

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***STAPHYLOCOCCUS AUREUS ÜZERİNE
VANKOMİSİNİN SUBMİNİMAL İNHİBİTÖR
KONSANTRASYON VE MİNİMAL İNHİBİTÖR
KONSANTRASYONLARDA VİRULANSA ETKİSİ***

ECE SÖKMEN

MİKROBİYOLOJİ YÜKSEKLİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2011

TEZ KODU : DEU.HSI-MSc-2008970025

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ÜZERİNE
VANKOMİSİNİN SUBMİNİMAL İNHİBİTÖR
KONSANTRASYON VE MİNİMAL İNHİBİTÖR
KONSANTRASYONLARDA VİRULANSA ETKİSİ**

MİKROBİYOLOJİ YÜKSEKLİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ECE SÖKMEN

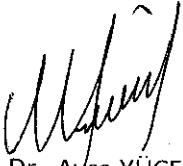
Danışman Öğretim Üyesi : Prof. Dr. Hakkı BAHAR
Danışman Öğretim Üyesi : Prof. Dr. Hüseyin BASKIN

TEZ KODU : DEU.HSI-MSc-2008970025

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikrobiyoloji Yüksek Lisans programı öğrencisi Ece SÖKMEN “**STAPHYLOCOCCUS AUREUS ÜZERİNE VANKOMİSİNİN SUBMİNİMAL İNHİBİTÖR KONSANTRASYON VE MİNİMAL İNHİBİTÖR KONSANTRASYONLARDA VİRULANSA ETKİSİ**” konulu Yüksek Lisans tezini , 21/06/2011 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.


Prof. Dr. İ. Hakkı BAHAR

BAŞKAN


Prof. Dr. Ayşe YÜCE

ÜYE


Doç. Dr. A. Aydan ÖZKÜTÜK

ÜYE

Prof. Dr. Özlem YILMAZ

ÜYE (Yedek)

Prof. Dr. Nedim ÇAKIR

ÜYE (Yedek)

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLO DİZİNİ.....	iv
ŞEKİL DİZİNİ	vi
KISALTMALAR	vii
TEŞEKKÜR.....	viii
ÖZET	1
ABSTRACT	3

1- GİRİŞ VE AMAÇ 5

2- GENEL BİLGİLER 6

2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un Genel Özellikleri	6
2.1.1- <i>Staphylococcus aureus</i> 'un Mikrobiyolojik Özellikleri	6
2.1.2- <i>Staphylococcus aureus</i> 'un Epidemiyolojisi	6
2.1.3- <i>Staphylococcus aureus</i> Enfeksiyonları	7
2.1.4- <i>Staphylococcus aureus</i> 'un Virulans Faktörleri	8
2.2. Biyofilm.....	10
2.2.1- Mikrobiyal Biyofilmler.....	10
2.2.2- Biyofilm Yapısı ve Oluşumu.....	10
2.2.3- <i>Staphylococcus aureus</i> – biyofilm ilişkisi.....	13
2.3. Yapışkan Matriks Moleküllerini Tanıyan Mikrobiyal Yüzey Bileşenleri	13
2.3.1- Stafilokokkal Protein A (Spa)	14
2.3.2- Clumping factor” Kümeleştirme Faktörü.....	14
2.4. Salınan Fibrinojen Bağlayan Proteinler.....	14
2.4.1- <i>Staphylococcus aureus</i> – Koagülaz.....	14
2.4.2- Eap (ekstraselüler adherens proteini)	15
2.4.3- Efb (ekstraselüler fibrinojen bağlayan)	16
2.5. <i>Staphylococcus aureus</i> – Hidrolazlar ve Hemolizinler	16
2.5.1- Stafilokinaz (Sak)	16
2.5.2- Hyaluronidaz	16
2.5.3- Proteazlar	17
2.5.4- Lipazlar.....	17
2.5.5- Hemolizinler	18
2.6. Vankomisin.....	18

3- GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	19
3.1. Araştırmanın Tipi	19
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	19
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi.....	19
3.4. Çalışma Materyali	19
3.5. Araştırmanın Değişkenleri.....	19
3.6. Veri toplama araçları	20
3.6.1- Kimyasal Maddeler ve Diğer Araç-Gereçler	21
3.6.2- Besiyerlerinin Hazırlanışı	21
3.6.2.1- Sütli Besiyeri.....	21
3.6.2.2- Yumurta Sarılı Besiyeri	21
3.6.2.3- Katyon Eklenmiş Muller Hinton Broth.....	22
3.6.3- Suşun Hazırlanması.....	22
3.6.4- Mikro Dilusyon Yöntemi ile MİK ve Sub-MİK'lerin Belirlenmesi	22
3.6.5- Protez, Lipaz, Hemoliz Aktivitelerinin Belirlenmesi	22
3.6.6- Koagülaz Aktvitesinin Belirlenmesi.....	23
3.6.6.1- Lam Koagülaz.....	23
3.6.6.2- Tüp Koagülaz.....	23
3.6.7- Lateks Agglutinasyon	23
3.6.8-Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi.....	23
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi.....	24
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	24
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	24
3.10. Etik Kurul Onayı	24
4- BULGULAR	25
4.1. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923'ün Vankomisin Etkisindeki Minimum İnhibisyon Konsantrasyon Değeri	25
4.2. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923'ün Vankomisin Etkisindeki Patojetine Yanıtları ...	27

4.2.1- Lateks Aglutinasyon Bulguları.....	27
4.2.2- Lam Koagülaz Bulguları.....	27
4.2.3- Biyofilm oluşumu Bulguları	28
4.2.4-Tüp Koagülaz Bulguları.....	30
4.2.5- Lipaz, Proteaz, Hemoliz Bulguları.....	31
5- DEĞERLENDİRMELER	36
6- TARTIŞMA	38
7- SONUÇ VE ÖNERİLER.....	42
8- KAYNAKLAR.....	43
9- EKLER.....	47
9.1. Suş Kullanım İzni	47
9.2. Etik Kurul Onayı	48
9.3. Özgeçmiş	51

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1: <i>S. aureus</i> 'un adhesinleri ve adhesinlerin bağlandığı hedefler	8
Tablo 2: Deney 1'e ait pleytin 450nm'deki ölçümleri ve <i>S. aureus</i> 'un vankomisin MİK değerleri	25
Tablo 3: Deney 2'ye ait pleytin 450nm'deki ölçümleri ve <i>S. aureus</i> 'un vankomisin MİK değerleri.....	26
Tablo 4: Deney 3'e ait pleytin 450nm'deki ölçümleri ve <i>S. aureus</i> 'un vankomisin MİK değerleri.....	26
Tablo 5: 3 deneydeki <i>S. aureus</i> 'un vankomisinin MİK üzeri ve altı konsantrasyonlarına maruz kaldıktan sonra lateks aglutinasyon testine yanıtları	27
Tablo 6: 3 deneydeki <i>S. aureus</i> 'un vankomisinin MİK üzeri ve altı konsantrasyonlarına maruz kaldıktan sonra lam koagülaz testine yanıtları	27
Tablo 7: Deney1'e ait pleytin kristal viyole yöntemi sonrası 540nm'deki değerleri	28
Tablo 8: Deney2'ye ait pleytin kristal viyole yöntemi sonrası 540nm'deki değerleri	28
Tablo 9: Deney3'e ait pleytin kristal viyole yöntemi sonrası 540nm'deki değerleri	29
Tablo 10: 3 deneyin biyofilm sonuçları.....	29
Tablo 11: 3 Tüp koagülaz sonuçları	30
Tablo 12: <i>S. aureus</i> 'un farklı vankomisin konsantrasyonlarının post antibiyotik etkisinde lipaz oluşturması.....	31
Tablo 13: <i>S. aureus</i> 'un farklı vankomisin konsantrasyonlarının post antibiyotik etkisinde proteaz oluşturması.....	31
Tablo 14: <i>S. aureus</i> 'un farklı vankomisin konsantrasyonlarının post antibiyotik etkisinde hemoliz oluşturması.....	32

Tablo 15: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923'nin, vankomisinin post antibiyotik etkisindeki virulansı.....	36
--	----

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1: <i>S. aureus</i> 'un yaptığı hastalıklar ve en sık kolonize olduğu yer.....	7
Şekil 2: Biyoyüzeye tutunmuş bakteriyel biyofilm.....	11
Şekil 3: Mikrobiyota veya biyoyüzeylerde biyofilm oluşumunun şematik gösterimi.....	12
Şekil 4: Konak proteinlerine tutunan <i>YMMTMYB</i> adı verilen <i>S. aureus</i> hücre yüzey proteinleri	13
Şekil 5: Mikropleyt okuyucu.....	20
Şekil 6: Lateks aglutinasyon kiti.....	20
Şekil 7: Vankomisiniz ortamdan ve vankomisinin %50 MİK, %25 MİK, %12,5 MİK'lerinden % 5 koyun kanlı agara yapılan ekimlerde oluşan hemolizler.....	33
Şekil 8: Vankomisinin MİK, 2 MİK, 4 MİK, 8 MİK'lerinden % 5 koyun kanlı agara yapılan ekimlerde oluşan hemolizler.....	33
Şekil 9: Vankomisiniz ortamdan ve vankomisinin %50 MİK, %25 MİK, %12,5 MİK'lerinden yumurtalı agara yapılan ekimlerde lipazın gözlemlenmesi.....	34
Şekil 10: Vankomisinin MİK, 2 MİK, 4 MİK, 8 MİK'lerinden yumurtalı agara yapılan ekimlerde lipazın gözlenmesi.....	34
Şekil 11: Vankomisiniz ortamdan ve vankomisinin %50 MİK, %25 MİK, %12,5 MİK'lerinden yağsız süt tozlu agara yapılan ekimlerde proteazın gözlemlenmesi.....	35
Şekil 12: Vankomisinin MİK, 2 MİK, 4 MİK, 8 MİK'lerinden yağsız süt tozlu agara yapılan ekimlerde proteazın gözlenmesi	35

KISALTMALAR DİZİNİ

Bap.....	“Biofilm Associated Protein”
PBS.....	“Phosphate Buffered Saline”
CRF	“Coagulase Reacting Factor”
CAPD	“Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis”
Dsg1.....	Desmoglein-1
Eap.....	Ekstraselüler Adherans Proteini
ELISA.....	“Enzyme-linked Immunosorbent Assay”
EPS.....	“Extracellular polymer substances”
ET.....	Eksofoliyatif Toksin
Fg	Fibrinojen
Fn.....	Fibronektin
Fnbp.....	Fibronektin Bağlayan Protein
Geh.....	Gliserol Ester Hidrolaz (lipaz)
HIV.....	“Human Immunodeficiency Virus”
MBK.....	Minumum Bakterisidal Konsantrasyon
MİK.....	Minumum İnhibisyon Konsantrasyonu
MRSA.....	“Methicillin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> ”
NaCl.....	Sodyum Klorür
PBP.....	Penisilin Bağlayan Protein
PNSG.....	poli-N-suksinil-β-1,6 glukozamin
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SGRYM.....	Salınan geniş repertuar yapışkan moleküller
TA.....	Teikoik asit
TSST -1.....	(“Toxic Shock Syndrome Toxin -1”) Toksik Şok Sendrom Toksini-1
YMMTMYB.....	Yapışkan Matriks Moleküllerini Tanıyan Mikrobiyal Yüzey Bileşenler

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bana her konuda yardım eden danışmanım Prof. Dr. İsmail Hakkı BAHAR'a, bilgi birikimini bana sunarak gelişimime destek olan ikinci danışmanım Prof. Dr. Hüseyin BASKIN'a ve Arş. Gör. Vahide BAYRAKAL'a sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca yüksek lisans öğrenimim boyunca geçirdiğim her günün anlamlı ve kıymetli olmasını sağlayan DEÜ Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki hocalarıma, arkadaşlarıma ve aileme teşekkürü bir borç bilirim.

STAPHYLOCOCCUS AUREUS ÜZERİNE VANKOMİSİNİN SUBMİNİMAL İNHİBİTÖR
KONSANTRASYON VE MİNİMAL İNHİBİTÖR KONSANTRASYONLARDA

VİRULANSA ETKİSİ

Dokuz Eylül Üniversitesi,

Sağlık Bilimleri Enstitüsü,

Ece SÖKMEN,

ece.sokmen@ogr.deu.edu.tr

ÖZET

Amaç: Vankomisinin *Staphylococcus aureus* ATCC 25923'ün virulansını nasıl etkilediğini gözlemlemektir. Virulans faktörleri değerlendirilirken vankomisinin minimum inhibitör konsantrasyonun (MİK) üst değerleri (supra-MİK), MİK değerleri ve sub-MİK değerlerinde, hemoliz, lipaz, proteaz, tüp koagülaz, lam koagülaz, lateks aglutinasyon ve biyofilm virulans faktörleri olarak değerlendirmeye alınmıştır.

Yöntem: Mikrodilasyon yöntemi ile *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 için vankomisinin en düşük baskılayıcı yoğunluğu (MİK'i, minimal inhibisyon konsantrasyonu) bulunmuştur. Ardından MİK altı (sub-MİK), MİK ve MİK üzeri (supra-MİK) yoğunluklarda hemoliz, lipaz, proteaz, biyofilm, koagülaz, lateks aglutinasyon oluşturmaya bakılmıştır. Yumurtalı besiyerinde lipaz, yağsız süt tozlu besiyerinde proteaz, %5 koyun kanlı besiyerinde hemoliz özellikleri incelenmiştir. Tüp koagülaz yöntemiyle salınan koagülaz, lam koagülaz yöntemiyle bağlı koagülaza ve lateks aglutinasyon ile protein A ve kümeleştirici faktörün ("clumping factor") varlığına bakılmıştır. Biyofilm oluşumu kristal viyole yöntemi ile incelenmiştir.

Bulgular: Vankomisinin MİK değeri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 için 1µg/ml bulundu. Lam koagülaz vankomisinin MİK(1µg/ml), %50 MİK (0,5 µg/ml), %25 MİK (0,25 µg/ml) ve %12,5 MİK (0,125 µg/ml) değerlerinde pozitif bulunmuştur. Lateks aglutinasyon %50 MİK (0,5 µg/ml), %25 MİK (0,25 µg/ml) ve %12,5 MİK (0,125 µg/ml) değerlerinde pozitif bulunmuştur. Tüp koagülaz %50 MİK (0,5 µg/ml), %25 MİK (0,25 µg/ml) ve %12,5 MİK (0,125 µg/ml) değerlerinde 2. saatten itibaren pozitif bulunmuştur. Lipaz MİK(1µg/ml), %50 MİK (0,5 µg/ml), %25 MİK (0,25 µg/ml) ve %12,5 MİK (0,125 µg/ml) değerlerinde pozitif bulunmuştur. Proteaz supra-MİK, MİK ve sub-MİK'lerde pozitif gözlenmiştir. Hemoliz supra-MİK, MİK ve sub-MİK'lerde pozitif gözlenmiştir. Biyofilm %50 MİK (0,5

$\mu\text{g/ml}$), %25 MİK (0,25 $\mu\text{g/ml}$) ve %12,5 MİK (0,125 $\mu\text{g/ml}$) değerlerinde pozitif bulunmuştur.

Değerlendirmeler: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, vankomisine maruz kaldıktan sonra katı besiyerinde üreme yeteneğini kaybetmediği taktirde lipaz, proteaz ve hemoliz özelliklerinin varlığını aynen korumuştur. Çalışmamızda, *Staphylococcus aureus*'un mikroçevre koşullarını oluşturan vankomisinin varlığında, bakterinin davranışlarının (fiziopatolojisinin) değişmediği gözlemlendi.

Tartışma: Bu çalışmada elde edilen sonuçlar bize, daha sonra yapılabilecek olan çoğunluğu algılama (quorum sensing) ile ilgili ileriki çalışmalara temel oluşturma konusunda değerli fikirler vermektedir. Ayrıca vankomisinin kullanmanın “son çare olduğu” klinik durumlarda vankomisin konsantrasyonlarında *Staphylococcus aureus*' un üremesi, bakteri virülansının etkilenmeyeceğini göstermektedir. Buna bağlı olarak vankomisinin bakterinin davranışlarını genotipik ve fenotipik olarak etkilemediğini söylemek mümkündür.

Anahtar kelimeler: *Staphylococcus aureus*, vankomisin, eksoenzimler, yüzey proteinleri, biyofilm

THE EFFECT OF MINIMAL INHIBITORY CONCENTRATION AND SUBMINIMUM
INHIBITORY CONCENTRATIONS OF VANCOMYCIN TO VIRULENCE IN
STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Dokuz Eylül University Institute of Health Sciences,
Ece SÖKMEN,
ece.sokmen@ogr.deu.edu.tr

SUMMARY

Objective: The purpose of this study was to observe how vancomycin influences *Staphylococcus aureus* ATCC 25923's virulence. Lipases, proteases, hemolysis, slide coagulases, tube coagulases, latex agglutination and biofilm determined as virulence factors.

Method: Minimal inhibitory concentration (MIC) of vancomycin against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was detected by broth microdilution method. Then production of *Staphylococcus aureus* lipases, proteases, biofilm, coagulases and latex agglutination tests were checked under sub-MIC and supra-MIC of vancomycin. Lipases were observed on medium with egg-yolk and proteases observed on medium with skim milk. Hemolysis was observed on Colombia agar with %5 sheep blood. Released coagulase was observed by tube coagulase test and attached coagulase was observed by slide coagulase test. Protein A and clumping factor were observed by latex agglutination test. Biofilm production was detected by crystal violet method.

Results : Minimal inhibitory concentration (MIC) of vancomycin against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was detected 1µg/ml. Slide coagulase were positive under MIC, MIC %50, MIC %25, MIC %12,5 of vancomycin. Latex agglutination were positive under MIC %50, MIC %25, MIC %12,5 of vancomycin. Biofilm were positive under MIC %50, MIC %25, MIC %12,5 of vancomycin. Under MIC %50, MIC %25, MIC %12,5 of vancomycin concentrations tube coagulase became positive at second hour. After 24 hour incubation at 36°C lipase, protease and hemolysis were positive from MIC, MIC %50, MIC %25, MIC %12,5 of vancomycin.

Conclusions: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 conserved production of lipase, protease and hemolysis after exposed to vancomycin. In our study, behaviour and physiopathology of *Staphylococcus aureus* didn't change by microenvironment conditions with vancomycin.

Discussion: We tried to illuminate pathogenicity and physiology of *Staphylococcus aureus* when exposed to vancomycin and we tried to form a basis to next studies as quorum sensing studies and point out clinical cases.

Key words : *Staphylococcus aureus*, vancomycin, exoenzymes, surface proteins, biofilm

1- GİRİŞ VE AMAC

Staphylococcus aureus, klinikte deri ve mukoza enfeksiyonları, sepsis ve endokarditler gibi önemli hastalıklara neden olur. Patojenitesinde enzimler ve yüzey antijenlerinin oluşturulması önemlidir. Kullanılan antibiyotiğin çeşidine ve miktarına bağlı olarak *S. aureus*'da biyofilm ve virulans faktörleri değişebilmektedir. Sub-MİK'lerdeki antibiyotikler klinik durumlarda patojen bakterinin virulansında değişikliklere neden olabilir (1). *S. aureus*'un klinik bir suşunun ve standart bir suş olan *S. aureus ATCC 25923*'ün gentamisininin minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) ve minimum inhibisyon konsantrasyon altı (sub-MİK) değerlerinde biyofilm ve koagülaz oluşturduğu görülmüştür (2). Uygun olmayan antibiyotiklerin kullanılması sadece (Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*) MRSA'nın aşırı üremesini teşviklemez aynı zamanda patojenliği de arttırdığına dair kanıtlar çoğalmaktadır (3). Çalışmamızın amacı *Staphylococcus aureus ATCC 25923*'ün minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerinin saptanması ardından 8MİK, 4MİK, 2MİK, MİK, 1/2MİK, 1/4 MİK ve 1/8 MİK vankomisin konsantrasyonlarına maruz kalan bakterinin koagülaz, biyofilm, lateks aglütinasyon, hemoliz, lipaz, proteaz aktivitelerinin varlığının gözlemlenmesidir. Vankomisin klinikte MRSA'lara karşı da kullanılabilen bir antibiyotik olduğundan, bu çalışmada vankomisinin *S. aureus* virulansı üzerindeki etkisine baktık. Çalışmamızda, standart bir suş olan *Staphylococcus aureus ATCC 25923*'ün minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değeri bulunmuştur. Sonra 8MİK, 4MİK, 2MİK, MİK, 1/2MİK, 1/4 MİK ve 1/8 MİK vankomisin konsantrasyonlarına maruz kalan bakterinin koagülaz, biyofilm, lateks aglütinasyon, hemoliz, lipaz, proteaz aktivitelerinin varlığı gözlemlenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Staphylococcus aureus*'un Genel Özellikleri

2.1.1- *Staphylococcus aureus*'un Mikrobiyolojik Özellikleri

Sporsuz, hareketsiz ve kapsülsüz koklardır. Katı besiyerlerinde üretildiklerinde, çoğalırken üç boyutlu bölünebilmeleri ve bölünmeden sonra tam ayrılmamaları nedeniyle mikroskopta düzensiz üzüm salkımına benzer kümeler biçiminde görünürler. Bazen 3-5 koktan ibaret veya ikişerli gruplar da oluştururlar. Kok çapları 0,5-1,5µm'dir. Piyojenik bakteri oldukları için enfeksiyonlardan alınan örneklerde sıklıkla çok sayıda polimorfonükleer lökositte birlikte görülürler. Gram olumludurlar ve koagulaz pozitifler (4,5). Koagulaz testinin pozitifliği *Staphylococcus aureus*'u insanda hastalık yapan diğer stafilokok türlerinden ayırır. Fakat koagulaz testi insanda etken olarak saptanan yeni türler olan *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi*'de de pozitifdir. *S. aureus* ve *S. schleiferi*'de DNase testi pozitifdir (5).

En tipik üremeleri kanlı agar olmasına rağmen birçok besiyerinde üreyebilirler. Kolonileri yuvarlak düzgün, kabarık, mat, S tipindedir. Yirmidört saat inkubasyon ile koloni çapları 1-3mm olur. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) suşlarının çoğunluğunda beta hemoliz ve sarı pigment görülür (4, 5).

Stafilokoklar %10 ve daha az NaCl içeren ortamlarda üreyebilirler. Glikoz başta olmak üzere bir çok karbonhidratı fermentatif olarak parçalarlayarak son ürün olarak laktik asit oluştururlar. Gaz oluşturmazlar. *Staphylococcus aureus* mannitole etkilidir (4).

2.1.2- *Staphylococcus aureus*'un Epidemiyolojisi

Stafilokoklar arasında çeşitli türler vücudun farklı yerlerinde kolonize olurlar. *Staphylococcus aureus* insanların çoğunlukla burun deliği mukozalarında kolonize olur (Şekil 1) (4,6). Doğumdan itibaren *S. aureus* göbek, perine ve deriye kolonize olur. Daha sonraki yıllarda ise özellikle buruna yerleşir. İnsanların bazıları taşıyıcı durumundadır. Bazı insanlar hiçbir şekilde *S. aureus* ile kolonize olmaz. Bazıları ise arada bir burunlarında *S. aureus* taşırlar. Genelde toplumun yüzde otuz üçünün burnunda *S. aureus* saptanır. Aynı kişinin burnunda farklı *S. aureus* suşlarına rastlanabilir. Doğurgan çağıdaki kadınların yüzde onunun vajeninde *S. aureus* bulunur, mens dönemlerinde artar. Rektal ve perirektal taşıyıcılık da olabilir. İnsülin enjeksiyonu olan diabetes hastaları, kronik hemodiyaliz ve CAPD hastaları, kronik dermatolojik hastalıkları olanlar, İntravenöz ilaç kullananlar ve HIV pozitif kişilerde

taşıyıcılık oranı daha fazladır. Taşıyıcılar travma, cerrahi ve diğer riskli durumlarda taşıyıcı olmayanlara göre çok daha yüksek oranda enfeksiyon riski taşırlar (5).

S. aureus enfeksiyonlarından korunmada en etkili yöntem elleri yıkamaktır. Özellikle de yenidoğan, yoğun bakım, nöroloji, beyin cerrahi ve hemodiyaliz gibi duyarlı hastaların bulunduğu servislerde MRSA suşları ile kolonizasyonun önlenmesi gerekir. Kolonizasyon olursa da dekontaminasyon kritik önem taşır (5).

S. aureus'un oluşturduğu hastalık tipleri

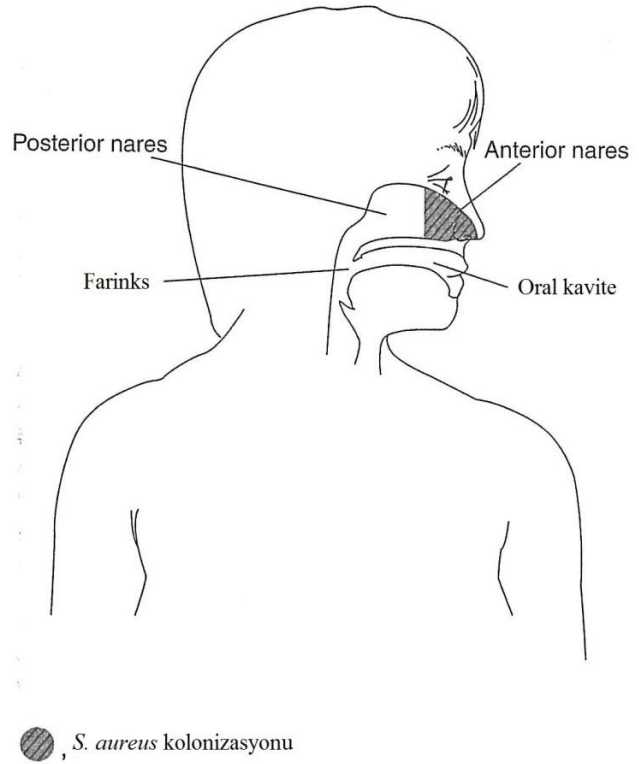
Gıda kaynaklı hastalıklar
Yumuşak doku enfeksiyonları
Impetigo
Toksik şok sendrom
Septisemi
Pnömoni
Osteomyelit
Plastik implantların enfeksiyonu

2.1.3- *Staphylococcus aureus*

İnfeksiyonları

S. aureus'un oluşturduğu lokal enfeksiyonlar piyogenik, eksuda veya abse biçimindeyken bazen eksotoksinlere bağlı besin zehirlenmesi ve toksik şok sendromu gibi klinik tablolar oluşturur. Ayrıca lokalize enfeksiyonlarda oluşan bakteriyemiler metastatik enfeksiyonların oluşmasına da sebep olur (5).

İnsanlardaki stafilokok enfeksiyonlarında *Staphylococcus aureus* öncelikle patojen olarak yer alır. Deri ve mukoza lokalizasyonları, yaygın deri döküntüleriyle seyreden enfeksiyonlar, sepsis ve endokarditler, sistem ve organ enfeksiyonları, besin zehirlenmeleri oluşturdukları belli başlı enfeksiyonlardır(Şekil1; 6) (4,6).



Şekil 1 *S. aureus*'un yaptığı hastalıklar ve en sık kolonize olduğu yer

2.1.4- *Staphylococcus aureus*'un Virulans Faktörleri

S. aureus hücre duvarında yer alan peptidoglikan, endotoksin benzeri bir özellik gösterir. Monositlerden interlökin-1 salınımını, kompleman aktivasyonunu, opsonik antikorların üretimini indükler. Peptidoglikan tabakasının dışında bulunan fibronectin bağlayan protein, kollajen bağlayan protein, “clumping factor” ve protein A adezyonda ve kompleman aktivasyonunda rol oynar. Bir çok *S. aureus* suşu dış yüzeyde polisakkarit tabakası taşır. Hücreye sarılı durumda kapsül, hücreden gevşek yayıldıklarında ise “slime” tabakası özelliği gösterir (5).

S. aureus bir çok enzim ve toksin üretir ve bunlar virulans faktörü olarak önem kazanır. Enzimlerden katalaz, fagositozla alınan bakterinin oksijen radikalleri ile öldürülmesini engelleyerek konak savunma mekanizmasını bozar (5).

Tablo 1 *S. aureus*'un adhesinleri ve adhesinlerin bağlandığı hedefler

Adhesin	Hedef
Fibronectin bağlayan protein (FnBP)	Fibronectin(Ekstraselüler matriksin bir bileşeni)
Protein A	IgG'nin F _c kısmı
Poli-n-suksinil-β-1,6 glukozamin (PNSG)	Plastik, muhtemelen ekstraselüler matriks proteini
Kollajen bağlayan protein	Kollajen
Koagülaz	Protrombin
Kümeleştirici faktör	Fibrinojen

Koagülaz, hücre dışına salınan veya hücre yüzeyine bağlı şekilde bulunur, trombinle bağlanarak onu aktif hale getirir ve fibrinojenden fibrinin polimerizasyonunu sağlar. “Clumping factor”, hücre duvarında bulunur ve *S. aureus*'un fibrinojen ve fibrine yapışmasını sağlayan bir reseptör görevi görür. Tablo1'de *S. aureus*'un adhesinleri ve bu adhesinlerin konaktaki hedefleri gösterilmiştir. (5, 6)

Hyalüronidaz hücreler arası matrikste bulunan hyaluronik asidi parçalar. β -laktamaz, plazmidle kodlanır ve antibiyotik direncinden sorumludur. Ayrıca nükleaz ve lipaz enzimleri de mevcuttur (5).

S. aureus'un ürettiği toksinler hemolizinler, lökosidin, epidermolitik toksin, enterotoksinler, toksik şok sendrom toksini-1 (TSST-1)'dir. Hemolizinler (α - β - γ - δ) hücre membranını etkileyen sitotoksik toksinler olup hemolizden sorumludurlar. Lökosidin fagositleri parçalar (5).

Epidermolitik toksin A kromozom tarafından kodlanır. Yeni doğanda haşlanmış deri sendromu hastalığına yol açar. Derinin stratum granulozom tabakasında hücreler arası desmozomları parçalayarak etki gösterir. Bir serin proteaz enzimidir ve süperantijen olarak kabul edilir. Toksine karşı spesifik nötralizan antikorlar koruyucudur (5).

Toksik şok sendrom toksini, ateş, deri döküntüleri, hipotansiyon ve çoklu organ yetmezliği ile giden toksik şok sendromuna sebep olur. Aynı hastalık koagülaz negatif stafilokoklar ve *Streptococcus pyogenes* tarafından da oluşturulabilmektedir (5).

İnsandan izole edilen *S. aureus* suşlarının yaklaşık yarısı enterotoksin üretir. Serolojik olarak birbirlerinden farklı beş enterotoksin bulunur (A,B,C,D,E). Daha önce enterotoksin F olarak adlandırılan toksinin yukarıda bahsedilen stafilokokkal TSST-1 olduğu anlaşılmıştır. Toksin üreten bakterilerin besinlerde üremesi ile insanlarda besin zehirlenmeleri gerçekleşir. TSST-1, epidermolitik toksin ve enterotoksinler süperantijenler olarak bilinirler (5).

2.2. Biyofilm

2.2.1- Mikrobiyal Biyofilmler

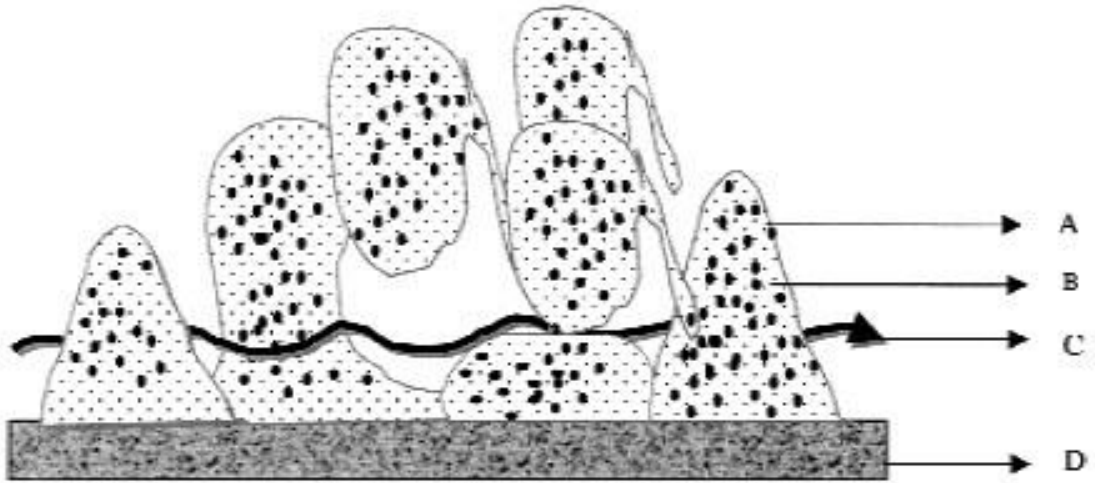
Birçok organizma genel hücre yüzeyi katmanlarına harici materyal katmanları oluşturur. Bu harici katmanlar karbonhidratları, peptitleri, proteinleri, lipitleri veya bu maddelerin birleşimlerini içerebilirler. Bu maddeler organizmaların katı yüzeylere tutunmasına katkı sağlayarak biyofilm oluşturur. Biyofilmlerde mikroorganizmaların kompleks kommuniteleri yüzeye tutunur. Laboratuvarı besiyerinde büyütölerek yapılan organizma çalışmaları, doğal çevrede oluşan ilişkiyi çok az taşır. Birçok durumda, laboratuvarı büyütölün organizmalar doğada bulunan dış koruyucu tabakaları üretebilme yeteneğini kaybeder. Çünkü görüldüğü kadarıyla laboratuvar kültürlerinde bu materyaller hiçbir seçici avantaj sağlamaz. Bu mikrobiyal kommuniteler, sıklıkla, çevreyle etkileşimde olduğı gibi birbirleriyle etkileşimde olan birçok türü içerir. Son yaratıcı deney yaklaşımları ve geliştirilen yöntemler metabolik etkileşimlerin, filogenetik ilişkilerin ve bu karmaşık kommunitelerdeki yarışın araştırılmasına izin verdi. Katı yüzeylere mikrobiyal yapışmanın takibinde, biyofilmler su içeren sıvı ile temasta olan herhangi bir katı yüzeyde gelişebilir (7).

Bakterilerin katı yüzeye yapışmasında bir sürü faktör rol oynar. Katı yüzeyle karşılaştığında bakteri sıvı çevrede olduğundan tamamen farklı şartları hisseder. Bu şartlar altında, hücreler sıklıkla yapısal ve fonksiyonel adaptasyonlara gider. Örneğin, *Vibrio parahaemolyticus*'da flajeller sentez uyarılırken *Pseudomonas aeruginosa*'da polisakkarit üretimi artar. *Escherichia coli*'de tip1 fimbriyalı hücrelerin abiyotik yüzeylere yapışması dış hücre membran bileşiminin değişmesine önayak olur. Tip1 fimbria ve yüzey arasındaki bu fiziksel etkileşim yüzey algılayıcı mekanizma ("surface-sensing mechanism") olarak ileri sürölür. Yüzey algılanmasıyla oluşan protein değişimi ("protein turnover"), dış zar bileşiminin değişimine katkıda bulunur. Hücre zarında meydana gelen değişim yapışmayı etkiler (7).

2.2.2- Biyofilm Yapısı ve Oluşumu

Biyofilm içindeki bakteriler, su ve besin içeren farklı yoğunluktaki matriks ile çevrili mikrokolonilerde büyür. Mikroorganizmalar EPS ("extracellular polymer substances") denilen polimerik bileşiklerden oluşan matrikse tutunur ve immobilize olarak kalır. EPS'nin tipik bileşenleri temel olarak polisakkaritler daha sonra az seviyedeki proteinlere eşlik eden nükleik asitler, lipitler ve humik bileşiklerdir. Biyofilmdeki bakteriler genellikle karmaşık

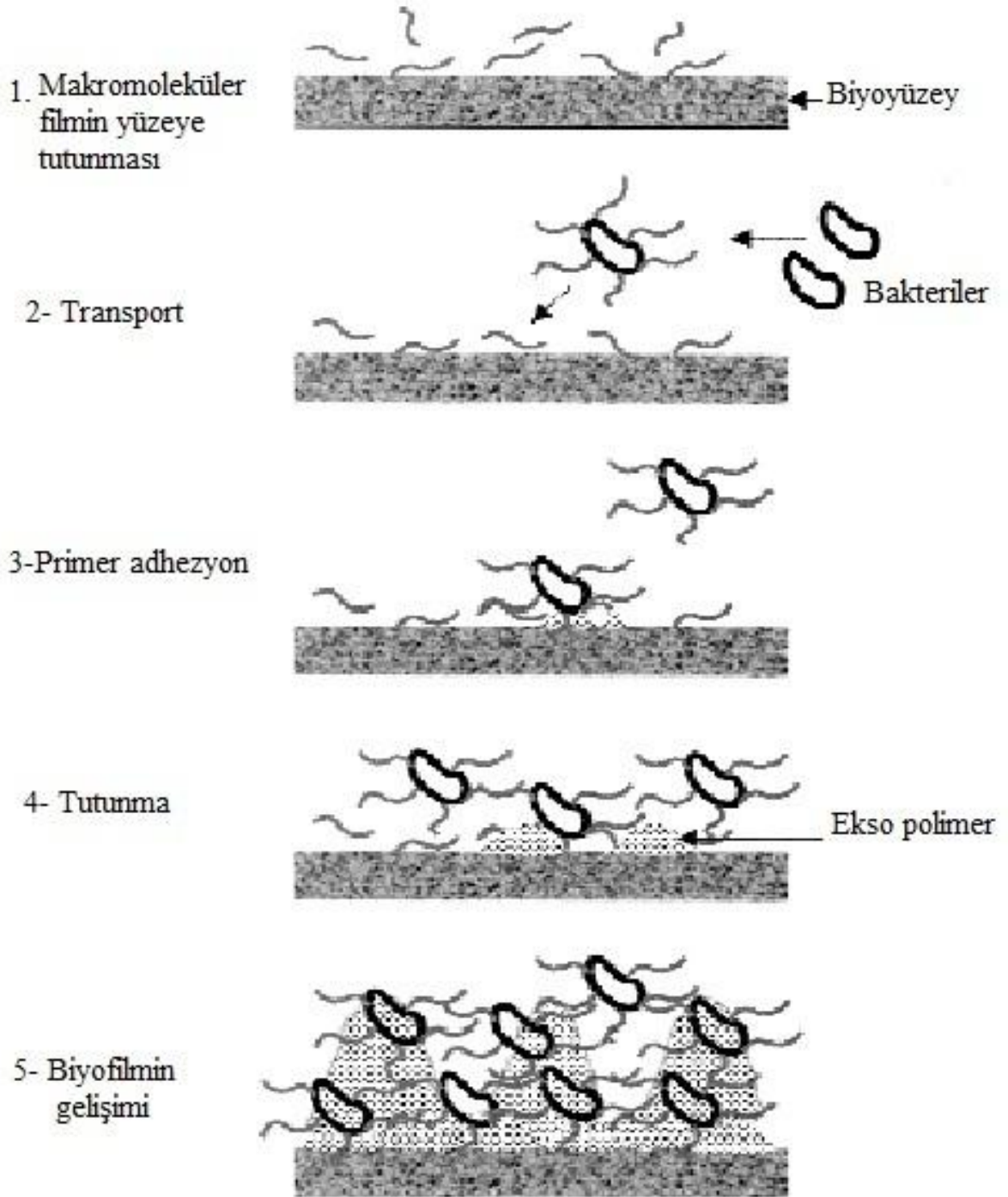
polisakkarit fibrillerin vıcık dokusunda birbirine bağlanır. Bu vıcık tabaka hücreleri bir arada tutar ve onları yüzeye demirler (Şekil 2; 8). Bu minik evrende anaerobik ve aerobik bakteriler, su kanalları ve kompleks yapıyı paylaşarak gelişirler. Polisakkarit örtü bir kalkan gibidir ve farklı bakteri tipleri nihai bakteriyel biyofilmi oluşturmak için birlikte çalışırlar. Biyofilm bakterileri sıvı kültürde ürediklerinde tutunacak bir yüzey bulduğu takdirde biyofilm oluşturmaları yönünden morfolojik ve metabolik farklılıklar gösterir (8).



Şekil 2: Kuramsal olarak biyoyüzeye tutunmuş bakteriyel biyofilm.

A : Yoğun polisakkarit ve epoksi polisakkarit matriks B: Mikrokosma ve bakterilerin ayrı mikrokolonileri C: Açık su ve besin kanalları D: Bakterilerin yapıştığı veya tutunduğu yüzey

Biyomateryaller üzerinde biyofilm enfeksiyonunun oluşumu ardışık adımlardan oluşur (Şekil3; 8).



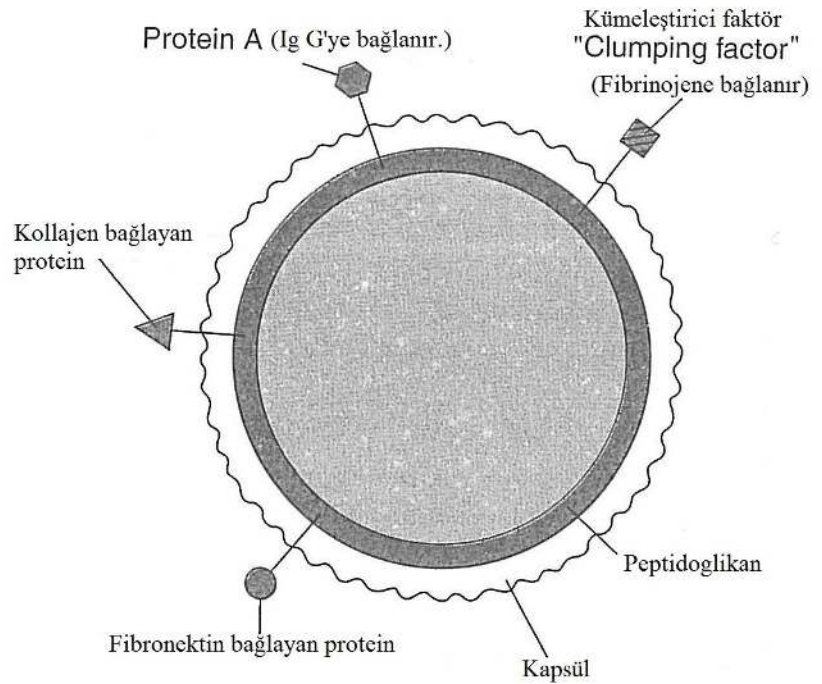
Şekil 3 : Mikrobiyota veya biyoyüzeylerdeki biyofilm oluşumunun şematik gösterimi.

2.2.3- *Staphylococcus aureus* – biyofilm ilişkisi

Staphylococcus epidermidis ve *Staphylococcus aureus*, hastane enfeksiyonuna neden olan ve medikal aletlere yerleşen enfeksiyonların başında gelir. Karakteristik olarak biyofilm içerirler. Bir seri yüzey proteini, konak matriks proteinlerine tutunma başlangıcını yönetir. Bunu bakteriyel hücrelerin kümeleşmesini sağlayan, katyonik, glukozamin tabanlı eksopolisakkarit ekspresyonu takip eder. Dahası, yüzey etkin proteinler stafilokokkal biyofilmlerin üç boyutlu yapısını içeren anahtar faktörler olarak tanımlanır. Transkripsiyonel profillemeye deneyleri stafilokokkal biyofilmlerin spesifik fizyolojilerini tanımladı ve antimikrobiyallere karşı biyofilm direncinin genle düzenlenen bir işlem olduğunu gösterdi(9).

2.3. Yapışkan Matriks Moleküllerini Tanıyan Mikrobiyal Yüzey Bileşenleri

S. aureus hücre yüzeyinde bulunan adhesinler, hücre dışı matriks moleküllerine bağlanırlar. Bu yüzden bunlara YMMTMYB (Yapışkan Matriks Moleküllerini Tanıyan Mikrobiyal Yüzey Bileşenleri) adı verilir. İngilizcesi “MSCRAMMs (Microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules)” dır. Şekil 4’ de protein A, kümeleştirici faktör, kollajen bağlayan protein, fibronektin bağlayan protein olarak gösterilmiştir(6).



Şekil 4: Konak proteinlerine tutunan YMMTMYB adı verilen *S. aureus* hücre yüzey proteinleri

2.3.1- Stafilokokkal Protein A (Spa)

S. aureus'un temel yüzey proteinlerinden biri olan Spa 42 kDa ağırlığında bir proteindir. Hücre duvarının %7'sini oluşturur. Spa, IgG'nin F_c kısmına bağlanarak fagositozdan kaçmada önem taşır (10).

2.3.2- “Clumping factor” Kümeleştirme Faktörü

Lam koagülaz ile bağlı koagülaz olan kümeleştirme faktörü ortaya konulmaktadır. Bu koagülaz kültür filtratına geçmez. Hücreye bağlıdır. Etkinliğinin ortaya çıkması için plazmadaki CRF (Coagulase reacting factor)'e ihtiyaç yoktur. Bakteri yüzeyindeki faktör, plazmadaki fibrinojeni pıhtılaştırıp stafilokokların kümeleşmesine neden olur. Tüp yöntemi ile paralel sonuç verse de lam koagülaz olumsuz sonuçlarda tüp yöntemi de denenmelidir. Özellikle metisiline dirençli kökenlerde lam deneyi ile koagülaz olumsuz bulunur (4).

“Clumping factor” hücre duvarı ilişkili bir fibrinojen bağlayan protein olup, YMMTMYB içinde yer alır. Stafilokokkal yapışkan matriks moleküllerini tanıyan mikrobiyal yüzey bileşenlerine örnek olarak *S. aureus*'un “clumping factor (ClfA)” ve fibronektin bağlayan protein A'sı ve *S. epidermidis*'in serin-aspartat tekrar proteini G (SdrG) verilebilir.. Bu proteinlerin N ucu, bakteriyel yüzeye maruz kalan ve ligand bağlayan bölgeyi içeren A domeyninin takibinde yaklaşık 40 birim sinyal sekansı içerir. C ucu hücre yüzey demirlemesi, hidrofobik transmembran domeyni ve pozitif yüklü sitoplazmik son uç için LPXTG motifini içerir. Hücreye demirleme domeyni ve A domeyni arasında kalan bölge, stafilokoklar arasında değişiklik gösteren farklı protein tekrarlarından oluşur. A domeyni N1,N2 ve N3 olmak üzere üç subdomeynden oluşur (11).

ClfA, FnbpA ve SdrG'nin Fg bağlayan kısımları ortalama 320 birimden oluşan N2 ve N3 subdomeynleridir. Bu üç proteinin N2 ve N3 subdomeynleri yaklaşık %20 amino asit sekans ortaklığı taşırken yüksek derecede korunmuş bir sekonder yapısı vardır. ClfA ve FnbpA'nın her ikisi de Fg'nin γ zincirinin C ucundaki 17 birime bağlanır (11).

2.4. Salınan Fibrinojen Bağlayan Proteinler

2.4.1- *Staphylococcus aureus* – Koagülaz

Besiyerinde üreyen stafilokokların oluşturdukları ve besiyerine saldıkları bağımsız koagülaz, tüp koagülaz deneyi ile araştırılır. Bu enzim özelliğindeki madde, plazmada

bulunan bir faktör ile (“Coagulase reacting Factor = CRF”) ilişki kurar ve trombokinaza benzeyen bir etkiyle fibrinojeni pıhtılaştırır. Bu işlem için kalsiyum iyonlarına gereksinim yoktur (4).

Koagülaz *S. aureus*'da sentezlenen, kan koagülasyonuna neden olan ve konak biyolojisini yönetmenin bakterisi için avantaja dönüştüğünü gösteren ilk örnektir. Yapısal olarak koagülaz N ucunda D1 ve D2 segmentleri, yüksek korunmuş merkez ve C ucunda değişken sayıda yirmi yedi amino asidin ardışık tekrarları olmak üzere üç ana bölümden oluşur. Koagülaz fibrinojene tahmin edilen iki mekanizmayla bağlanır. C uç tekrarlar Fg'ye direk olarak bağlanır fakat bağlanma mekanizması ve virulanstaki rolü karakterize edilmemiştir. N uç bölgesi de Fg bağlanmasını gerçekleştirir fakat Fg'ye direk olarak bağlanmaz. N ucundaki D1 ve D2 domeynleri protrombin ve trombinle etkileşime giren α -heliksi oluşturur. Koagülaz ve protrombin sitokiyometrik 1:1 kompleksi oluşturur. Bu kompleks Fg'yi fibrine çevirme yeteneğindeki formu oluşturmak için protrombini aktive eder. Koagülaz-protrombin kompleksi ile Fg'nin fibrine dönüşmesi pıhtılaşma basamaklarındaki proteolitik kesimleri içermez (11).

Koagülaz₁₋₃₂₅ protrombin ile sıkı bir kompleks oluşturur. Kompleks oluşturmadan önce serbest protrombindeki inaktif olan domeyn aktif konformasyona katlanır. Koagülaz N ucu artığı protrombin aktivasyon oyuna katılarak protrombinin katalitik bölgesini aktive eden konformasyonal değişikliğe yol açar. Koagülaz-protrombin/trombin kompleksi Fg'ye özgüdür ve platelerler, faktör V veya faktörVII gibi diğer trombin substratlarına bağlanmaz. Hiçbir fizyolojik koagülaz-protrombin kompleks inhibitörü bildirilmemiştir ve bu kompleks diğer antikoagülanlara karşı dayanıklıdır (11).

2.4.2- Eap (ekstraselüler adherens proteini)

S. aureus Fb bağlayan Eap (ekstraselüler adherens proteini) hemen hemen tüm klinik izolatlarda sentezlenen, yaklaşık 70kDa olan bir proteindir. Bu proteinin LPXTG motifinden yoksundur ve hücre duvarına demirlenmez, kültür supernatanına salınır. Eap'nin geniş bir bağlanma spesifitesi olduğundan Fg α -zinciri, Fn ve protrombini içeren birçok plazma proteinine bağlanabilir. Eap delesyonu *S. aureus*'un Fn ve fg bağlanmasını engellemez. Eap, konak ve bakteri arasında bir köprü görevi gören, konak bağışıklığını baskılayarak *S. aureus*'un hayatta kalmasını sağlayan çoklu etkileşimlere sahiptir (11).

2.4.3- Efb (ekstraselüler fibrinojen bağlayan)

S. aureus Efb (ekstraselüler fibrinojen bağlayan) 'si 15.8kDa büyüklüğünde ekstraselüler salınan bir proteindir. Fg'nin D fragmanına bağlanır. Efb'ye karşı oluşan antikörlerin, Efb'nin Fg'ye bağlanmasını engellediğini gösteren çalışmalar vardır. Efb'nin Fg'ye bağlanan bölgesi ve koagulazın Fg'ye bağlanan bölgesindeki tekrarlar homoloji gösterir (11).

2.5. Staphylococcus aureus – Hidrolazlar ve Hemolizinler

Stafilokok enfeksiyonlarında yayılım, besin alımı için konağa zarar vererek diğer enzimlerle birlikte ekstraselüler protezların ve toksinlerin sinerjistik salınımı göze çarpan bir basamaktır (12).

2.5.1- Stafilokinaz (Sak)

Staphylococcus aureus'un yayılmasını sağlayan bir eksoproteindir. Sak, pıhtıları çözer. Sak'ın bunu nasıl yaptığını anlamak için vücudun yaraların iyileşme sürecinde normal olarak pıhtıyı kırması düşünülebilir. Pıhtı, fibrin ağlarıyla plateletlerin bir arada tutulmasıyla oluşur. Bu ağın bileşenlerinden biri de plazminojen proteindir. Normalde pıhtının çözülmesi esnasında endotelial hücreler doku plazminojen aktivatörü adı verilen bir protein salgılar. Doku plazminojen aktivatörü, plazminojen ile etkileşir ve onu plasmine dönüştürür. Plasmin fibrin ağlarını yıkarak pıhtıyı çözer. Bu pıhtıya mahsus kontrollü bir işlemdir. Serbest plasmin kanda hızlıca yıkılır. Sak da plazminojeni aktive eder fakat bu vücudun kontrolünde değildir. Sak aktivitesi sadece pıhtıya zarar vermez aynı zamanda hücreleri bir arada tutan hücre dışı matriks ve fibrin liflerine de zarar vererek bakterinin doku içine hareketine izin verir (6).

2.5.2- Hyaluronidaz

Ekstraselüler matriks proteinler ve polisakkaritlerden oluşur (örn. Hyaluronik asit). *Staphylococcus aureus*, Sak ile birlikte proteinazlar ve hyaluronidaz üreterek ekstraselüler matriksin çözülmesine etki eder (6).

2.5.3- Proteazlar

Staphylococcus aureus üç tip proteolitik enzim salgılar, bunlar serin proteaz, tiyol proteaz ve metalloproteazlardır (Drapeau et al., 1972; Arvidson, 1973; Arvidson et al., 1973). Serin proteaz (V8 proteaz), diizopropilflorofosfat (DFP) ile inhibe olabilen, glutamik asidin karboksil ucundaki peptid bağlarını kesen bir endopeptidazdır. Tiyol proteaz ise ağır metaller ile inaktifleşir ve indirgeyici maddelerin varlığında aktiftir. Metalloproteinaz (aureolisin) EDTA ve 1,10-fenantrolin gibi metal şelatlayıcılar varlığında tamamen inaktiftir (13).

Doku organizasyonuna etki eden stafilokokkal proteazların farklı sınıfları vardır. Aureolisin immunolojik reaksiyonların değiştirilmesine etki eder, Stafopain A ve B doku invazyonuna yardım ederken V8 proteaz immunoglobulin yıkımı ve plazma serpinlerinin inaktivasyonu ile konak savunmasını etkiler (12).

Bakterinin yayılmasına katkıda bulunan bir eksoprotein örneği eksofoliyatif toksinler (ETs) adı verilen proteinaz grubudur. Daha önce de bahsedildiği gibi *S. aureus* deride enfeksiyonlar oluşturur. ET'ler derinin katmanlarının ayrılması ve eksofoliyasyonunda (pul pul dökülme) görev alır. Örneğin en çok bilinen eksofoliyatif toksin A, epidermal hücrelerde hücre-hücre bağlantılarını sağlayan desmoglein-1 (Dsg-1)'i keserek epidermal doku katmanlarının birbirinden ayrılmasına sebep olur (6).

2.5.4- Lipazlar

S. aureus lipazları yumurta sarılı agarda (egg yolk agar) opaklık yapabilmesi ile test edilmiştir. Lipaz üretiminin organizmanın deride hayatta kalmasını sağladığı düşünülür (16). Yumurta sarısı faktörü (Egg yolk factor) doymuş yağ asiti akseptörüne ihtiyaç duyan bir lipazdır. Yumurta sarısı faktörü Nutrient broth ve Casman'ın sentetik ortamından ziyade kalp infuzyon brothda en çok miktarda gözlenmiştir. Düşük yoğunluklu lipoprotein olan lipovitellenin ultra santrifüjle yumurta sarısından izole edildi ve opaklık oluşturan substrat olarak tanımlandı. Lipaz, lipit kısmı etki ederek lipovitellenin'in çözünürlüğünde değişikliklere neden olur (14).

2.5.5- Hemolizinler

S. aureus kanlı agarda ürediğinde çoğunlukla açık bir hemoliz alanı oluşturarak β hemoliz yapar. Çünkü *S. aureus* α -hemolizin, β -hemolizin, γ -hemolizin ve δ -hemolizin olmak üzere dört farklı hemolizin oluşturur. Hemolitik patern stafilokokkal suşa ve kanın kaynağına bağlı olarak değişir (15).

Alfa toksin insan hücre membranında por oluşturarak nötrofillere karşı bir savunma yapar. Alfa toksin, kırmızı kan hücrelerini lizise uğratabildiğinden alfa hemolizin olarak da adlandırılır. *Staphylococcus aureus*'un bazı suşları diğer hemolizinleri de üretir. Alfa hemolizinle benzer olarak kırmızı kan hücrelerinden başka diğer hücrelerin membranlarına zarar verebilir (6).

2.6. Vankomisin

Vankomisin ve teikoplanin glikopeptit grubu antibiyotiklerdir ve glikopeptitler peptidoglikan sentezini inhibe eder. Bu antibiyotikler, özellikle de vankomisin, tıpta önemli bir konuma gelmiştir çünkü *S. aureus* ve *Enterococcus* türleri gibi bazı gram pozitif patojenlere karşı etkili son ilaçlardandır. Glikopeptit antibiyotikler hücre sitoplazmasının dışına taşındıktan sonra UDP-muramil-pentapeptitin D-Ala-D-Ala kısmına bağlanır. Bağlanma peptidoglikan sentezindeki hem transglikosilasyon hem de transpeptidasyon basamaklarını inhibe eder. Vankomisin ve teikoplanin dış membrandan geçemedikleri için çoğu gram negatif bakteriye etkili değildir. Gram pozitif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılır. Göreceli olarak dar spektrumlarına karşın bu antibiyotikler klinikte önemlidir (16).

3- GEREC VE YÖNTEMLER

3.1. Araştırmanın Tipi

Staphylococcus aureus ATCC 25923 standart suşunun vankomisin supramİK, MİK, subMİK konsantrasyonlarında lipaz, proteaz, hemoliz, koagülaz, lateks agglutinasyon oluşumundaki etkisi deneysel olarak incelenmiştir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Çalışma Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarlarında 2010-2011 yıllarında gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Deneyler sürekli tekrarlanmıştır. Birbiriyle aynı koşulların sağlanabildiği üç deney göz önünde bulundurularak sonuçlar değerlendirilmiştir.

3.4. Çalışma Materyali

Çalışmada *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 standart suşu kullanılmıştır. Bu bakteri 1945’de Seattle’da izole edilen bir klinik suş olup, zamanında *Staphylococcus aureus subsp. aureus* Rosenbach olarak depolanmıştır (17).

Çalışmamız için *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşu, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastahanesi Merkez Laboratuvar standart suş koleksiyonundan temin edilmiştir (EK8.1).

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmanın değişkenleri farklı konsantrasyonlar olan 8 MİK, 4 MİK, 2 MİK, MİK, %50 MİK, %25 MİK, %12,5 MİK vankomisin konsantrasyonlarında 18 saat 36°C’de Katyon Ayarlı Muller Hinton Broth’da (KA_MHB) üretilen *Staphylococcus aureus* ATCC 25923’dir. Kontrol ise hiçbir antibiyotik içermeyen KA_MHB’de üretilen *Staphylococcus aureus* ATCC 25923’dür.

3.6. Veri toplama araçları

Minumum inhibisyon konsantrasyon deneyi Thermo Scientific mikrolept okuyucuda 450nm’de değerlendirilmiştir.

Biyofilm deneyi Thermo Scientific mikrolept okuyucuda 540nm’de değerlendirilmiştir (Şekil 5).

Koagülaz oluşumu plazma kullanılarak gözlenmiştir.

Lateks agglutinasyon testinde pozitiflik ticari kit kullanarak gözlenmiştir (şekil 6; 18).

Lipaz, proteaz ve hemoliz varlığının belirlenmesinde ilgili besiyerlerindeki üremelerin oluşturduğu özellik gözlenmiştir.



Şekil 5: Mikrolept okuyucu



Şekil 6 : Lateks aglutinasyon kiti

3.6.1- Kimyasal Maddeler ve Diğer Araç-Gereçler

- 1) Kristal Viyole (MERCK Crystal violet (C.I. 42555), Lot:K91689308 906)
- 2) PBS
- 3) Plazma
- 4) Staphaurex (*S. aureus* identifikasyonu için fibrinojen ve saf IgG ile kaplı lateks parçacıkları olup hem stafilokoklardaki kümeleştirici faktörü hem protein A'yı tanıyarak identifiye eder.) (Remel Inc. Staphaurex, Ref:30859901, Lot:844914)
- 5) Alkol
- 6) 96'lık ELİZA pleytleri
- 8) Petri Kabı
- 9) 100µl pastör pipeti ve uçları (sarı uç) (Greiner bio-one Ultratıp, Lot: 1884001)
- 10) 1000µl pastör pipeti ve uçları (mavi uç) (Greiner bio-one Ultratıp, Lot: 1793101)
- 11) Vankomisin (VIAL Hospira Vancomycin 500mg, parti no : X036913AA)
- 12) Muller Hinton Broth Besiyeri (OXOID CM0405, Lot: 724245)
- 13) Beyin Kalp Infuzyon Agar (OXOID CM 1136, Lot: 755427)
- 14) (Skim Milk) Yağsız süt tozu (OXOID LP0031, Lot: 1044910)
- 15) (Egg-yolk) Yumurta sarısı (OXOID egg yolk emulsion 100ml, Lot: 898195)
- 16) %5 Koyun Kanlı Agar (BD Columbia 5% SB, Lot: 1019292)
- 17) Thermo Scientific Microplate Reader (Type:357, Ref: 51119000, Sn: 357-00097)

3.6.2- Besiyerlerinin Hazırlanışı

3.6.2.1- Sütli Besiyeri

Yüzde onluk süt tozu içerecek şekilde beyin kalp infuzyon agar hazırlanmıştır. Süt tozu distile suda eritilip 121°C'de 5dk otoklavda steril edilmiştir. Beyin kalp infuzyon agar tartılıp distile suda eritilmiştir ve 121°C'de 15dk otoklavda steril edilmiştir. İki ayrı ayrı steril edildikten sonra karıştırılıp petri kaplarına dökülmüştür.

3.6.2.2- Yumurta Sarılı Besiyeri

Beyin kalp infuzyon agar tartılıp 121°C'de 15dk otoklavda steril edilmiştir. Otoklav sonrası %10'u kadar steril ticari yumurta sarısı eklenmiştir ve iyice karıştırılıp petri kaplarına dökülmüştür (4,14,15).

3.6.2.3- Katyon Eklenmiş Muller Hinton Broth

Litrede 20mg kalsiyum ve 10mg magnezyum içerecek şekilde Muller Hinton Broth hazırlanmıştır.

3.6.3- Suşun Hazırlanması

Minumum inhibisyon deneyine hazırlık için *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, -40°C'deki stoktan alınarak Beyin Kalp İnklüzyon Agara tek koloni ekimi yapılmıştır. 36°C'de bir gece inkubasyona bırakılmıştır. Daha sonra agardan üreyen tek bir koloni alınarak KA_MHB'ye ekilmiştir ve 36°C'de bir gece inkubasyona bırakılmıştır. Ardından MİK deneyinde kullanılmıştır (2, 19 - 22).

3.6.4- Mikro Dilusyon Yöntemi ile MİK ve Sub-MİK'lerin Belirlenmesi

Sıvı besiyerinde üreyen *Staphylococcus aureus* ATCC 25923'ün vankomisin MİK değeri, mikrodilusyon yöntemi ile katyon eklenmiş Muller Hinton Broth besiyerinde saptanmıştır. Bakteriler McFarland (McF) 0.5'e eşit bulanıklılıkta hazırlandıktan sonra 1/30 oranında seyreltilmiştir. ELISA mikro plaklarındaki kuyucuklara önce KA_MHB besiyerinden eşit miktarlarda dağıtılıp, daha sonra vankomisinin iki kat dilusyonları seri seyreltme ile hazırlandıktan sonra bakteri süspansiyonu dağıtılmıştır. Plaklar 18 saat 37°C'de inkube edildikten sonra 450nm'de spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. Absorbansın iki kat ve daha fazla arttığı kuyucuktan bir önceki kuyucuk MİK olarak kaydedilmiştir. (2, 19-22).

3.6.5- Protez, Lipaz, Hemoliz Aktivitelerinin Belirlenmesi

Staphylococcus aureus ATCC 25923'ün vankomisin etkisi altındaki MİK değeri belirlendikten sonra 8MİK, 4MİK, 2MİK, MİK, %50MİK, %25MİK, %12,5 MİK kuyucuklarından örnek alınıp ilgili besiyerlerine nokta ekim yapılarak proteaz, lipaz ve hemoliz aktivitelerine bakılmıştır. Proteaz aktivitesinin gözlemlenmesi için %10 süt tozu içeren beyin kalp infüzyon agara, lipaz aktivitesinin gözlemlenmesi için yumurta sarılı beyin kalp infüzyon agara ve hemoliz aktivitesinin gözlemlenmesi için kanlı agara nokta ekim yapılmıştır. 24 saat 36°C'de inkubasyona bırakılmıştır. (4, 15, 23).

3.6.6- Koagülaz Aktivitesinin Belirlenmesi

3.6.6.1- Lam Koagülaz

Staphylococcus aureus ATCC 25923'ün vankomisin etkisi altındaki MİK değeri belirlendikten sonra 8MİK, 4MİK, 2MİK, MİK, %50MİK, %25MİK, %12,5 MİK kuyucuklarından örnek alınarak temiz bir lam üzerinde plazmayı koagüle ettirmesi gözlenmiştir (2, 4).

3.6.6.2- Tüp Koagülaz

Staphylococcus aureus ATCC 25923'ün vankomisin etkisi altındaki MİK değeri belirlendikten sonra 8MİK, 4MİK, 2MİK, MİK, %50MİK, %25MİK, %12,5 MİK kuyucuklarından örnek alınarak tüplerdeki 0,5 ml plazma içine ekim yapılmıştır ve 37°C'de inkubasyona kaldırılmıştır (2, 4).

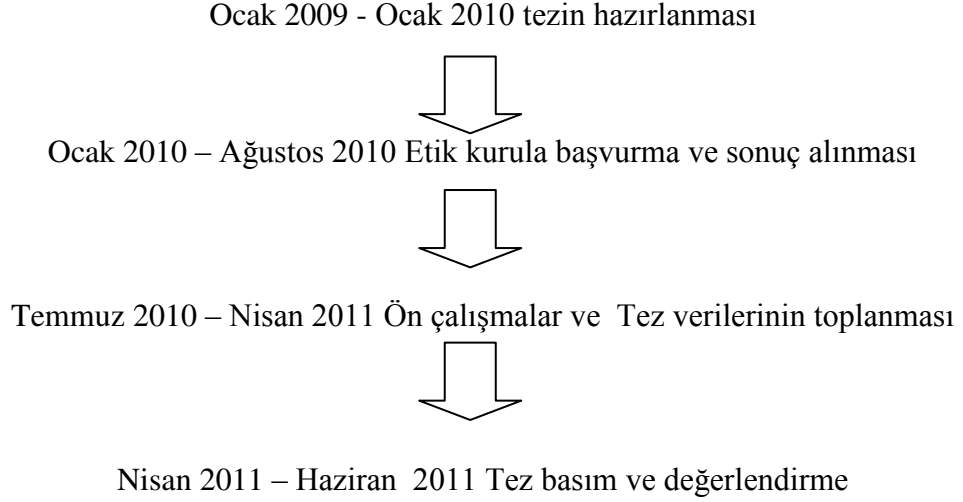
3.6.7- Lateks Agglutinasyon

Staphylococcus aureus ATCC 25923'ün vankomisin etkisi altındaki MİK değeri belirlendikten sonra 8MİK, 4MİK, 2MİK, MİK, %50MİK, %25MİK, %12,5 MİK kuyucuklarından örnek alınarak kitin içindeki kartın üzerine konulmuştur ve kitteki solusyondan damlatılarak çökelme olup olmadığı gözlenmiştir (4, 24).

3.6.8- Biyofilm Oluşumunun Belirlenmesi

Staphylococcus aureus ATCC 25923'ün vankomisin etkisi altındaki MİK değeri belirlendikten sonra biyofilm oluşumu 8MİK, 4MİK, 2MİK, MİK, %50MİK, %25MİK, %12,5 MİK kuyucuklarında kristal viyole yöntemi ile belirlenmiştir. 540nm'de besiyerine göre iki kat absorbands olan kuyucuklar biyofilm pozitif kabul edilmiştir (2, 19, 20).

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi



3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Verilerin sonuçları derece belirtmeyip sadece var – yok şeklinde olduğu için veriler değerlendirilirken işaret testi kullanılmıştır. Seçilen yöntemler malzemelerin önceden var olması ve uygulanabilme kolaylığı açısından avantaj sağlarken, deney gruplarının arasındaki farkı ayrıntılı olarak verememektedir.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Nicel değil de nitel gözlemlerin olması deney gruplarının birbiri ile karşılaştırılmasını zorlaştırmaktadır.

3.10. Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel (Invaziv) Olmayan Klinik Araştırmalar Değerlendirme Komisyonu'nun 12.08.2010 tarihli 227 sayılı kararı ekte verilmiştir.

4- **BULGULAR**

Sonuçlar değerlendirilirken standizasyonun sağlanabildiği üç çalışma baz alınmıştır.

4.1- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923'ün Vankomisin Etkisindeki Minumum İnhibisyon Konsantrasyon Değeri

Litrede 20mg kalsiyum ve 10mg magnezyum içerecek şekilde hazırlanan KA-MHB ile yapılan minumum inhibisyon konsantrasyon testinde, minumum inhibisyon konsantrasyonu 1µg/ml bulunmuştur.

Deney 1 :

Tablo 2 : Deney 1'e ait pleytin 450nm'deki ölçümleri ve *S. aureus*'un vankomisin MİK değerleri

	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.087	0.103	0.105	0.108	0.107	0.111	0.113	0.116	0.652	0.888	0.894	0.92
B	0.089	0.101	0.138	0.126	0.112	0.114	0.124	0.12	0.798	0.828	0.749	0.893
C	0.092	0.104	0.106	0.128	0.167	0.123	0.519	0.839	0.623	0.861	0.969	0.919
D												
E	0.09	0.1	0.107	0.112	0.114	0.145	0.887	0.788	0.505	0.754	0.721	0.848
F	0.09	0.169	0.108	0.127	0.199	0.114	0.542	0.116	0.589	0.78	0.784	0.789
G	0.09	0.104	0.11	0.12	0.128	0.204	0.123	0.117	0.572	0.747	0.833	0.816
H	0.112	0.116	0.115	0.076	0.076	0.08	0.647	0.6	0.662	0.079	0.08	0.078

Deney 2 :

Tablo 3 : Deney 2'ye ait pleytin 450nm'deki ölçümleri ve *S. aureus*'un vankomisin MİK değerleri

	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.09	0.1	0.105	0.11	0.107	0.108	0.108	0.109	0.735	0.763	0.835	0.839
B	0.089	0.102	0.11	0.11	0.126	0.161	0.11	0.11	0.822	0.796	0.836	0.834
C	0.088	0.1	0.104	0.107	0.106	0.107	0.107	0.108	0.838	0.763	0.908	0.865
D												
E	0.087	0.098	0.105	0.108	0.105	0.109	0.109	0.109	0.851	0.92	0.904	0.713
F	0.085	0.103	0.106	0.107	0.11	0.11	0.111	0.103	0.662	0.829	0.777	0.825
G	0.085	0.097	0.102	0.107	0.107	0.108	0.108	0.107	0.68	0.793	0.777	0.882
H	0.104	0.105	0.108	0.072	0.074	0.072	1.015	0.879	0.878	0.073	0.073	0.072

Deney 3 :

Tablo 4 : Deney 3'e ait pleytin 450nm'deki ölçümleri ve *S. aureus*'un vankomisin MİK değerleri

	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.087	0.092	0.1	0.104	0.107	0.104	0.12	0.11	0.696	0.708	0.632	0.743
B	0.088	0.096	0.103	0.107	0.108	0.145	0.109	0.112	0.752	0.777	0.699	0.719
C	0.088	0.097	0.102	0.103	0.109	0.103	0.11	0.107	0.855	0.827	0.751	0.814
D												
E	0.088	0.097	0.101	0.107	0.108	0.108	0.11	0.112	0.694	0.722	0.629	0.796
F	0.088	0.098	0.106	0.105	0.11	0.107	0.109	0.111	0.631	0.651	0.65	0.768
G	0.09	0.097	0.103	0.106	0.107	0.106	0.109	1.052	0.571	0.793	0.881	0.849
H	0.105	0.107	0.107	0.081	0.071	0.072	0.836	0.856	0.811			

4.2- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923'ün Vankomisin Etkisindeki Patojetine Yanıtları

4.2.1- Lateks Aglutinasyon Bulguları

Tablo 5 : 3 deneydeki *S. aureus*'un vankomisinin MİK üzeri ve altı konsantrasyonlarına maruz kaldıktan sonra lateks aglutinasyon testine yanıtları

Lateks Aglutinasyon	8 MİK	4 MİK	2 MİK	MİK	%50 MİK	%25 MİK	%12,5 MİK	KONTROL
Deney 1	-	-	-	-	+	+	+	-
Deney 2	-	-	-	-	+	+	+	+
Deney 3	-	-	-	-	+	+	+	+

Staphylococcus aureus ATCC 25923 için, vankomisinin %50 MİK (0,5µg/ml), %25 MİK (0,25 µg/ml), %12,5 MİK (0,125 µg/ml)'rinde ve vankomisin içermeyen ortamda lateks aglutinasyon pozitifken, MİK ve MİK üzeri konsantrasyonlarda lateks aglutinasyon negatiftir.

4.2.2- Lam Koagülaz Bulguları

Tablo 6 : 3 deneydeki *S. aureus*'un vankomisinin MİK üzeri ve altı konsantrasyonlarına maruz kaldıktan sonra lam koagülaz testine yanıtları

Lam Koagülaz	8 MİK	4 MİK	2 MİK	MİK	%50 MİK	%25 MİK	%12,5 MİK	KONTROL
Deney 1	-	-	-	-	+	+	+	+
Deney 2	-	-	-	+	+	+	+	+
Deney 3	-	-	-	+	+	+	+	+

Staphylococcus aureus ATCC 25923 için, vankomisinin MİK (1 µg/ml), %50 MİK (0,5µg/ml), %25 MİK (0,25 µg/ml), %12,5 MİK (0,125 µg/ml)'rinde ve vankomisin

içermeyen ortamda lam koagülaz pozitifken, MİK üzeri konsantrasyonlar olan 2 MİK, 4 MİK, 8 MİK’de lam koagülaz negatiftir.

4.2.3- Biyofilm Oluşumu Bulguları

Deney 1

Tablo 7 : Deney 1’e ait pleytin kristal viyole yöntemi sonrası 540nm’deki değerleri

	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A					0.131	0.199	0.169	0.155	0.4	0.438	0.541	
B					0.25	0.242	0.202	0.179	0.373	0.235	0.229	
C												
D												
E												
F												
G					0.212	0.226	0.22	0.17	0.288	0.386	0.382	
H	0.134	0.138	0.146				0.447	0.351	0.458			

Deney 2

Tablo 8 : Deney 2’ye ait pleytin kristal viyole yöntemi sonrası 540nm’deki değerleri

	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A					0.124	0.152	0.193	0.192	0.631	1.043	0.536	
B					0.209	0.238	0.188	0.172	0.573	0.941	0.611	
C					0.105	0.156	0.162	0.123	0.73	0.644	0.789	
D												
E					0.226	0.243	0.212	0.194	0.749	0.672	0.726	
F					0.261	0.138	0.13	0.226	0.432	0.728	0.366	
G					0.146	0.258	0.165	0.18	0.488	0.71	0.449	
H	0.264	0.172	0.114				0.429	0.463	0.745			

Deney 3

Tablo 9 : Deney 3'e ait pleytin kristal viyole yöntemi sonrası 540nm'deki değerleri

	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	0,06 µg/ml
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A					0.122	0.167	0.119	0.119	0.745	0.658	0.719	
B					0.089	0.148	0.095	0.107	0.631	0.948	0.401	
C					0.095	0.144	0.098	0.115	0.396	0.419	0.34	
D												
E					0.1	0.224	0.141	0.136	0.301	0.687	0.385	
F					0.103	0.116	0.096	0.492	0.359	0.488	0.657	
G												
H	0.121	0.128	0.288				0.399	0.369	0.393			

Tablo 10 : 3 deneyin biyofilm bulguları

Biyofilm	8 MİK	4 MİK	2 MİK	MİK	%50 MİK	%25 MİK	%12,5 MİK	KONTROL
Deney 1	-	-	-	-	+	+	+	+
Deney 2	-	-	-	-	+	+	+	+
Deney 3	-	-	-	-	+	+	+	+

Staphylococcus aureus ATCC 25923, vankomisin %50 MİK (0,5µg/ml), %25 MİK (0,25 µg/ml), %12,5 MİK (0,125 µg/ml)'rinde ve vankomisin içermeyen ortamda biyofilm oluşturabilmişken, MİK ve MİK üzeri konsantrasyonlarda biyofilm negatiftir.

4.2.4- Tüp koagülaz Bulguları

Tüp koagülaz vankomisininin %50MİK, %25MİK, %12,5 MİK konsantrasyonlarında 2. Saatten itibaren pozitifleşmeye başlamıştır. 36°C’de inkubasyonda ilk dört saat gözlemlendiğinde vankomisininin %50MİK, %25MİK, %12,5 MİK konsantrasyonlarından ve antibiyotik içermen kontrolden alınan örneklerde 2., 3. ve 4. saatlerde pozitiflik saptanmıştır. Yirmi dördüncü saatte ise vankomisininin bu konsantrasyonlarına ek olarak MİK’de de pozitiflik saptanmıştır.

Tablo 11 : Tüp koagülaz bulguları

Tüp Koagülaz		8 MİK	4 MİK	2 MİK	MİK	%50 MİK	%25 MİK	%12,5 MİK	KONTROL
Deney 1	1. saat	-	-	-	-	-	-	-	-
	2. saat	-	-	-	-	-	+	+	+
	3. saat	-	-	-	-	-	+	+	+
	4. saat	-	-	-	-	+	+	+	+
	24. saat	-	-	-	+	+	+	+	+
Deney 2	1. saat	-	-	-	-	-	-	-	-
	2. saat	-	-	-	-	-	-	-	-
	3. saat	-	-	-	-	+	+	+	+
	4. saat	-	-	-	-	+	+	+	+
	24. saat	-	-	-	+	+	+	+	+
Deney 3	1. saat	-	-	-	-	-	-	-	-
	2. saat	-	-	-	-	+	+	+	+
	3. saat	-	-	-	-	+	+	+	+
	4. saat	-	-	-	-	+	+	+	+
	24. saat	-	-	-	-	+	+	+	+

4.2.5- Lipaz, Proteaz ve Hemoliz Bulguları

Tablo 12 : *S. aureus*'un farklı vankomisin konsantrasyonlarında lipaz oluşturması

Lipaz	8 MİK	4 MİK	2 MİK	MİK	%50 MİK	%25 MİK	%12,5 MİK	KONTROL
Deney 1	Üreme yok	+	Üreme yok	+	+	+	+	+
Deney 2	Üreme yok	Üreme yok	Üreme yok	+	+	+	+	+
Deney 3	+	Üreme yok	Üreme yok	+	+	+	+	+

Tablo 13 : *S. aureus*'un farklı vankomisin konsantrasyonlarında proteaz oluşturması

Proteaz	8 MİK	4 MİK	2 MİK	MİK	%50 MİK	%25 MİK	%12,5 MİK	KONTROL
Deney 1	+	+	+	+	+	+	+	+
Deney 2	Üreme yok	+	Üreme yok	+	+	+	+	+
Deney 3	+	Üreme yok	Üreme yok	+	+	+	+	+

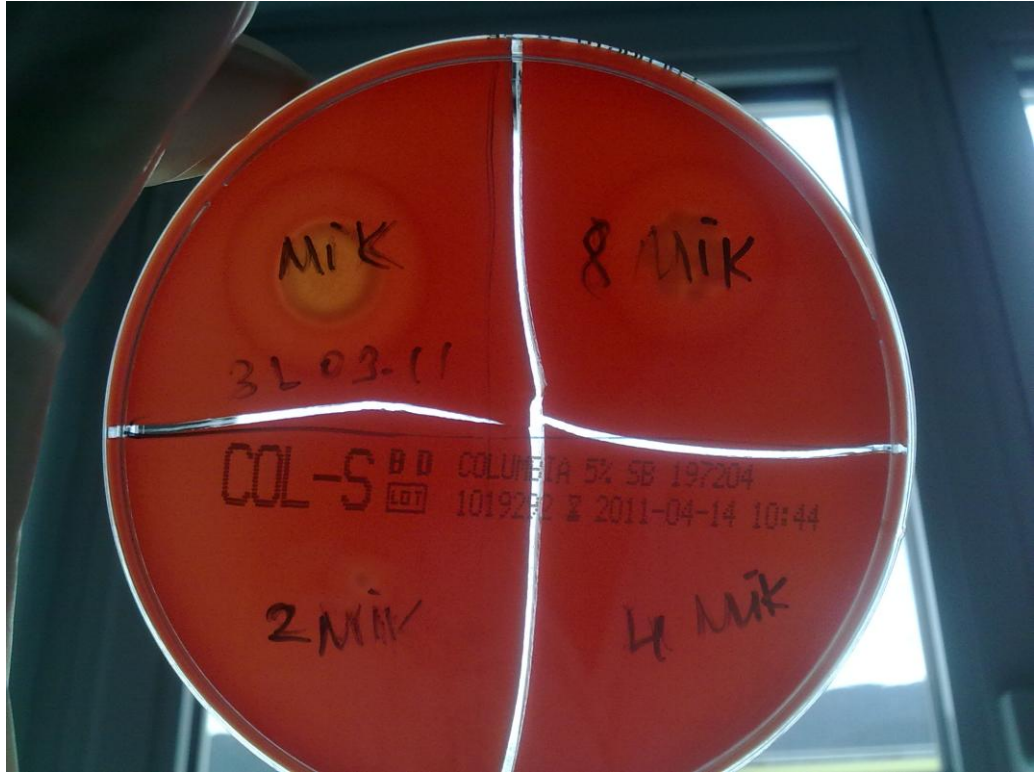
Tablo 14 : *S. aureus*'un farklı vankomisin konsantrasyonlarında hemoliz oluşturma

Hemoliz	8 MİK	4 MİK	2 MİK	MİK	%50 MİK	%25 MİK	%12,5 MİK	KONTROL
Deney 1	+	+	+	+	+	+	+	+
Deney 2	Üreme yok	Üreme yok	+	+	+	+	+	+
Deney 3	+	Üreme yok	+	+	+	+	+	+

Minumum inhibisyon konsantrasyon testinde MİK 1µg/ml saptandıktan sonra, 8 MİK (8 µg/ml), 4 MİK (4 µg/ml), 2 MİK (2 µg/ml), MİK (1 µg/ml), %50 MİK (0,5 µg/ml) %25 MİK (0,25 µg/ml), %12,5 MİK (0,125 µg/ml) kuyucuklarından yumurta sarılı beyin kalp infüzyon agara, süt tozlu beyin kalp infüzyon agara ve %5 koyun kanlı agara nokta ekim yapıp 36°C’de 24 saat inkubasyon sonrasında plaklar değerlendirilmiştir. Üreme gösteren tüm kolonilerde ilgili özellik görülmüştür. Üreme olup da ilgili özelliğin negatif olduğu bir sonuç bulunmamıştır. Bu yüzden vankomisin konsantrasyonları nitel olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 25923’ün lipaz, proteaz ve hemoliz özelliklerini etkilememektedir. Şekil 9 ve şekil 10’da %5 koyun kanlı agarda oluşan hemolizler, şekil 11 ve şekil12’de yumurtalı agarda oluşan lipazlar, şekil 13 ve şekil 14’de yağsız süt tozlu besiyerinde oluşan proteazlar gösterilmiştir.



Şekil 7 : Vankomisin (kontrol) ortamdan ve vankomisinin %50 MİK, %25 MİK, %12,5 MİK'lerinden % 5 koyun kanlı agara yapılan ekimlerde oluşan hemolizler.



Şekil 8 : Vankomisinin MİK, 2 MİK, 4 MİK, 8 MİK'lerinden % 5 koyun kanlı agara yapılan ekimlerde oluşan hemolizler.



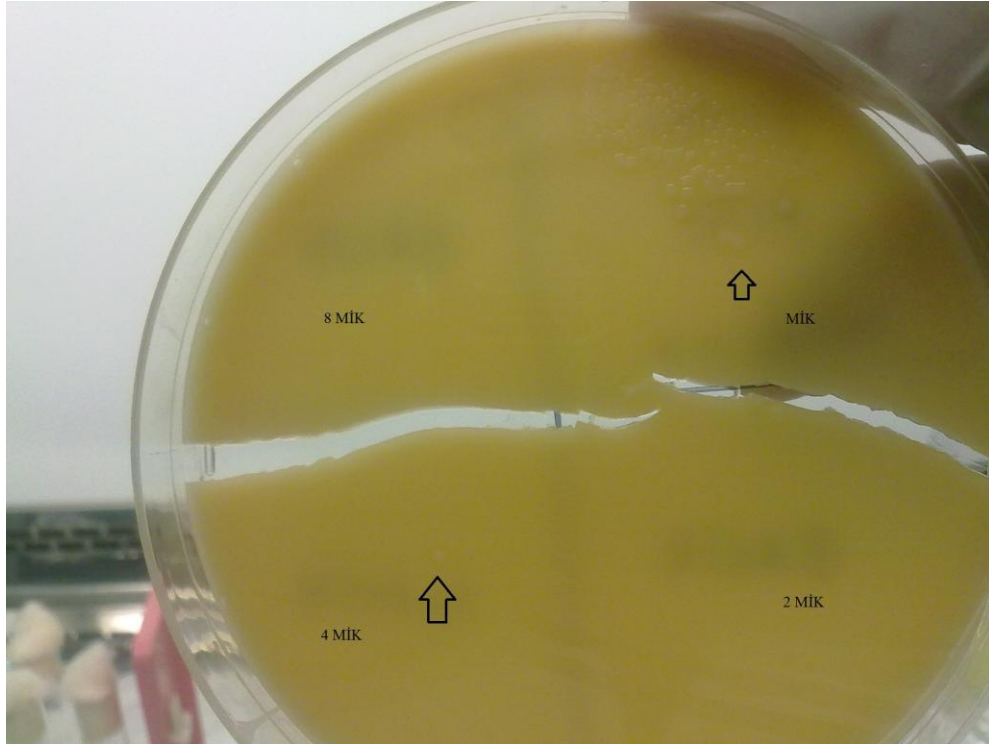
Şekil 9 : Vankomisin (kontrol) ortamdan ve vankomisinin %50 MİK, %25 MİK, %12,5 MİK'lerinden yumurtalı agara yapılan ekimlerde lipazın gözlenmesi.



Şekil 10 : Vankomisin MİK, 2 MİK, 4 MİK, 8 MİK'lerinden yumurtalı agara yapılan ekimlerde lipazın gözlenmesi.



Şekil 11 : Vankomisin (kontrol) ortamdan ve vankomisin %50 MİK, %25 MİK, %12,5 MİK’lerinden yağsız süt tozlu agara yapılan ekimlerde proteazın gözlenmesi.



Şekil 12 : Vankomisin MİK, 2 MİK, 4 MİK, 8 MİK’den yağsız süt tozlu agara yapılan ekimlerde proteazın gözlenmesi.

5- DEĞERLENDİRMELER

Tabloda *Staphylococcus aureus* ATCC 25923'nin virulansı için vankomisinin etkisi özetlenmiştir.

Tablo 15 : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923'nin, vankomisin etkisindeki virulansı

	8 MİK	4 MİK	2 MİK	MİK	%50 MİK	%25 MİK	%12,5 MİK	KONTROL
LATEKS AGGLİTİNASYON	-	-	-	-	+	+	+	+
LAM KOAGÜLAZ	-	-	-	+	+	+	+	+
TÜP K. 1.SA	-	-	-	-	-	-	-	-
TÜP K. 2. SA	-	-	-	-	+	+	+	+
TÜP K. 3. SA	-	-	-	-	+	+	+	+
TÜP K. 4. SA	-	-	-	-	+	+	+	+
TÜP K 24.SA	-	-	-	+	+	+	+	+
BİYOFİLM	-	-	-	-	+	+	+	+
LİPAZ	Üreme yok	Üreme yok	Üreme yok	+	+	+	+	+
PROTEAZ	+	+	Üreme yok	+	+	+	+	+
HEMOLİZ	+	Üreme yok	+	+	+	+	+	+

Standart suş olan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, vankomisinin supraMİK, MİK ve subMİK'lerinden kurtulduktan sonra uygun koşullarda üreme yeteneğini ve ekzoenzim üretme yeteneğini kaybetmemiştir.

Vankomisin MİK ve supraMİKlerinin olduğu koşullarda biyofilm oluşumu gözlenmemiştir. Bakteriler yeterli çoğunluğa ulaşamadıkları için veya vankomisin yüksek konsantrasyonlarının bir şekilde biyofilm oluşumunu engellemesi yüzünden vankomisin supraMİK ve MİKlerinin olduğu koşullarda biyofilm negatif gözlemlenmiş olabilir.

Staphylococcus aureus ATCC 25923 vankomisinin MİK ve supraMİK mikroçevre koşullarında lateks aglutinasyon gözlenmemiştir. Aglutinasyonun gözlenmesi için yeterli bakterinin ortamda bulunmaması lateks aglutinasyon testinin negatif sonuç vermesine neden olmuş olabilir.

Lam koagülaz vankomisinin minimum inhibisyon konsantrasyonunda ve subMİK’de pozitif, supraMİK’de ise negatif sonuç vermiştir. *Staphylococcus aureus* ATCC25923 hücre yüzeyine bağlı olan “clumping factor”ü vankomisinin MİK ve subMİK konsantrasyonlarında üretebilirken MİK üzeri konsantrasyonlarında üretemiyor olabilir. Fakat lam koagülazı sıvı besiyerinden alınan örnek ile değerlendirmek son derece güçtür. Görmek zor olduğu için yalancı pozitiflikler söz konusu olabilir.

Tüp koagülaz inkubasyonun ikinci saatinden itibaren vankomisinin subMİK’lerinde pozitif, supraMİK’de ise negatif sonuç vermiştir. İnkubasyonun yirmidördüncü saatinde supraMİK’de negatiflik devam ederken MİK’de pozitiflik görülmüştür. Bunun sadece MİK’de, yeterli miktardaki salınan koagülazın ancak yirmidört saatte ortamda birikebilmesi gibi bir nedeni olabilir.

Vankomisin subMİK’leri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923’ün olağan virulans yanıtlarında bir değişiklik meydana getirmemiştir. Vankomisinin etkisi altında *Staphylococcus aureus* ATCC 25923’de genotipik ve fenotipik bir değişiklik meydana gelmemiştir.

6- TARTIŞMA

Staphylococcus aureus ATCC 25923 standart suşunun, bazı virulans özelliklerini vankomisinin etkisi altında kaldıktan sonra da koruyabildiği gösterilmiştir. Vankomisinin %50MİK, %25MİK, %12,5MİK konsantrasyonlarında yapılan biyofilm, lam koagülaz, tüp koagülaz, lateks aglutinasyon, lipaz, proteaz, hemoliz deneyleri vankomisin içermeyen kontrol grubu ile aynı özellikleri göstermiştir. Kritik önem taşıyan vankomisin minimum inhibisyon konsantrasyonunda ve supraMİK’de ise besiyerlerinde üreme yetenekleri kaybolmadığından proteaz, hemoliz, lipaz pozitif gözlemlenmiştir. MİK kuyucuğundan alınan örnekte tüp koagülaz ancak vankomisin 24.saatinde pozitifleşmiş olup ilk dört saatte pozitifleşmemiştir. 8MİK’e kadar bakterisidal etki olmuyorsa neden aynı durumun 2MİK, 4MİK, 8MİK’lerde gerçekleşmemiş olduğu düşündürücüdür. Lateks aglutinasyon MİK değerinde negatif gözlemlenirken, lam koagülazda neden pozitif olabileceği de bir merak konusudur. Standart *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 diğer duyarlı suşlara genellendiğinde biyofilm oluşumunun vankomisin MİK değerinde pozitif saptanmaması klinik olarak sevindirici bir haber olmasına rağmen *in vitro* deneyler *in vivo* deneylerin yerini tutamaz, *in vivo*’da örneğin bir kataterde biyofilm oluşumu farklılık gösterebilir.

Literatürde *Staphylococcus aureus*’un vankomisin duyarlılığı ve vankomisin bakteriy üzerindeki etkinliği üzerine bir çok çalışma varken vankomisin bakterinin virulansına etkisi üzerine çok fazla çalışma yoktur. Antibiyotik maddelerle ilgili yapılan çalışmalarda bakış açısı genellikle konağın fizyolojisini nasıl etkilediği veya patojenin üremesinin inhibe olup olmadığı ya da patojenin hangi konsantrasyonlarda öldüğü üzerinedir. Çalışmamızda olaya bakteri tarafından bakılmıştır. Bakteri, antibiyotiğin çeşitli konsantrasyonlarında üredikten sonra antibiyotik içermeyen ortama ekildiğinde ilgili virulansını koruyup korumadığı gözlemlendi. Bakterinin virulansının ve fizyolojisinin anlaşılması, bir sonraki çalışmalara temel oluşturma ve klinik durumlar için önemlidir.

Hanberger H. ve ark.’nın çalışmasında *Staphylococcus aureus* ATCC 25923’ün vankomisin minimum inhibisyon konsantrasyonu 25µg/ml Mg^{2+} içeren ve sırasıyla 0 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 200 µg/ml Ca^{2+} içeren MHB ile yapılan üç farklı deneyde 2µg/ml bulunmuştur (25). Pelletier J. R. ve ark. 48 kere yaptıkları deneyde *Staphylococcus aureus* ATCC 25923’ün vankomisin MİK’nin ortalamasını 1,56 µg/ml minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) ortalamasını ise 3,12 bulmuşlardır (26). Frandros J. P. ve ark.’larının

çalışmasında *Staphylococcus aureus* ATCC 25923'ün vankomisin MİK'i agar test dilusyon yönteminde 1 µg/ml , sıvı dilusyon yönteminde 2 µg/ml bulunmuştur (27). Undekwu K. I ve ark.'nın CLSI prosedürüne göre yaptıkları E-test ve sıvı mikrodilusyon sonuçlarında *Staphylococcus aureus* ATCC 25923'ün vankomisin için MİK'i 1 µg/ml bulunmuştur (28). Gedik H. ve ark. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 suşlarının MİK ve MBK'lerini 2 µg/ml bulmuşlardır (29). Goddfresson ve ark. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 için vankomisin MİK değerini 1 µg/ml, post antibiyotik etkisini 1.9 ± 0.4 saat (PAE= T – C, C= kontrol organizmasının üremesinde 1 log artışı için geçen süre, T= antbiyotik olmayan ortamda önceden antibiyotikle karşılaşmış organizmanın üremesinde 1 logluk artışı için geçen süre) bulmuştur (30). Nagl M ve ark. Sıvı besiyeri dilusyon ve E test yöntemleriyle *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228'in vankomisinde MİK değerlerini 2 µg/ml bulmuştur (31).

Bizim çalışmamızda 20 µg/ml Ca^{2+} ve 10 µg/ml Mg^{2+} içeren MHB ile yapılan deneyde vankomisinin aynı suş üzerindeki minumum inhibisyon konsantrasyonu 1 µg/ml bulundu.

Staphylococcus aureus'un protein A'sı fare septik artritinde bir virulans faktördür (32). Stafilokokkal protein A (Spa), *Staphylococcus aureus* suşlarının hemen hemen hepsinde bulunan, hücre duvarına bağlı bir proteindir. Bu proteini *spa* geni kontrol eder ve bu gen logoritmik üreme fazı sırasında eksprese edilirken, logoritmik üreme fazı sonrası baskılanır (10).

Lateks aglütinasyon testi ilk kez 1980 yılında Essers ve Radebold tarafından tanımlanmıştır. Lateks partiküllerinin insan plazmasıyla kaplanması prensibine dayanmaktadır. Hem fibrinojen hem de IgG içeren bu reaktif, "clumping factor" ve *S. aureus* 'un protein A'sı ile reaksiyona girme özelliği gösterir. Karabiber ve ark. Tüp koagülaz ve lateks agglutinasyonu karşılaştırmış, lateks agglutinasyonun *S. aureus* identifikasyonunda en az tüp koagülaz kadar hassas ve doğru olduğunu bildirmiştir (33).

Bizim çalışmamızda *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, vankomisinin %50 MİK, %25 MİK, %12,5 MİK etkilerinde ve antibiyotiksiz ortamda 18saat ürediklerinde lateks agglutinasyon pozitif sonuç vermiştir. MİK, 2 MİK, 4 MİK, 8 MİK konsantrasyonlarında herhangi bir agglutinasyon gözlenmemiştir. Fakat lam koagülaz MİK'de pozitif gözlenmesi düşündürücüdür çünkü lateks agglutinasyon testinde clumping factor ve protein A'ya göre çökme gözlenir. Direkt agarda üreyen koloniden değil de üreme olan sıvı besiyerinden örnek

alınarak lam koagülaz ve lateks agglutinasyon yapılması değerlendirmeyi biraz daha zorlaştırmaktadır. Lam koagülaz, lateks agglutinasyona göre daha zor görülebilmektedir.

Bayrakal ve ark.'larının çalışmasında *S. aureus* ATCC 25923 suşu ve bir klinik suşun gentamisin en düşük baskılayıcı yoğunlukları (MİK değerleri) altındaki biyofilm oluşumu, lam koagülaz ve tüp koagülazları karşılaştırılmıştır. *S. aureus* ATCC 25923 için MİK, % 50 MİK, % 25 MİK, % 12,5 MİK'de lam koagülaz ve biyofilm pozitif bulunurken tüp koagülaz ikinci saatte başlayıp ilk olarak % 25 MİK ve % 12,5 MİK'de pozitif görülmüştür. 4. ve 24. saatlerde ise tüp koagülaz 2 MİK, MİK, % 50 MİK, % 25 MİK, % 12,5 MİK'de pozitif saptanmıştır(2). Aynı suş üzerinde aynı deney vankomisinle yapıldığında biyofilm oluşumu sadece vankomisin % 50 MİK, % 25 MİK, %12,5 MİK'lerinde pozitif olduğu gentamisinden farklı olarak MİK'de biyofilm negatif olduğu saptanmıştır. Tüp koagülaz ise 4. saatte MİK ve supra-MİK'lerde negatiftir. Koagülaz deneyinin 24. saatinde ise MİK'de tüp koagülaz pozitif olmuştur fakat supra-MİK'de pozitifleşmemiştir.

Jiazhang Qiu ve ark.'nın tavşan kanı ile yaptığı deneylere göre mentol konsantrasyonlarının artışı *Staphylococcus aureus*'un hemolizini azaltırken proteazına önemli bir etkide bulunmamıştır (34). Yapılan deneylerde yöntem spektrofotometrik olup sayısal değerler alınmıştır. Bizim çalışmamızda ise var-yok şeklinde nitel sonuçlar aldığımızdan vankomisin konsantrasyonlarının hemoliz, proteaz, lipaz üretiminde belirgin farklar görülmemektedir. Kesin olan durum, bu özelliklerin *S. aureus* ATCC 25923'de vankomisinin MİK ve subMİK'lerinde ve bakterisidal olmayan konsantrasyonlarda kaybolmadığıdır.

Sakoulas G. ve ark.'ları antibiyotik tedavisi gören kronik endovasküler enfeksiyonlu bir hastadan belirli aralıklarla izole ettikleri MRSA'ların virulans faktörlerini çalışmışlardır. Vankomisin tedavisi sonrası izole ettikleri suşlarda, delta hemolizin düşük olmasına rağmen varlığını korumuştur fakat hasta vankomisinden linezolide geçtiğinde kandan izole edilen suşların delta hemolizin yapabilme yeteneği artmıştır. Vankomisin tedavisi süresince kandan izole edilen suşların polistrene yapışabilme yetenekleri kararlı bulunmuştur. Vankomisinin bırakılıp linezolide geçildiği zaman izole edilen suşların polistrene yapışabilmesi keskin bir azalma göstermiştir (35). Bu çalışmada izole edilen suş MRSA olup bizim suşumuzdan farklıdır ve bu çalışma *in vivo* yapılan bir çalışmadır. Bizim çalışmamız ise *in vitro* bir çalışmadır. Her ikisi de vankomisin virulans üzerindeki etkisini incelemiştir. Biz de çalışmamızda vankomisin farklı konsantrasyonlarında *S. aureus* ATCC 25923'ün %5

koyun kanlı agarda hemoliz özelliğini koruduğunu bulduk. Ve bizim çalışmamızda da vankomisin sub-MİK konsantrasyonlarıyla karşılaşan *S. aureus* ATCC 25923, vankomisin ile karşılaşmayan gibi biyofilm oluşturma yani polistrene yapışma yeteneğindedir.

Yarwood M. Ve ark.'ları yaptıkları çalışmada *Staphylococcus aureus* biyofilmlerinde virulans faktörlerinin oluşturulmasını incelemiştir. Biyofilm içindeki non-hemolitik (agr hasarlı), hemolitik (agr pozitif) ve hiperhemolitik (agr pozitif) altpopulasyonlardan non-hemolitikler sayıca baskın ve kararlıyken hiperhemolitik varyantlar kararsızdır. Transkripsiyon profillemesi nonhemolitik varyantta *agr* lokusunun ekspresyonunun ve birçok hücre dışı virulans faktörünün baskılandığını ortaya koymuştur (36). Bu çalışmayla karşılaştırıldığında kanlı agardaki görünüme göre bizim çalışmamızdaki *S. aureus* ATCC 25923 hiperhemolitiklidir. Ve vankomisin etkisi altında kaldıktan sonra ölmediği takdirde hemoliz yeteneğini kaybetmemiştir. Biyofilm yapımı ise sadece MİK altı vankomisin konsantrasyonlarında pozitifdir. MİK ve üzeri konsantrasyonlarda biyofilm oluşumunun olmaması yeterli çoğunluğa ulaşamadığı için olabilir.

Bazen mikroorganizmalarda bazı virulans genleri varlığı saptanabilirken, bunlar fenotipe görülmeyebilir. Sudağıdan M ve ark.'larının metisiline dirençli *S. aureus* üzerinde yaptığı çalışmada virulans genlerinin bazılarının varlığı saptanmış ancak bunun fenotipe yansımadığı gözlenmiştir. Biyofilm testlerinde biyofilm üreten suşa rastlanmadığı halde çalışmaya alınan tüm suşların biyofilm yapımında rol oynayan *ica A* genine sahip olduğu bulunmuştur. Biyofilm yapımında rol oynayan *icaC* ve *bap* genlerine ise rastlanmamıştır. PCR ile proteazla ilgili *sspA*, *sspB*, *aur* ve serin proteaz genlerinin varlığı saptanmış fakat sütü ve kazein agarlarda yapılan proteaz üretimi testleri negatif bulunmuştur. Tween 20, Tween 80 ve tributirin içeren besiyerleri kullanılarak bakılan lipaz üretiminde inkubasyonun üçüncü günü pozitiflik saptanmıştır fakat lipazda sorumlu *geh* geni tespit edilememiştir (37).

Biz çalışmamızda virulans genlerinin varlığına bakmadık fakat vankomisinin standart bir suşun fenotipinde kayıplara neden olup olmadığını araştırdık ve sonuç olarak vankomisinin nitel olarak bir değişiklik yapmadığı sonucuna vardık. Daha sonra, bu virulanslar hem nicel olarak incelenip hem de gen bazında incelenip daha ayrıntılı bir çalışma yapılabilir.

7- **SONUÇ VE ÖNERİLER**

Vankomisin, üreme olduğu sürece *S. aureus ATCC 25923*'ün proteaz, lipaz, hemoliz özelliklerinin yok olmasını sağlamamaktadır. *S. aureus ATCC 25923*, vankomisinin sub-mik değerlerinde biyofilm, tüp koagülaz, lam koagülaz, lateks aglutinasyon, hemoliz, lipaz, proteaz yapabilme yeteneklerini korur. Daha sonra, bu virulanslar hem nicel olarak incelenip hem de gen bazında incelenip daha ayrıntılı bir çalışma yapılarak fizyopatolojisi aydınlatılabilir. Klinikte kullanılan başka antibiyotiklerin etkileri araştırılarak karşılaştırma yapılabilir. Bu tür çalışmalar *Staphylococcus aureus*'un virulansının nasıl işlediğini ve mevcut antibiyotiklerin virulansı üzerine etkilerini aydınlatma bakımından önemlidir.

8- **KAYNAKLAR**

- 1- Haddadin, R.N.S., Saleh, S., Al-Adham, I.S.I., Buultjens, T.E.J., Collier, P.J.(2009) The effect of subminimal inhibitory concentrations of antibiotics on virulence factor expressed by *Staphylococcus aureus* biofilms. J App. Microbiol. ISSN 1364-5072
- 2- Bayrakal, V. , Doğan, Y. , Baskın, H., Bahar, H., Gentamisine duyarlı *Staphylococcus aureus* suşlarında gentamisin biyofilm ve koagülaz oluşumuna etkisi. ANKEM Derg. 2007 , 21(3):175-178
- 3- Dancer , S.J. The effect of antibiotics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2008; 61:246-253
- 4- Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Dördüncü baskı. İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi; 2004 Sf: 495-501,711,
- 5- Topçu W. A. Söyletir G. Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İkinci cilt. Nobel Tıp Kitapevleri; 2002 sf:1507-1516
- 6- Salyers A. A., Whitt D. D. Bacterial Pathogenesis A Molecular Approach. Second edition. Washington: ASM Press ; 2002 page: 223-224
- 7- Moat GA, Foster Wj, Spector PM. Microbial Physiology, fourth edition, USA, Wiley-Liss, 2002, p322-323
- 8- Sihorkar,V, Vyas,S.P.,Biofilm Consortia on Biomedical and Biological Surfaces: Delivery and Targetting Strategies. Pharmaceutical Research 2001; 18(9):1247-1254
- 9- Otto, M.,Staphylococcal Biofilms. Curr Top Microbiol Immunol.2008;322:207-228
- 10- Gao, J, Stewart, C. G. Regulatory elements of *Staphylococcus aureus* protein A (Spa) promoter. Journal of Bacteriology, June 2004, p. 3738–3748
- 11- Rivera, J, Vannakambadi, G, Höök, M, Speziale, P, Fibrinogen-binding proteins of Gram-positive bacteria. Thromb Haemost 2007;98:503-511
- 12- Saxena S, Gomber C. Superoxide dismutase, protease and lipase expression in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* : a tool for antimicrobial drug discovery. Mol Cell Biochem.
- 13- Takeuchi, S, Saito, M, Imaizumi, K, Kaidoh, T et al. Genetic and enzymatic analyses of metalloprotease (aureolysin) from *Staphylococcus aureus* isolated from domestic animals. Veterinary Microbiology , (2002), 84: 135–142

- 14- Snah, D.B., Wilson, J.B. Egg Yolk Factor of *Staphylococcus aureus* , I. Nature of the Substrate and Enzyme Involved in the Egg Yolk Opacity Reaction, J.Bacteriol.1962;85:516-521
- 15- Davis B.D.,Dulbecco R., Eisen H. N., Ginsberg H.,S: Microbiology, fourth edition, 1990, J.B. Lippincott Company, page:543-546
- 16- Salyers A. A., Whitt D. D. Bacterial Pathogenesis A Molecular Approach. Second edition. Washington: ASM Press ; 2002 page: 158
- 17- “<http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=25923&Template=bacteria>” , Nisan 2011
- 18- “<http://www.remel.com/Clinical/DiagnosticTests/Staphaurex.aspx>” , Nisan 2011
- 19- Doğan, Y, Bayrakal, V, Bahar, H, Baskın,H, Gentamisin varlığında *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında biyofilm oluşumu ve quorum sensing ilişkisi, Türk Mikrobiyol. Cem. Derg. 2007; 37(3): 134-137
- 20- Kanamaru, S, Kurazono, H, Terai, A, Monden, K et al. Increased biofilm formation in *Escherichia coli* isolated from acute prostatitis. International Journal of Antimicrobial Agents 2006; 28S: S21-S25
- 21- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI): (Ceviri editörü Deniz Gur) Antimikrobik Duyarlılık Testleri için Uygulama Standartları, Ondokuzuncu Bilgi Eki, M100-S19, Ankara: Bilimsel Tıp Kitabevi, 2009; sf: 100,101,112-114.
- 22- Baskın, H., Doğan, Y., Bahar, H., Yuluğ , N, Effect of subminimal inhibitory concentrations of three fluoroquinolones on adherence of uropathogenic strains of *Escherichia coli*, International Journal of Antimicrobial Agents 2002; 19: 79–82
- 23- Miedzobrodzki., J , Kaszycki, P , Bialecka ,A, Kasprowicz, A. Proteolytic Activity of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from the Colonized Skin of Patients with Acute-Phase Atopic Dermatitis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2002) 21:269–27
- 24- Yarlı İ. *Staphylococcus aureus* suşlarında çeşitli virulans faktörlerinin araştırılması.Yüksek lisans tezi. T.C. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve klinik mikrobiyoloji anabilim dalı; İstanbul - 2005 Sf: 18
- 25- Hanberger , H, Nilsson, L. E., Maller, R, Isakkson, B. Pharmacodynamics of daptomycin and vancomycin on *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* demonstrated by studies of

- initial killing and post antibiotic effect and influence of Ca^{2+} and albumin on these drugs. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Sept. 1991, p. 1710-1716
- 26- Lawrence, L., Pelletier, R.J., Cynthia, B. B. Oxacillin, cephalotin, and vancomycin tube microdilution MBC result reproducibility and equivalence to MIC results for methicillin susceptible and reputedly tolerant *Staphylococcus aureus* isolates. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Mar. 1988, p.374-377
 - 27- Flandrois, J., P., Fardel, G., Carret, G. Early stage of in vitro killing curve of LY146032 and vancomycin for staphylococcus aureus. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Apr. 1988, p.454-457
 - 28- Undekwu, K. I., Parrish, N., Ankomah, P. et al. Functional relationship between bacterial cell density and efficacy of antibiotics. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2009; 63:745-757
 - 29- Gedik, H., Benzonana, N, Taşer, B ve ark. Homojen MRSA suşlarında vankomisin toleransı. Ankem Derg. 1998; 12 (1) : 81-85
 - 30- Gottfredsson, M, Erlendsdottir, H, Gudmundsson, A et al. Different patterns of Bacterial DNA synthesis during postantibiotic effect. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, June 1995, p.1314-1319
 - 31- Nagl, M, Neher, C, Hager, J et al. Bactericidal activity of vancomycin in cerebrospinal fluid. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Aug 1999, p.1932-1934
 - 32- Palmqvist, N., Foster, T., Tarkowski, A, Josefsson, E. Protein A is a virulence factor in *Staphylococcus aureus* arthritis and septic death. Microbial Pathogenesis, 2002, 33: p239-249
 - 33- Karabiber, N, Emekdaş, G, *Staphylococcus aureus*'un İdentifikasyonunda Lateks Aglütinasyonu ile Tüp Koagülaz Testlerinin Karşılaştırılması. Türk Mikrobiyol cem Derg 1992; 22:16-18
 - 34- Qiu J., Luo M., D. Jing et al. Menthol diminishes *Staphylococcus aureus* virulence-associated extracellular protein expression. Appl Microbiol Biotechnol. 2011; 90:705–712
 - 35- Sakoulas, G., Gold, H., S., Cohen, R., A, Venkataraman, L. et al. Effects of prolonged vancomycin administration on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a patient with recurrent bacteraemia. Journal of Antimicrobial Chemotherapy , 2006; 57: 699–704
 - 36- Yarwood, M.Y., Paquette, M.K., Tikh, B.I., Volper, E.M., Greenberg, E.P, Generation of virulence factor variants in *Staphylococcus aureus* biofilms. Journal of Bacteriology 2007; 189(22):7961-7967

- 37-Sudağıdan, M., Çavuşoğlu, C., Bacakoğlu, F. Biyomalzeme yüzeylerinden izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarında virulans genlerinin araştırılması. Mikrobiyol. Bül. 2008 ; 42: 29-39

9- EKLER

9.1. Suş Kullanım İzni



T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ HASTANESİ
Merkez Laboratuvarı

SAYI :B.30.2.DEÜ. 0.H1.70.75

12.07.2010

KONU:

Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Komisyonu'na

Mikrobiyoloji Yüksek Lisans öğrencisi Ece SÖKMEN'in "*Staphylococcus aureus* üzerine vankomisin subminimal inhibitör konsantrasyon ve minimal konsantrasyonlarda virulansa etkisi" isimli tezi için Merkez Laboratuvarı Bakteriyoloji birimi suş koleksiyonundan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 suşunu kullanmasında bir sakınca yoktur.

Bilgilerinize sunarım.

Prof.Dr. Canan ÇOKER
Merkez Laboratuvarı Bşk
Başhekim Yardımcısı

9.2. Etik Kurul Onayı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel (Invaziv) Olmayan Klinik Araştırmalar Değerlendirme Komisyonu

Sayı: 227
Konu: Karar hk.

12.8.2010

Prof.Dr.Hakkı BAHAR
Doç.Dr.Hüseyin BASKIN
Ece SÖKMEN

Komisyonumuz tarafından 11.08.2010 tarih ve 167-İÖÇ protokol numaralı 2010/10-08 karar ile onayı alınan "Staphylococcus aureus Üzerine Vankomisin Subminimal İnhibitor Konsantrasyon ve Minimal İnhibitör Konsantrasyonlarda Virulansa Etkisi" konulu araştırmanıza ilişkin Komisyonumuz kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.



Prof.Dr.Ayşegül YILDIZ
Başkan

Ek: Komisyon Kararı

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi İnciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE
Tel:0 232 4122254 - 0 232 4122258 Faks: 0232 4122243 Elektronik posta:etikkurul@deu.edu.tr

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR DEĞERLENDİRME KOMİSYONU KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR DEĞERLENDİRME KOMİSYONU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 1. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	167 -İÖÇ
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Staphylococcus aureus Üzerine Vankomisin Subminimal İnhibitor Konsantrasyon ve Minimal İnhibitor Konsantrasyonlarda Virulansa Etkisi
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	-
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.Hakkı BAHAR Doç.Dr.Hüseyin BASKIN Ece SÖKMEN
	ARAŞTIRMA MERKEZİ ve AÇIK ADRESİ	Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Yüksek Lisans Programı İnciraltı-İZMİR 35340
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐	İngilizce ☒	Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	-		Türkçe ☐	İngilizce ☐	Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒	İngilizce ☐	Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2010/10-08	Tarih:11.08.2010
	Prof.Dr.Hakkı BAHAR, Doç.Dr.Hüseyin BASKIN proje yöneticisi olduğu Ece SÖKMEN sorumluluğunda yapılması tasarlanan "Staphylococcus aureus Üzerine Vankomisin Subminimal İnhibitor Konsantrasyon ve Minimal İnhibitör Konsantrasyonlarda Virulansa Etkisi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	DEU Girişimsel (İnvaziv) Olmayan Klinik Araştırmaları Değerlendirme Komisyonu Yönergesi , İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
ETİK KURUL ÜYELERİ	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof. Dr. Ayşegül YILDIZ (Başkan)	Psikiyatri	DEU Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Dr.Ecz.İskender İNCE (Başkan yardımcısı)	Eczacı	Ege Üniversitesi ARGEFAR	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Ph.D..Z.Candan ALGUN	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Ph.D.Zuhal BAHAR	Ph.D. Yüksek Hemşire	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nuray DUMAN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Derya ERÇAL	Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ömer Selahattin TOPALAK	İç Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Hülya ELLİDOKUZ	Halk Sağlığı	DEU Onkoloji Enstitüsü Prevanif Onkoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç Dr.Yeşim ÖZTÜRK	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Av. Tayfun OZANKAYA	Hukuk	Serbest	Erkek	E ☐	H ☒	
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐	H ☒	

9.3. Özgeçmiş

KİŞİSEL BİLGİLER

TC Kimlik No / Pasaport No:	34519775630
Doğum Yılı:	1986
Yazışma Adresi :	Menderes Caddesi 136/1 Sok. No: 3/3 Buca İZMİR
Telefon :	05333820879, 05542856818
e-posta :	ecesokmen@gmail.com , ece.sokmen@ogr.deu.edu.tr

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Ege Üniversitesi	Fen Fakültesi	Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Ağırlıklı Biyoloji Lisans	2,85	2008
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Mikrobiyoloji Yüksek Lisans	3,09	2011

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
X	X	X	X	X	X

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Mikrobiyoloji

DİĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			X
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			X
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			X
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans	X	X
	Doktora	X	X
	Uzmanlık	X	X
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			
<u>Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler :</u> 1- Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, 2011 - <u>Sertifikalar :</u> 1- Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası 2- İyi Üretim Uygulamaları (GMP) Sertifikası 3- CMAS 1 Yıldız Dalış Sertifikası 4- B ve A2 Sürücü Belgesi <u>Dinlevici Olarak Katılınan Kurslar, Seminerler :</u> 1- Serolojik testlerde kalite” konulu kurs, KLİMUD Sürekli Tıp Eğitimi/ Sürekli Mesleki Gelişim Etkinlikleri, 16 Nisan 2011, DEÜ Tıp Fakültesi Temel ve Klinik Mikrobiyoloji ABD seminer salonu., İzmir, Türkiye 2- “Real time PCR ve İleri Uygulamaları” konulu seminer, BIORAD, 20 Ekim 2010, Dokuz			

- Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası 4. Kat seminer salonu, İzmir, Türkiye
- 3- 2. Laboratuvar Hayvanları Bilimi Sempozyumu, DEÜ SBE, 1-2 Ekim 2010, Dokuz Eylül Üniversitesi Ürkmez Sosyal Tesisleri, İzmir, Türkiye
 - 4- “ Araştırma-Buluş-Patent Yolunda Üniversite” konulu sempozyum, DEÜ SBE, 19 Şubat 2010, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası 4. Kat seminer salonu, İzmir, Türkiye
 - 5- Nanobiyoteknolojik Yaklaşımlar Sempozyumu, 7 Mart 2008, EBİLTET, İzmir, Türkiye
 - 6- Fermentasyon Teknolojileri Semineri, Andre Grebe, Sartorius Stedim Systems GmbH, Sartorius Stedim Biotech, Kasım 2007, Ege Üniversitesi EBİLTEM seminer salonu, İzmir, Türkiye
 - 7- “Patojen Algler” konulu eğitim semineri, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi EUBİYOLOJİ topluluğu, 14.03.2007, Ege Üniversitesi Biyoloji Bölümü, İzmir, Türkiye
 - 8- 13. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, EBİLTET ve EUBİYOLOJİ toplulukları, 20.09.2006 – 23.09.2006, Ege Üniversitesi MÖTBE, İzmir, Türkiye
 - 9- MBG Haftasonu, Boğaziçi Üniversitesi Bilim Kulübü, 12.05.2006 - 14.05.2006 , Boğaziçi Üniversitesi, İstanbul, Türkiye
 - 10- 1. Bilim Teknoloji Günleri Ödüllü Öğrenci Sunumları Yarışması, EBİLTET, 24.03.2006, Ege Üniversitesi EBİLTEM seminer salonu, İzmir, Türkiye
 - 11- “Sunum Teknikleri” konulu eğitim semineri, EBİLTET, 23.12.2005, Ege Üniversitesi EBİLTEM seminer salonu, İzmir, Türkiye
 - 12- “İzmir Kırsalında Etnobotanik” konulu eğitim semineri, Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji Öğrenci Topluluğu (EBİLTET), 20.12.2005, EBİLTEM seminer salonu, İzmir, Türkiye
 - 13- Word Year of Physics IV. International Conference and Festival of Physics Students Turkish Physical Society, 31.08.2005 – 03.09.2005, DEÜ Ürkmez Sosyal Tesisleri, İzmir, Türkiye

Sosyal Aktiviteler ve Üyesi Olduğu Öğrenci Toplulukları :

- 1- Ege Üniversitesi Kuş Gözlem Topluluğu (EGKT), 2004 – 2005
- 2- Ege Üniversitesi Rock Topluluğu, 2005 – 2006
- 3- Ege Üniversitesi Rafting Topluluğu (ERAFT), 2005 – 2006
- 4- Ege Üniversitesi Havacılık Kolu (EHAVK), 2005 – 2006

- 5- Ege Üniversitesi Bilim Teknoloji Topluluğu (EBİLTET) Biyoloji Araştırma Grubu, 2005 – 2007
- 6- Ege Üniversitesi Mağara Araştırma Kulübü (EMAK), 2006 – 2008
- 7- Türk Hava Kurumu Buca Şubesi, 2006 - 2008

ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
X	X	X

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

X

Diğer dergilerde yayınlanan makaleler

X

Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar

X

Diğer yayınlar

X

Düzenleme Tarihi : 05.05.2011