSS) verilerine göre ülkemizdeki MRSA prevelansı %23.6 ile ciddi orada düşüş göstermiştir (122). MRSA prevelansındaki düşüş; evrensel MRSA taraması, temas önlemleri, el hijyeninin teşvik edilmesi gibi enfeksiyon kontrol uygulamalarının geliştirilmesi ayrıca akılcı antimikrobiyal kullanımı politikalarına bağlanabilir. Bununla birlikte, bazı uzmanlar, hiperendemik MRSA klonlarındaki yaygın düşüşlerin, organizmanın kendisindeki değişikliklerden kaynaklanabileceğini savunmaktadır (123).

S.aureus'un mobil genetik elemanlarla direnç geni transferi başta olmak üzere pek çok mekanizmayla antimikrobiyal ajanlara direnç geliştirme yeteneği enfeksiyonların tedavisini güçleştirmekte bu da mortalite ve morbiditenin artmasıyla sonuçlanmaktadır. Cosgrove ve ark. nın yaptığı çalışmada, MRSA bakteriyemisinin MSSA bakteriyemisinden daha yüksek mortalite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (124). Çalışmamızda 50 MRSA izolatının %86 sı tetrasikline %80 i siprofloksasin ve levofloksasine dirençli bulundu. Rifampisin direnci % 72, amikasin ve gentamisin direnci %64, eritromisin direnci %60 ve klindamisin direnci %54 bulunurken iMLSB direnci %52 olarak tespit edildi. Ayrıca MRSA izolatlarına etkili bir 5. kuşak sefalosporin olan seftaroline direnç %40 olarak bulundu. Trimetoprim/sulfametaksazol direnci %10 iken çalışmamızda vankomisin, teikoplanin, kloramfenikol ve linezolid dirençli MRSA izolatı bulunmadı. Çalışmamıza dahil ettiğimiz 50 MSSA izolatının penisilin, tetrasiklin, eritromisin, klindamisin, siprofloksasin, gentamisin, iMLSB ve SXT direnci sırasıyla %74, %16, %16 , %10, %8 ,%6, %6 ve %2 olarak bulundu. MSSA izolatlarında kloramfenikol, rifampisin, vankomisin, teikoplanin ve linezolid direncine rastlanmadı.

SENTRY surveyans çalışması 2009-2016 yılları arasındaki MRSA ların antibiyotik duyarlılık profiline baktığımızda eritromisin, siprofloksasin, klindamisin,

gentamisin, tetrasiklin ve trimetoprim-sülfametoksazol duyarlılık sıklıklarının sırasıyla %17, %27, % 67 , %86 , %88 ve % 97 olduğu bildirilmiştir. Yine aynı çalışmada MSSA ların antibiyotik duyarlılık oranları; penisilin %25, eritromisin %74, siprofloksasin %90, tetrasiklin %95 klindamisin %96, gentamisin, % 98 ve SXT %99 olarak bulunmuştur. Çalışmamıza benzer şekilde SENTRY çalışmasında da vankomisin ve teikoplanine dirençli MSSA ve MRSA izolatı bulunmazken, 1 izolat linezolid dirençli bulunmuştur. MSSA izolatlarında klindamisin direnci dışında çalışmamız verileri SENTRY çalışması MSSA verileriyle benzerlik göstermektedir. Çalışmamızda ki nispeten yüksek klindamisin direnci *S.aureus* izolatlarının neden olduğu enfeksiyonlarının tedavisinde klindamisinin yaygın kullanımı nedeniyle olabilir (120). Türkiye 2016 yılı verilerine baktığımızda çalışmamıza benzer şekilde *S.aureus* izolatlarının hiçbirinde vankomisin ve linezolid direncine rastlanmamıştır (122). Özmen Çapın ve ark. dolaşım sistemi enfeksiyonu etkeni olarak izole ettikleri MRSA lar üzerine yaptıkları çalışmada izolatların tetrasiklin, gentamisin, siprofloksasin, rifampisin, klindamisin direnci sırasıyla %100, %99,2, %99,2 , %98,4, %62,2 olarak tespit edilmiştir (125). Çalışmamızda ki MRSA ların antibiyotik direnci bu çalışmayla karşılaştırıldığında düşüktür. Bunun sebebi Özmen Çapın ve ark. yaptığı çalışmada tüm izolatların ‘toplum kökenli izolatlardan farklı olarak çoklu ilaç direnci genlerine sahip’ hastane kökenli *S.aureus* olması bizim çalışmamızda ise *S.aureus* izolatları arasında hastane kökenli-toplum kökenli ayrımı yapmamamızdan kaynaklanıyor olabilir.

Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından, MRSA’nın etken olduğu cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarının ve toplum kökenli pnömoni olgularının tedavisinde kullanım onayı almış 5. kuşak sefalosporin olan seftaroline duyarlılığın belirlenmesinde EUCAST ve CLSI rehberleri arasında zon çapı ve MİK sınır değerleri açısından farklılık bulunmaktadır. Bu durum seftarolin duyarlılığı araştırılmasında farklı sonuçlara neden olabilmektedir. MRSA izolatlarında seftaroline duyarlılığın araştırıldığı çalışmalara baktığımızda; 2012 yılında Asya-Pasifik bölgesinde 7 ülkeden 26 farklı merkezin dahil olduğu bir çalışmada, 1222 MRSA suşunda seftaroline duyarlılık araştırılmış ve CLSI kriterlerine göre izolatların % 78.8 i duyarlı olarak tespit edilmiştir (126). Aynı surveyans programı kapsamında 6 Latin Amerika ülkesini kapsayan bir başka çalışmada 390 MRSA

suşunda seftaroline duyarlılık oranı % 83.4 olarak bulunmuştur. İzolatların %16,6 sı seftaroline orta duyarlıyken seftaroline dirençli izolat tespit edilmemiştir(127). Yine bu sürveyans kapsamında ülkemiz verileri incelendiğinde suşların hiç birinde seftaroline direnç saptanmamışken seftaroline orta duyarlı suş oranı % 62.3 olarak bulunmuştur (128). Çalışmamızda MRSA izolatlarında seftarolin duyarlılığı EUCAST kriterleri ile değerlendirildi ve 50 MRSA izolatının %60 ı duyarlı olarak bulundu ve seftaroline direnç oranı %40 tı. Ülkemizde MRSA izolatlarında seftarolin duyarlılığının EUCAST kriterleri ile değerlendirildiği bir çalışmada çalışmamızla benzer şekilde direnç oranı %41,7 olarak tespit edilmiştir (125). MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde kullanımı uygun olan bu ajana yüksek direnç oranları endişe uyandırmaktadır.

MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde ilk seçenek olan vankomisin rutin laboratuvar testleri ile tespit edilemeyen dirençli alt popülasyonlarının varlığı ve antibiyotik duyarlılık testleriyle duyarlı kategoride olmasına rağmen MİK değerlerinde yükselme olması gibi sorunlar tedavi başarısını etkilemektedir. Daha yüksek vankomisin MİK'i olan *S. aureus* izolatlarının neden olduğu enfeksiyonların, duyarlı aralıkta olsa dahi, gecikmiş erken yanıt, artmış mortalite, artmış relaps oranı, uzun süreli hastanede yatış gibi çeşitli kötü klinik sonuçlarla ilişkili olduğu gösterilmiştir (129). Çalışmamızda *S.aureus* izolatlarının vankomisin MİK değeri 0,25-1 µg/ml ve teikoplanin MİK değeri 0,125-2 µg/ml arasında bulundu. Vankomisin için MİK50 ve MİK90 değeri 1 µg/ml iken teikoplanin için MİK50 değeri 0,5 µg/ml ve MİK90 değeri 2 µg/ml olarak tespit edildi. Ülkemizde Mirza ve ark. yaptıkları çalışmada MRSA izolatlarının vankomisin MİK aralığını 0.5–2 µg/ml ve MİK50 ve MİK90 değerlerini 1 µg/ml ve 2 µg/ml bulmuşlardır (130). Çalışmamızla benzer şekilde ülkemizden bir başka çalışmada *S.aureus* izolatlarının vankomisin MİK değeri 0,25-1 µg/ml arasında bulunmuştur (125).

Vankomisine duyarlılığı azalmış izolatların giderek artan prevelansı günümüzde önemli bir sorun haline gelmiştir. VISA ve hVISA suşlarının neden olduğu enfeksiyonlar için ana risk faktörleri, yüksek bakteri yükü (endokardit, derin apse, protez eklem enfeksiyonları), daha önce vankomisine maruz kalma (özellikle düşük serum konsantrasyonu ile) ve önceki MRSA enfeksiyonu olarak gösterilmektedir

(129). Rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında hVISA saptanmasının güçlüğü bilinmektedir ve son derece duyarlı ve uygulanması kolay bir yöntem henüz geliştirilememiştir. Bu izolatları saptamak için referans yöntem, popülasyon profili analizi-eğri altında kalan alan (PAP-AUC) yöntemidir. Fakat PAP-AUC oldukça zaman alıcı, zahmetli, tecrübe gerektiren ve rutin mikrobiyoloji laboratuvarları için uygun olmayan bir yöntemdir. Bu nedenle hVISA tespiti için pek çok tarama yöntemi geliştirilmiştir (22). EUCAST rehberinde hVISA taraması için Makro-G-test, Glikopeptit direnci saptanması (GRD) için G-test ve teikoplanin tarama agar yöntemleri önerilmektedir (75). Tarama için kullanılan yöntemler arasında duyarlılık ve özgüllük farkları bulunmakta bu durum farklı çalışmalarda farklı sonuçlar rapor edilmesine neden olmaktadır. Woottonet ve ark. glikopeptid duyarlılıklarını bildikleri 48 *S.aureus* suşunu 12 farklı laboratuvara dağıtarak hVISA taraması için tanımlanan, 6 mg/L vankomisin içeren beyin-kalp infüzyon agarı (BHIA6V), 5 mg/L teikoplanin içeren Mueller-Hinton agar (MHA5T) ve MET yöntemlerini incelemişlerdir. Verilerin analizi BHIA6V'nin en az performans gösterdiğini, sırasıyla %35,2 ve %97,4 duyarlılık ve özgüllükte olduğunu göstermiştir. MHA5T ve MET için sonuçlar benzer olup; duyarlılık ve özgüllük, sırasıyla %82,5 ve %85,9 olarak tespit edilmiştir. Yazarlar, MHA5T'nin iyi performans gösterdiğini ve MET'e kıyasla düşük maliyeti nedeniyle, en yararlı tarama yöntemi olarak görülebileceğini belirtmişlerdir (113).

Çalışmamızda hVISA taraması için bu çalışmanın verileri dikkate alınarak iyi performans sergilemesi ve maliyet etkin olması gibi nedenlerle 5 mg/L teikoplanin tarama agar yöntemi tercih edildi. 5 mg/L teikoplanin tarama agar yöntemi ile 11 MRSA ve 7 MSSA izolatını hVISA şüpheli olarak tespit ettik.

Tarama sonucu pozitif bulunan 18 izolata referans yöntem olan PAP-AUC uygulandı ve 2 MRSA ve 2 MSSA olmak üzere toplam 4 *S.aureus* izolatu (%4) hVISA olarak tespit edildi. Zhang ve ark. 1997-2014 yılları arasında VISA ve hVISA suşlarının araştırıldığı 91 çalışmayı kapsayan meta-analizlerinde, hVISA sıklığının 2006'dan önce %4.68, 2006-2009'da %5.38 ve 2010-2014'te %7.01 olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca VISA prevalansı sırasıyla %2.05, % 2.63 ve % 7.93 olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada hVISA suşlarının prevalansı Asya'da % 6,81 iken Avrupa ve Amerika'da %5,60 ve VISA' nınki sırasıyla %3.42 ve % 2.75 tir

(131). Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda hVISA sıklığı %0,9, %18 ve %21,3 gibi oranlarda tespit edilmiştir (130, 132, 133). 2012 yılında Türkiye’de 7 ildeki hastanelerin yoğun bakım ünitelerinden izole edilen MRSA suşlarında VISA ve VRSA’nın araştırıldığı bir çalışmada VISA ve VRSA izolatına rastlanmamıştır (134).

Çalışmamızda dikkate değer bir nokta MSSA izolatları arasında 2 izolatın hVISA olduğunun tespit edilmesidir. Hem yurtdışında hem ülkemizde hVISA’nın araştırıldığı çalışmaların MRSA izolatlarına odaklandığını görmekteyiz. Ancak glikopeptit gurubu antibiyotiklere azalmış duyarlılığa MSSA izolatlarında da rastlanmaktadır. Hu ve ark. 388 MSSA izolatında vankomisine azalmış duyarlılık araştırmış ve suşların %4,1’i hVISA ve %1 ini ise VISA olarak tespit etmişlerdir (135). Tedavi stratejilerinin gözden geçirilmesi, klinik yansımaların incelenmesi ve gerçek prevelansların belirlenebilmesi için MSSA izolatlarının da glikopeptitlere azalmış duyarlılık açısından taranması gerektiğini düşünmekteyiz.

S.aureus’un hem konak doku hem de kateterler, protez eklemler gibi implante edilmiş cihazlar üzerinde oluşturduğu biyofilm tabakası, akut ve kronik pek çok enfeksiyona zemin hazırlamaktadır. Ayrıca bakteri biyofilm tabakası sayesinde konağın immün yanıtı ve antimikrobiyal ajanlara direnç göstererek enfeksiyonların tedavisini güçleştirmektedir (110). Çalışmamıza dahil ettiğimiz izolatların %98’i biyofilm üretici olarak tespit edildi. Biyofilm oluşturan izolatların 48’i pü/yara yeri , 24’ü kan kültürü, 20’si alt solunum yolu ve 5’i idrar örneklerinden izole edildi. Çalışmamızda biyofilm oluşturan izolatların farklı vücut bölgelerinden izole edilmesi biyofilm oluşturan *S.aureus* izolatlarının çok çeşitli enfeksiyonlara neden olabileceği bilgisiyle örtüşmektedir. Çalışmalarda çeşitli bölgelerden izole edilen *S.aureus*’ ların biyofilm üretimi arasında farklılıklar dikkati çekmektedir. Belbase ve ark. irin/yara sürüntüsü örneklerinden izole ettikleri *S.aureus* suşlarının %46,1 inde biyofilm üretimi tespit ederken (136), ülkemizde Demir ve ark. kronik yara enfeksiyonu etkeni olarak izole ettikleri *S.aureus* suşlarının %70,5 inin biyofilm oluşturduğunu tespit etmişlerdir (137). İran’da Goudarzi ve arkadaşları üriner sistem enfeksiyonu etkeni olarak izole ettikleri *S.aureus* suşlarının %72 sinin biyofilm üreticisi olduğunu göstermişlerdir (138). Bu çalışmalarla karşılaştırıldığında çalışmamızda *S.aureus*

izolatlarında biyofilm üretimi yüksektir. Brezilya’da Melo ve ark. ile Batista ve ark.nın *S.aureus* izolatlarının biyofilm oluşumunu araştırdıkları çalışmalarında biyofilm üretimi sırasıyla % 94 ve %99 bulunmuştur (139, 140). Bu sonuçlar bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir. Sonuçlar arasındaki farklılıklar, *S. aureus*’un izole edildiği hastane, hasta grupları, zaman dilimleri ve coğrafi konumların farklı olmasından ayrıca biyofilm tespitinde kullanılan yöntemler arasında duyarlılık ve özgüllük farkı olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Çalışmamızda biyofilm üreten *S.aureus* izolatlarının %51 i MRSA ve %49 u MSSA idi. Biyofilm oluşturan 4 MSSA ve 1 MRSA izolatı sınırda biyofilm üreticisi olarak bulundu. MRSA izolatları ile MSSA izolatları arasında biyofilm üretimi açısından anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$). MRSA ve MSSA izolatlarının biyofilm üretimi açısından karşılaştırıldığı çalışmalara baktığımızda bir tarafa yönelik net bir üstünlük görülmemektedir. Ghasemian ve ark yaptığı çalışmada biyofilm üretici *S.aureus* izolatlarının %21.8 ini MRSA ve %28.9 unu MSSA olarak bulmuşlardır (141). Biyofilm üretimi tespit edilen 127 *S.aureus* izolatının dahil edildiği başka bir çalışmada izolatların %33 ü MRSA iken %67 sinin MSSA olduğu görülmüştür (140). Bunların aksine Gaudarzi ve ark.1 yaptığı çalışmada biyofilm üreten izolatların %60 ını MRSA % 40 ını MSSA olarak tespit etmişlerdir (138).

Biyofilm tabakası antibiyotiklerin penetrasyonunda zorluk, bakterilerin biyofilm içinde yavaş büyüme hızı ve bakteriler arası yatay gen transferi için uygun ortam oluşturması gibi nedenlerle antibiyotiklere direnç gelişimine neden olmaktadır. Biyofilm oluşturan suşların biyofilm oluşturmayan suşlara kıyasla antimikrobiyallere önemli ölçüde dirençli olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda biyofilm oluşturmayan 2 *S.aureus* izolatı penisilin dışındaki diğer antimikrobiyallere duyarlı bulundu. Ayrıca sınırda biyofilm üreticisi 5 izolatın tamamı eritromisin, klindamisin, amikasin, gentamisin, rifampisin, siprofloksasin, levofloksasin, kloramfenikol, linezolid vankomisin ve teikoplanine duyarlıydı. Biyofilm üreten izolatların antibiyotik direnç oranı ise: Penisilin %86,7, tetrasiklin %52, siprofloksasin %44,8, levofloksasin %42,8, eritromisin %38,7, rifampin 36,7, amikasin ve gentamisin %35,7, klindamisin %32,6 ve SXT %6,1 olarak bulundu. Vankomisin, teikoplanin, kloramfenikol ve linezolidde dirençli izolat bulunmadı. Bhattacharya ve ark. çeşitli klinik örneklerden

izole ettikleri *S.aureus* izolatlarının %55'inin biyofilm üreticisini olduğunu, biyofilm üreticilerinde özellikle siprofloksasin, ko-trimoksazol, rifampisin, kanamisin, eritromisin ve klindamisine daha yüksek direnç görülürken, non-biyofilm üreticilerinde gentamisin, tetrasiklin ve penisilin direncinin daha yüksek olduğunu tespit etmişlerdir (142). Belbase ve ark. yaptıkları çalışmada çoklu ilaç direncinin, biyofilm üreten *S.aureus* suşlarında üretmeyenlere kıyasla daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (136). Çalışmamızda biyofilm üreten *S.aureus* izolatlarının antibiyotik direnç profili ile üretmeyen izolatların antibiyotik direnç profili örneklem büyüklükleri arasındaki farkın büyük olması nedeniyle istatistiksel olarak değerlendirilememiştir.

Çalışmamızda hVISA olarak tespit ettiğimiz 2 MRSA ve 2 MSSA izolatının hepsi biyofilm üreticisi olarak tespit edildi.

Polisakkarit intraselüler adhezin (PIA) veya polimerik N-asetilglukozamin (PNAG) olarak adlandırılan adhezyon molekülü üretiminin *ica* operonu tarafından kontrol edilmesi stafilokokal biyofilm gelişiminin en iyi anlaşılan mekanizmasıdır. Bunun dışında özellikle MRSA da *ica* operonundan bağımsız *SarA* ve *agr* sistemleri tarafından kontrol edilen biyofilm oluşumundan sorumlu protein adhezinler de bulunmaktadır (143). Çalışmamızda biyofilm oluşturan izolatların biri dışında tamamı (97/98) *icaA* ve *icaD* genine sahipti (%99,%100). Biyofilm oluşturan 1 izolat ise *icaD* içeriyorken *icaA* geni tespit edilemedi. Bununla birlikte çalışmamızda biyofilm oluşturmayan 2 izolatta *icaA* ve *icaD* genlerine sahipti. Bu 2 izolatta *icaA* ve *icaD* geni taşımasına rağmen biyofilm üretimi gözlenmemesi, fenotipik yöntemin sınırlılığından veya bu izolatlarda ekspresyonun olmamasından kaynaklanabilir. Çalışmamıza benzer şekilde ve Batistao ve ark. yaptıkları çalışmada biyofilm üretici olan ve olmayan *S.aureus* izolatlarının tamamında *icaD* geni tespit ederken, 1 izolat dışında tamamında *icaA* geni tespit etmişlerdir (144). Aynı şekilde Melo ve ark. Kongo kırmızısı agar yöntemiyle biyofilm üretimi tespit ettikleri *S.aureus* suşlarının tamamının *icaA* ve *icaD* genlerine sahip olduklarını, CRA da negatif bulunan izolatların ise %15'inin *icaA* ve *icaD* geni içerdiğini göstermişlerdir (139).

Çalışmamızda MRSA ve MSSA izolatları arasında *icaA*, *icaD* gen bölgesi içermeleri açısından anlamlı fark bulunmadı. ($p>0.05$) Çalışmamızla benzer şekilde

Ghasemian ve ark. 209 *S.aureus* izolatının biyofilm ile ilişkili genlerini araştırdıkları çalışmada MRSA ve MSSA izolatları arasında *icaA* ve *icaD* genlerini içerme oranları açısından anlamlı fark bulmamışlardır (141). Başka bir çalışma da Mir ve ark. hastane personeli burun mukozasından ve hastane yüzeylerinden izole ettikleri MRSA' ların *icaA* ve *icaD* geni içerme oranları %85,1 ve % 76,8 ve MSSA izolatlarında ise %86,4 ve %64,4 olarak bulmuşlardır (145).

Protein kodlayan genlere ek olarak, insersiyon sekanslarının (IS) biyofilm oluşumu üzerine etkisi önemli araştırma konularından biridir. Son araştırmalar, *IS256* da dahil olmak üzere IS lerin biyofilm oluşumu ile güçlü ilişki içerisinde olduğunu göstermişlerdir (9, 144). Çalışmamızda biyofilm üreten izolatların %36'sı *IS256* dizisine sahipti. Biyofilm üretmeyen 2 izolatta ise *IS256*' ya rastlanmadı.

IS256' nın varlığı *S.epidermidis*'te aminoglikozid direnci ile ilişkili bulunmuştur (19). Başka bir çalışma, *S.aures*'ta çoklu ilaç direnci seviyesi ile *IS256* sıklığı ve biyofilm pozitifliği arasında anlamlı bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur (9). Çalışmamıza dahil ettiğimiz izolatların 35'inde *IS256* dizisi tespit ettik. *IS256* dizisi içeren izolatların hepsi MRSA idi. MSSA izolatlarında ise *IS256* dizisine rastlanmadı. MRSA izolatlarında *IS256*'nın varlığı MSSA izolatlarından anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). Çalışmamızda *IS256* içeren izolatların penisiline, rifampisine, eritromisine, klindamisine, tetrasikline ve aminoglikozid ve kinolon grubu antibiyotiklere direnç oranları *IS256* içermeyen gruba göre anlamlı ölçüde yüksek bulundu ($p<0.02-0.0001$).Yine iMBL direnci de *IS256*'ya sahip grupta daha yüksekti. *IS256* dizisine sahip 35 izolatın 34 'ü (% 97,1) çoklu ilaç direncine sahipti. Bu sonuçlarla çalışmamız *IS256* dizisinin ilaç direnci ile önemli bir ilişkisi olduğunu ortaya koymuştur. Bu ilaç direnç genleri *IS256* ile aynı transpozonda taşınıyor olabilir.

Çalışmamızda *IS256* genine sahip *S.aureus* izolatlarının vankomisin ve teikoplanin MİK değerleri bu geni içermeyen izolatlara göre anlamlı derecede yüksek bulundu. ($p<0,0001$) Bu verilerimizi destekler nitelikte Kuroda ve ark. bir VISA klinik izolatının *IS256* aracılı *WalKR* aşırı ekspresyonu ile belirgin şekilde kalınlaşmış bir hücre duvarı ve ilacın bağlanması için serbest D-Ala-D-Ala hedeflerine yol açarak vankomisine azalmış duyarlılığa neden olduğunu gösterdi

(146). Bir başka çalışmada, *S.aureus*'a *IS256*'nın eklenmesinin *tcaRAB* gen bölgesinin silinmesine aracılık ettiği ve bununda teikoplanin direncini arttırdığı bulunmuştur (147). Çalışmamızda tespit edilen hVISA fenotipinde 2 MRSA izolatı *IS256*'ya sahipken MSSA izolatlarında *IS256* tespit edilmedi. Us ve ark. *IS256*'yı, MRSA ve hVISA suşlarında MSSA'ya göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek bulmuşlardır (20). Yine bir başka çalışmada MRSA izolatlarının *IS256*'yı içermesi MSSA izolatlarından anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (9).

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda *S.aureus* izolatlarında biyofilm üretimi %98 gibi dikkat çekici bir oranda yüksek bulundu. İmmün sistem hücrelerinin, konakçı proteinlerin ve antibiyotiklerin geçişi için bariyer görevi yapan biyofilm tabakası *S.aureus*'un hem akut hem de kronik enfeksiyonları için önemli bir patojenite faktörüdür. Bu nedenle *S.aureus* enfeksiyonlarının tedavi stratejileri belirlenirken biyofilm üretimi göz önünde bulundurulmalı ve seçilecek antimikrobiyaller biyofilm eradikasyonunu da içermelidir.

Çalışmamızda biyofilm üreten izolatların antibiyotik direnç oranı: penisilin %86,7, tetrasiklin %52, siprofloksasin %44,8, levofloksasin %42,8, eritromisin %38,7, rifampin %36,7, amikasin ve gentamisin %35,7, klindamisin %32,6 ve SXT % 6,1 olarak bulundu. Biyofilm üretmeyen 2 izolat ise penisilin dışında diğer antimikrobiyallere duyarlı bulundu. Çalışmamızda biyofilm üretmeyen izolatların (n=2) antibiyotik direnç profili, biyofilm üreten izolatların (n=98) antibiyotik direnç profili ile örneklem büyüklükleri arasındaki farkın büyük olması nedeniyle istatistiksel olarak karşılaştırılamamıştır. Ancak biyofilm üreten *S.aureus* izolatlarındaki yüksek antibiyotik direnç oranları endişe vericidir. Daha anlamlı sonuçlar elde edilebilmesi için örneklem büyüklükleri yakın gruplar üzerinde çalışma yapılmalıdır.

Çalışmamızda izolatların biyofilm ilişkili genlere sahip olma oranı *icaA* %99, *icaD* %100, *eno* %100 ve *IS256* %35 olarak bulundu. MRSA ve MSSA izolatları

arasında *icaA*, *icaD* ve *eno* genlerine sahip olma açısından anlamlı fark gözlenmezken ($p>0.05$) *IS256*, MRSA larda MSSA'lerden anlamlı oranda yüksek bulunmuştur. ($p<0.001$)

IS256'ya sahip *S.aureus* izolatlarının penisilin, rifampisin, eritromisin, klindamisin, iMLSB, tetrasiklin, levofloksasin, siprofloksasin, gentamisin ve amikasin direnç oranları, *IS256* içermeyen gruba göre anlamlı ölçüde yüksek bulundu($p<0.02-0.0001$). *IS256* dizisine sahip 35 izolatın 34 'ü % (%97,1) çoklu ilaç direncine sahipti. Ayrıca *IS256*' ya sahip grubun vankomisin ve teikoplanin MİK ortalamaları *IS256* içermeyen gruba göre anlamlı derecede yüksek bulundu. ($p<0,0001$) Bu sonuçlarla çalışmamız *IS256* dizisinin ilaç direnci ile önemli bir ilişkisi olduğunu ortaya koymuştur. Bu ilaç direnç genleri *IS256* ile aynı transpozonda taşınıyor olabilir. *IS256*'nın antibiyotik direnç genleri ile ilişkisinin araştırılması için daha fazla moleküler çalışmaya ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda teikoplanin tarama agar yöntemi ile 11 MRSA ve 7 MSSA izolatı hVISA şüpheli olarak tespit edildi. Bu izolatların referans yöntem ile doğrulanması sonucu 2 MRSA ve 2 MSSA izolatı hVISA olarak bulundu. Bu nedenle teikoplanin tarama agar yöntemi ile yanlış pozitif sonuçlar alınabileceği akılda tutulmalı ve pozitif bulunan izolatlar altın standart yöntem olan PAP-AUC ile doğrulanmalıdır.

Çalışmamızda dikkate değer bir nokta MSSA izolatları arasında 2 izolatın hVISA olduğunun tespit edilmesidir. Hem yurtdışında hem ülkemizde hVISA'nın araştırıldığı çalışmaların MRSA izolatlarına odaklandığını görmekteyiz. Ancak glikopeptit gurubu antibiyotiklere azalmış duyarlılığa MSSA izolatlarında da rastlanmaktadır. Tedavi stratejilerinin gözden geçirilmesi, klinik yansımaların incelenmesi ve gerçek prevelansların belirlenebilmesi için MSSA izolatlarının da glikopeptitlere azalmış duyarlılık açısından araştırılması gerekmektedir.

7.KAYNAKLAR

1. Vancraeynest D, Hermans K, Haesebrouck F. Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs. *Veterinary microbiology*. 2004;103(3-4):241-7.
2. Schlegelová J, Babák V, Holasová M, Dendis M. The biofilm-positive *Staphylococcus epidermidis* isolates in raw materials, foodstuffs and on contact surfaces in processing plants. *Folia microbiologica*. 2008;53(6):500-4.
3. Nostro A, Cellini L, Ginestra G, D'Arrigo M, di Giulio M, Marino A, et al. Staphylococcal biofilm formation as affected by type acidulant. *Apmis*. 2014;122(7):648-53.
4. Petrelli D, Zampaloni C, d'Ercole S, Prenna M, Ballarini P, Ripa S, et al. Analysis of different genetic traits and their association with biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from central venous catheter infections. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2006;25(12):773-81.
5. Yazdani R, Oshaghi M, HAVAEI A, Pishva E, Salehi R, Sadeghizadeh M, et al. Detection of *icaAD* gene and biofilm formation in *Staphylococcus aureus* isolates from wound infections. 2006.
6. Gad GFM, El-Feky MA, El-Rehewy MS, Hassan MA, Abolella H, Abd El-Baky RM. Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2009;3(05):342-51.
7. Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* Genes and slime production in a collection of Staphylococcal strains from catheter-associated infections. *Journal of clinical microbiology*. 2001;39(6):2151-6.
8. Ammendolia M, Di Rosa R, Montanaro L, Arciola C, Baldassarri L. Slime production and expression of the slime-associated antigen by staphylococcal clinical isolates. *Journal of clinical microbiology*. 1999;37(10):3235-8.
9. Kwon AS, Park GC, Ryu SY, Lim DH, Lim DY, Choi CH, et al. Higher biofilm formation in multidrug-resistant clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *International journal of antimicrobial agents*. 2008;32(1):68-72.
10. Kiem S, Oh WS, Peck KR, Lee NY, Lee J-Y, Song J-H, et al. Phase variation of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* by IS256 insertion and its impact on the capacity adhering to polyurethane surface. *Journal of Korean medical science*. 2004;19(6):779-82.
11. Kot B, Sytykiewicz H, Sprawka I. Expression of the biofilm-associated genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in biofilm and planktonic conditions. *International journal of molecular sciences*. 2018;19(11):3487.
12. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The lancet*. 2001;358(9276):135-8.
13. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284(5418):1318-22.
14. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*. 2002;15(2):167-93.

15. Subramanian P, Shanmugam N, Sivaraman U, Kumar S, Selvaraj S. Antibiotic resistance pattern of biofilm-forming uropathogens isolated from catheterised patients in Pondicherry, India. *The Australasian medical journal*. 2012;5(7):344.
16. Savage VJ, Chopra I, O'Neill AJ. *Staphylococcus aureus* biofilms promote horizontal transfer of antibiotic resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(4):1968-70.
17. Piechota M, Kot B, Frankowska-Maciejewska A, Gruzewska A, Woźniak-Kosek A. Biofilm formation by methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* strains from hospitalized patients in Poland. *BioMed research international*. 2018;2018.
18. Montanaro L, Campoccia D, Pirini V, Ravaoli S, Otto M, Arciola CR. Antibiotic multiresistance strictly associated with IS256 and *ica* genes in *Staphylococcus epidermidis* strains from implant orthopedic infections. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 2007;83(3):813-8.
19. Kozitskaya S, Cho S-H, Dietrich K, Marre R, Naber K, Ziebuhr W. The bacterial insertion sequence element IS256 occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* isolates: association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides. *Infection and immunity*. 2004;72(2):1210-5.
20. Ebru U, Tekeli A, DOLAĞCI İ, Karahan ZC, Sancak B, Haşcelik G. Çeşitli Klinik Enfeksiyonlardan Elde Edilen *Staphylococcus aureus* İzolatlarında İnsersiyon Sekansı IS256'nın Biofilm Oluşumu Üzerine Etkisi. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*. 2009;62(02):53-7.
21. Pfaller MA, Murray PR, Rosenthal KS. *Medical microbiology*. Elsevier; 2016.
22. Gary W. Procop DLC, Geraldine S. Hall, William M. Janda, Elmer W. Koneman, Paul C. Schreckenberger, Gail L. Woods. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* 2017.
23. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, van Leeuwen W, van Belkum A, Verbrugh HA, et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *The Lancet infectious diseases*. 2005;5(12):751-62.
24. Del Giudice P. *Skin Infections Caused by Staphylococcus aureus*. *Acta Dermato-venereologica*. 2020.
25. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG. *Staphylococcus aureus* infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. *Clinical microbiology reviews*. 2015;28(3):603-61.
26. Benfield T, Espersen F, Frimodt-Møller N, Jensen A, Larsen A, Pallesen L, et al. Increasing incidence but decreasing in-hospital mortality of adult *Staphylococcus aureus* bacteraemia between 1981 and 2000. *Clinical microbiology and infection*. 2007;13(3):257-63.
27. Rodríguez-Créixems M, Alcalá L, Muñoz P, Cercenado E, Vicente T, Bouza E. Bloodstream infections: evolution and trends in the microbiology workload, incidence, and etiology, 1985-2006. *Medicine*. 2008;87(4):234-49.
28. Bishara J, Goldberg E, Leibovici L, Samra Z, Shaked H, Mansur N, et al. Healthcare-associated vs. hospital-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia. *International Journal of Infectious Diseases*. 2012;16(6):e457-e63.
29. Bassetti M, Trecarichi EM, Mesini A, Spanu T, Giacobbe D, Rossi M, et al. Risk factors and mortality of healthcare-associated and community-acquired *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Clinical microbiology and infection*. 2012;18(9):862-9.

30. van Hal SJ, Jones M, Gosbell IB, Paterson DL. Vancomycin heteroresistance is associated with reduced mortality in ST239 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* blood stream infections. *PloS one*. 2011;6(6).
31. Van Hal SJ, Jensen SO, Vaska VL, Espedido BA, Paterson DL, Gosbell IB. Predictors of mortality in *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clinical microbiology reviews*. 2012;25(2):362-86.
32. Cosgrove SE, Fowler VG, Jr. Management of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2008;46 Suppl 5:S386-93.
33. Asgeirsson H, Thalme A, Weiland O. *Staphylococcus aureus* bacteraemia and endocarditis—epidemiology and outcome: a review. *Infectious Diseases*. 2018;50(3):175-92.
34. Asgeirsson H, Thalme A, Kristjansson M, Weiland O. Incidence and outcome of *Staphylococcus aureus* endocarditis—a 10-year single-centre northern European experience. *Clinical Microbiology and Infection*. 2015;21(8):772-8.
35. Muñoz P, Kestler M, De Alarcon A, Miro JM, Bermejo J, Rodríguez-Abella H, et al. Current epidemiology and outcome of infective endocarditis: a multicenter, prospective, cohort study. *Medicine*. 2015;94(43).
36. Fowler VG, Miro JM, Hoen B, Cabell CH, Abrutyn E, Rubinstein E, et al. *Staphylococcus aureus* endocarditis: a consequence of medical progress. *Jama*. 2005;293(24):3012-21.
37. Miro JM, Anguera I, Cabell CH, Chen AY, Stafford JA, Corey GR, et al. *Staphylococcus aureus* native valve infective endocarditis: report of 566 episodes from the International Collaboration on Endocarditis Merged Database. *Clinical infectious diseases*. 2005;41(4):507-14.
38. Safdar N, Crnich CJ, Maki DG. The pathogenesis of ventilator-associated pneumonia: its relevance to developing effective strategies for prevention. *Respiratory care*. 2005;50(6):725-41.
39. Nseir S, Di Pompeo C, Pronnier P, Beague S, Onimus T, Saulnier F, et al. Nosocomial tracheobronchitis in mechanically ventilated patients: incidence, aetiology and outcome. *European Respiratory Journal*. 2002;20(6):1483-9.
40. Rello J, Quintana E, Ausina V, Castella J, Luquin M, Net A, et al. Incidence, etiology, and outcome of nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients. *Chest*. 1991;100(2):439-44.
41. Kollef MH, Shorr A, Tabak YP, Gupta V, Liu LZ, Johannes R. Epidemiology and outcomes of health-care-associated pneumonia: results from a large US database of culture-positive pneumonia. *Chest*. 2005;128(6):3854-62.
42. Lee MS, Walker V, Chen LF, Sexton DJ, Anderson DJ. The epidemiology of ventilator-associated pneumonia in a network of community hospitals: a prospective multicenter study. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2013;34(7):657-62.
43. Corrah T, Enoch D, Aliyu S, Lever A. Bacteraemia and subsequent vertebral osteomyelitis: a retrospective review of 125 patients. *QJM: An International Journal of Medicine*. 2011;104(3):201-7.
44. Clerc O, Prod'homme G, Greub G, Zanetti G, Senn L. Adult native septic arthritis: a review of 10 years of experience and lessons for empirical antibiotic therapy. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011;66(5):1168-73.
45. Rodríguez D, Pigrau C, Euba G, Cobo J, García-Lechuz J, Palomino J, et al. Acute haematogenous prosthetic joint infection: prospective evaluation of medical and surgical management. *Clinical microbiology and infection*. 2010;16(12):1789-95.
46. Vardakas K, Kontopidis I, Gkegkes I, Rafailidis P, Falagas M. Incidence, characteristics, and outcomes of patients with bone and joint infections due to community-

- associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a systematic review. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 2013;32(6):711-21.
47. Dhanoa A, Singh VA, Mansor A, Yusof MY, Lim KT, Thong KL. Acute haematogenous community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* osteomyelitis in an adult: case report and review of literature. *BMC infectious diseases*. 2012;12:270.
 48. Bennett MI, Tai Y, Symonds J. Staphylococcal meningitis following SynchroMed intrathecal pump implant: a case report. *Pain*. 1994;56(2):243-4.
 49. Rubin RH, Moellering Jr RC. Clinical, microbiologic and therapeutic aspects of purulent pericarditis. *The American journal of medicine*. 1975;59(1):68-78.
 50. Muder RR, Brennen C, Rihs JD, Wagener MM, Obman A, Obman A, et al. Isolation of *Staphylococcus aureus* from the urinary tract: association of isolation with symptomatic urinary tract infection and subsequent staphylococcal bacteremia. *Clinical infectious diseases*. 2006;42(1):46-50.
 51. Foster TJ. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *FEMS microbiology reviews*. 2017;41(3):430-49.
 52. Monaco M, de Araujo FP, Cruciani M, Coccia EM, Pantosti A. Worldwide epidemiology and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus aureus*: Springer; 2016. p. 21-56.
 53. Rountree PM, FREEMAN B. Infections caused by a particular phage type of *Staphylococcus aureus*. *Medical Journal of Australia*. 1955;2(5):157-61.
 54. Bynoe ET, Elder R, Comtois R. Phage-typing and antibiotic-resistance of staphylococci isolated in a general hospital. *Canadian journal of microbiology*. 1956;2(3):346-58.
 55. Skinner D, Keefer CS. Significance of bacteremia caused by *Staphylococcus aureus*: a study of one hundred and twenty-two cases and a review of the literature concerned with experimental infection in animals. *Archives of Internal Medicine*. 1941;68(5):851-75.
 56. Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *The Journal of clinical investigation*. 2003;111(9):1265-73.
 57. Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerging infectious diseases*. 2001;7(2):178-82.
 58. Mulligan ME, Murray-Leisure KA, Ribner BS, Standiford HC, John JF, Korvick JA, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a consensus review of the microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management. *The American journal of medicine*. 1993;94(3):313-28.
 59. Chambers HF, DeLeo FR. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. *Nature Reviews Microbiology*. 2009;7(9):629-41.
 60. Faoagali J, Thong M, Grant D. Ten years' experience with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a large Australian hospital. *Journal of Hospital Infection*. 1992;20(2):113-9.
 61. Fridkin SK, Hageman JC, Morrison M, Sanza LT, Como-Sabetti K, Jernigan JA, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease in three communities. *New England Journal of Medicine*. 2005;352(14):1436-44.
 62. Campanile F, Bongiorno D, Borbone S, Stefani S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* evolution: the multiple facets of an old pathogen. *Eur Infect Dis*. 2010;4(70):e6.
 63. Iidelevich EA, Lanckohr C, Horn D, Wieler LH, Becker K, Koeck R. Multidrug-resistant bacteria in Germany. The impact of sources outside healthcare facilities. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*. 2016;59(1):113-23.

64. Kock R, Ballhausen B, Bischoff M, Cuny C, Eckmanns T, Fetsch A, et al. The impact of zoonotic MRSA colonization and infection in Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2014;127(9-10):384-98.
65. Voss A, Loeffen F, Bakker J, Klaassen C, Wulf M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerging infectious diseases.* 2005;11(12):1965.
66. Van Rijen MML, Van Keulen PH, Kluytmans JA. Increase in a Dutch hospital of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* related to animal farming. *Clinical Infectious Diseases.* 2008;46(2):261-3.
67. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich A, Bruggeman C, Stobberingh E. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection.* 2007;13(3):222-35.
68. Stefani S, Goglio A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: related infections and antibiotic resistance. *International Journal of Infectious Diseases.* 2010;14:S19-S22.
69. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: molecular characterization, evolution, and epidemiology. *Clinical microbiology reviews.* 2018;31(4):e00020-18.
70. Ito T, Hiramatsu K. Acquisition of methicillin resistance and progression of multiantibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Yonsei medical journal.* 1998;39(6):526-33.
71. García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *The Lancet infectious diseases.* 2011;11(8):595-603.
72. Ito T, Hiramatsu K, Tomasz A, de Lencastre H, Perreten V, Holden M, et al. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome elements (IWGSCC). 2012. Guidelines for reporting novel *mecA* gene homologues. *Antimicrob Agents Chemother.* 56:4997-9.
73. Baba T, Kuwahara-Arai K, Uchiyama I, Takeuchi F, Ito T, Hiramatsu K. Complete genome sequence of *Micrococcus caseolyticus* strain JSCS5402, reflecting the ancestral genome of the human-pathogenic staphylococci. *Journal of bacteriology.* 2009;191(4):1180-90.
74. Becker K, Van Alen S, Idelevich EA, Schleimer N, Seggwiß J, Mellmann A, et al. Plasmid-encoded transferable *mecB*-mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Emerging infectious diseases.* 2018;24(2):242.
75. EUCAST T. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Basel.* 2019.
76. DeLeo FR, Chambers HF. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *The Journal of clinical investigation.* 2009;119(9):2464-74.
77. Leclercq R, Derlot E, Duval J, Courvalin P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *New England Journal of Medicine.* 1988;319(3):157-61.
78. Control CfD, Prevention. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin--United States, 2002. *MMWR Morbidity and mortality weekly report.* 2002;51(26):565.
79. Saha B, Singh AK, Ghosh A, Bal M. Identification and characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Kolkata (South Asia). *Journal of medical microbiology.* 2008;57(1):72-9.
80. Sievert DM, Rudrik JT, Patel JB, McDonald LC, Wilkins MJ, Hageman JC. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002–2006. *Clinical Infectious Diseases.* 2008;46(5):668-74.

81. Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. *Clinical microbiology reviews*. 2010;23(1):99-139.
82. Boyle-Vavra S, Berke SK, Lee JC, Daum RS. Reversion of the glycopeptide resistance phenotype in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000;44(2):272-7.
83. Boyle-Vavra S, Carey RB, Daum RS. Development of vancomycin and lysostaphin resistance in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001;48(5):617-25.
84. de Lassence A, Hidri N, Timsit J-F, Joly-Guillou M-L, Thiery G, Boyer A, et al. Control and outcome of a large outbreak of colonization and infection with glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. *Clinical infectious diseases*. 2006;42(2):170-8.
85. Alos J-I, García-Cañas A, García-Hierro P, Rodríguez-Salvanés F. Vancomycin MICs did not creep in *Staphylococcus aureus* isolates from 2002 to 2006 in a setting with low vancomycin usage. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2008;62(4):773-5.
86. Moore MR, Perdreau-Remington F, Chambers HF. Vancomycin treatment failure associated with heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a patient with endocarditis and in the rabbit model of endocarditis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003;47(4):1262-6.
87. Marco F, de la Mària CG, Armero Y, Amat E, Soy D, Moreno A, et al. Daptomycin is effective in treatment of experimental endocarditis due to methicillin-resistant and glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(7):2538-43.
88. Nannini E, Murray BE, Arias CA. Resistance or decreased susceptibility to glycopeptides, daptomycin, and linezolid in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Current opinion in pharmacology*. 2010;10(5):516-21.
89. Bazan JA, Martin SI, Kaye KM. Newer beta-lactam antibiotics: doripenem, ceftobiprole, ceftaroline, and cefepime. *Infectious Disease Clinics*. 2009;23(4):983-96.
90. Saravolatz L, Pawlak J, Johnson L. In vitro activity of ceftaroline against community-associated methicillin-resistant, vancomycin-intermediate, vancomycin-resistant, and daptomycin-nonsusceptible *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(7):3027-30.
91. Nakajima Y. Mechanisms of bacterial resistance to macrolide antibiotics. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 1999;5(2):61-74.
92. Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen LB, Rood J, Seppala H. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1999;43(12):2823-30.
93. Cohen MA, Huband MD. Activity of clinafloxacin, trovafloxacin, quinupristin/dalfopristin, and other antimicrobial agents versus *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibility to vancomycin. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 1999;33(1):43-6.
94. Lentino JR, Narita M, Yu V. New antimicrobial agents as therapy for resistant gram-positive cocci. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2008;27(1):3-15.
95. Gold HS, Pillai SK. Antistaphylococcal agents. *Infectious disease clinics of North America*. 2009;23(1):99-131.

96. García MS, De la Torre MÁ, Morales G, Peláez B, Tolón MJ, Domingo S, et al. Clinical outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. *Jama*. 2010;303(22):2260-4.
97. Florescu I, Beuran M, Dimov R, Razbadauskas A, Bochan M, Fichev G, et al. Efficacy and safety of tigecycline compared with vancomycin or linezolid for treatment of serious infections with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* or vancomycin-resistant enterococci: a Phase 3, multicentre, double-blind, randomized study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008;62(suppl_1):i17-i28.
98. Ünlü M, Vardar-Ünlü G, Yağmuroğlu A, Yıldırım D. Klinik örneklerden soyutlanan *Staphylococcus aureus* suşlarına tigesiklin etkinliği. *Ankem Derg*. 2009;23(1):13-6.
99. Shams W, Walker ES, Levy F, Reynolds SA, Peterson SM, Sarubbi FA. Comparative activity of telavancin and other antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates collected from 1991 to 2006. *Chemotherapy*. 2010;56(5):411-6.
100. Laitman I, Natan M, Banin E, Margel S. Synthesis and characterization of fluoro-modified polypropylene films for inhibition of biofilm formation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2014;115:8-14.
101. Simoes M, Simões LC, Vieira MJ. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology*. 2010;43(4):573-83.
102. Grinholc M, Wegrzyn G, Kurlenda J. Evaluation of biofilm production and prevalence of the *icaD* gene in methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with nosocomial infections and carriers. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2007;50(3):375-9.
103. TEMEL A, ERAÇ B. Bakteriyel biyofilmler: saptama yöntemleri ve antibiyotik direncindeki rolü. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*. 2018;48(1):1-13.
104. Freeman D, Falkiner F, Keane C. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of clinical pathology*. 1989;42(8):872-4.
105. Cengiz SA, Us E, Cengiz AT. Slime faktörünün klinikteki yeri ve önemi. 2006.
106. Christensen GD, Simpson WA, Younger J, Baddour L, Barrett F, Melton D, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of clinical microbiology*. 1985;22(6):996-1006.
107. Stepanović S, Vuković D, Hola V, BONAVENTURA GD, Djukić S, Čirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *Apmis*. 2007;115(8):891-9.
108. Jahid IK, Ha S-D. A review of microbial biofilms of produce: future challenge to food safety. *Food Science and Biotechnology*. 2012;21(2):299-316.
109. Mah T-FC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology*. 2001;9(1):34-9.
110. Lynch AS, Robertson GT. Bacterial and fungal biofilm infections. *Annu Rev Med*. 2008;59:415-28.
111. Dongari-Bagtzoglou A. Pathogenesis of mucosal biofilm infections: challenges and progress. *Expert review of anti-infective therapy*. 2008;6(2):201-8.
112. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in microbiology*. 2005;13(1):34-40.
113. Wootton M, MacGowan AP, Walsh TR, Howe RA. A multicenter study evaluating the current strategies for isolating *Staphylococcus aureus* strains with reduced susceptibility to glycopeptides. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(2):329-32.

114. Róžańska A, Chmielarczyk A, Romaniszyn D, Bulanda M, Walkowicz M, Osuch P, et al. Antibiotic resistance, ability to form biofilm and susceptibility to copper alloys of selected staphylococcal strains isolated from touch surfaces in Polish hospital wards. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*. 2017;6(1):80.
115. Vasudevan P, Nair MKM, Annamalai T, Venkitanarayanan KS. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Veterinary microbiology*. 2003;92(1-2):179-85.
116. Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A, et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. *Infection control and hospital epidemiology*. 2013;34(1):1-14.
117. Suetens C, Hopkins S, Kolman J, Högberg L. Point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals 2011-2012. European Centre for Disease Prevention and Control. DP a C(ECDC) Stockholm. 2013.
118. T.C. Sağlık Bakanlığı HSGM. Ulusal Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Süveyans Ağı (USHİESA) ETKEN DAĞILIMI ve ANTİBİYOTİK DİRENÇ RAPORU 2018. 2019.
119. Lee AS, de Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature reviews Disease primers*. 2018;4(1):1-23.
120. Diekema DJ, Pfaller MA, Shortridge D, Zervos M, Jones RN, editors. Twenty-year trends in antimicrobial susceptibilities among *Staphylococcus aureus* from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Open forum infectious diseases*; 2019: Oxford University Press US.
121. T.C. Sağlık Bakanlığı HSKB. ULUSAL ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ SÜVEYANS SİSTEMİ 2011 YILLIK RAPORU. 2011.
122. T.C. Sağlık Bakanlığı THSK. ULUSAL ANTİMİKROBİYAL DİRENÇ SÜVEYANS SİSTEMİ 2016 YILLIK RAPORU. 2016.
123. Rolain J-M, Abat C, Brouqui P, Raoult D. Worldwide decrease in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: do we understand something? *Clinical Microbiology and Infection*. 2015;21(6):515-7.
124. Cosgrove SE, Sakoulas G, Perencevich EN, Schwaber MJ, Karchmer AW, Carmeli Y. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clinical infectious diseases*. 2003;36(1):53-9.
125. Ozmen Capin BB, Tekeli A, Karahan ZC. Evaluation of the Presence and Characterization of Vancomycin-Intermediate and Heterogeneous Vancomycin-Intermediate Level Resistance Among Bloodstream Isolates of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbial Drug Resistance*. 2020;26(3):238-44.
126. Biedenbach DJ, Alm RA, Lahiri SD, Reiszner E, Hoban DJ, Sahm DF, et al. In vitro activity of ceftaroline against *Staphylococcus aureus* isolated in 2012 from Asia-Pacific countries as part of the AWARE surveillance program. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(1):343-7.
127. Hoban D, Biedenbach D, Sahm D, Reiszner E, Iaconis J. Activity of ceftaroline and comparators against pathogens isolated from skin and soft tissue infections in Latin America—results of AWARE surveillance 2012. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2015;19(6):596-603.
128. Karlowsky JA, Biedenbach DJ, Bouchillon SK, Iaconis JP, Reiszner E, Sahm DF. In vitro activity of ceftaroline against bacterial pathogens isolated from skin and soft tissue infections in Europe, Russia and Turkey in 2012: results from the Assessing Worldwide

- Antimicrobial Resistance Evaluation (AWARE) surveillance programme. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016;71(1):162-9.
129. Dhand A, Sakoulas G. Reduced vancomycin susceptibility among clinical *Staphylococcus aureus* isolates ('the MIC Creep'): implications for therapy. *F1000 medicine reports*. 2012;4.
130. Mirza HC, Sancak B, Gür D. The prevalence of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* and heterogeneous VISA among methicillin-resistant strains isolated from pediatric population in a Turkish university hospital. *Microbial Drug Resistance*. 2015;21(5):537-44.
131. Zhang S, Sun X, Chang W, Dai Y, Ma X. Systematic review and meta-analysis of the epidemiology of vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates. *PloS one*. 2015;10(8):e0136082.
132. Kuşcu F, Öztürk DB, Gürbüz Y, Tütüncü EE, Şencan İ, Gül S. Metisiline dirençli stafilokoklarda azalmış vankomisin duyarlılığının araştırılması. *Mikrobiyol Bul*. 2011;45(2):248-57.
133. Sancak B, Ercis S, Menemenlioğlu D, Çolakoğlu Ş, Haşcelik G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin in a Turkish university hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005;56(3):519-23.
134. Cesur S, Irmak H, ŞİMŞEK H, Cöplü N, Kiliç H, ARSLAN U, et al. Türkiye’de yedi ildeki hastanelerin yoğun bakım ünitelerinden izole edilen MRSA suşlarında VISA-VRSA araştırılması ve antibiyotik duyarlılık durumlarının saptanması. *Mikrobiyol Bul*. 2012;46(3):352-8.
135. Hu J, Ma XX, Tian Y, Pang L, Cui LZ, Shang H. Reduced vancomycin susceptibility found in methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Northeast China. *PloS one*. 2013;8(9):e73300.
136. Belbase A, Pant ND, Nepal K, Neupane B, Baidhya R, Baidya R, et al. Antibiotic resistance and biofilm production among the strains of *Staphylococcus aureus* isolated from pus/wound swab samples in a tertiary care hospital in Nepal. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*. 2017;16(1):15.
137. Demir C, Demirci M, Yigin A, Tokman HB, Yildiz SC. Presence of biofilm and adhesin genes in *Staphylococcus aureus* strains taken from chronic wound infections and their genotypic and phenotypic antimicrobial sensitivity patterns. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2020;29:101584.
138. Goudarzi M, Mohammadi A, Amirpour A, Fazeli M, Nasiri MJ, Hashemi A, et al. Genetic diversity and biofilm formation analysis of *Staphylococcus aureus* causing urinary tract infections in Tehran, Iran. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2019;13(09):777-85.
139. Melo PdC, Ferreira LM, Nader Filho A, Zafalon LF, Vicente HIG, Souza Vd. Comparison of methods for the detection of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from bovine subclinical mastitis. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2013;44(1):119-24.
140. Batista IR, Prates ACL, de Souza Santos B, Araújo JCC, de Oliveira Bonfim YC, Rodrigues MVP, et al. Determination of antimicrobial susceptibility and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolated from white coats of health university students. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2019;18(1):1-7.
141. Ghasemian A, Peerayeh SN, Bakhshi B, Mirzaee M. Comparison of biofilm formation between methicillin-resistant and methicillin-susceptible isolates of *Staphylococcus aureus*. *Iranian biomedical journal*. 2016;20(3):175.
142. Bhattacharya S, Bir R, Majumdar T. Evaluation of multidrug resistant *Staphylococcus aureus* and their association with biofilm production in a Tertiary Care

Hospital, Tripura, Northeast India. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*. 2015;9(9):DC01.

143. McCarthy H, Rudkin JK, Black NS, Gallagher L, O'Neill E, O'Gara JP. Methicillin resistance and the biofilm phenotype in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2015;5:1.

144. Batistão D, Amaral de Campos P, Camilo NC, Royer S, Araújo BF, Naves KSC, et al., editors. *Biofilm formation of Brazilian methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains: prevalence of biofilm determinants and clonal profiles* 2016: Society for General Microbiology.

145. Mir Z, Farahani NN, Abbasian S, Alinejad F, Sattarzadeh M, Pouriran R, et al. The prevalence of exotoxins, adhesion, and biofilm-related genes in *Staphylococcus aureus* isolates from the main burn center of Tehran, Iran. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. 2019;22(11):1267.

146. Kuroda M, Sekizuka T, Matsui H, OOSUGA J, Ohshima T, Hideaki H. IS256-mediated overexpression of the WalkR two-component system regulon contributes to reduced vancomycin susceptibility in a *Staphylococcus aureus* clinical isolate. *Frontiers in Microbiology*. 2019;10:1882.

147. Maki H, McCallum N, Bischoff M, Wada A, Berger-Bächi B. *tcaA* inactivation increases glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(6):1953-9.