



T.C.

**ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ**

**TIP FAKÜLTESİ**

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİMDALI**

**HASTANE İZOLATI STAPHYLOCOCCUS AUREUS VE  
KOAGÜLAZ NEGATİF STAPHYLOCOCCUS SUŞLARINDA  
METİSİLİN DİRENCİNİN FARKLI YÖNTEMLERLE  
ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Aygöl TURAÇ BİÇER**

**UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Akgün Yaman**

**ADANA- 2009**



T.C.

ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİMDALI

**HASTANE İZOLATI STAPHYLOCOCCUS AUREUS VE  
KOAGÜLAZ NEGATİF STAPHYLOCOCCUS SUŞLARINDA  
METİSİLİN DİRENCİNİN FARKLI YÖNTEMLERLE  
ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Aygöl TURAÇ BİÇER**

**UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI**

**Prof. Dr. Akgün YAMAN**

**TF2006LTP10  
ADANA- 2009**

## TEŞEKKÜR

Mikrobiyoloji Anabilim Dalında asistanlık eğitimim süresince yetişmemde büyük emekleri ve katkıları olan, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım değerli hocalarım, Prof. Dr. Fatih Köksal, Prof. Dr. Kadri Özcan, Prof. Dr. Fügen Yarkın, Prof. Dr. Akgün Yaman ve Prof. Dr. M.Macit İlkit'e;

Tezimin hazırlanmasında benden yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini paylaşan, her konuda rahatlıkla ulaşıp danıştığım tez danışmanım sayın Prof. Dr. Akgün Yaman'a;

Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda bulunduğum süre içerisinde tez çalışmalarımdaki yardımlarından dolayı Yrd. Doç. Dr. Filiz Kibar'a, doktora öğrencisi Pınar Etiz'e, yüksek lisans öğrencileri Esra Zorluer ve Onur Uçar'a ve mikrobiyoloji biriminde çalışan tüm laborant arkadaşlara;

Çalışmamın istatistiksel analiz bölümünde, verilerin değerlendirilmesinde katkılarından dolayı Doç. Dr. Gülşah Seydaoğlu'na ve yüksek lisans öğrencisi Çağla Sarıtürk'e;

Asistanlığım süresince her zaman yardımlarını gördüğüm bölüm sekreterimiz Suna Gökmen'e,

Eğitim sürem boyunca pek çok şey paylaştığım değerli asistan, biyolog ve teknisyen arkadaşlara;

Hayatım boyunca desteklerini hep yanımda hissettiğim anne ve babama, kardeşlerim Şule ve Ayşegül'e, sevgili eşim Ömer Sunkar'a ve biricik kızım İdil'e sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmamı, TF2006LTP10 no'lu proje ile destekleyen Ç.Ü. Rektörlüğü Araştırma Fonu'na teşekkür ederim.

Dr. Aygül TURAÇ BİÇER

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
TABLO LİSTESİ.....	IV
ŞEKİL LİSTESİ.....	V
KISALTMA LİSTESİ.....	VI
ÖZET.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
1.GİRİŞ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	2
2.1.Tarihçe.....	2
2.2. Sınıflama.....	3
2.3. Morfolojik ve Kimyasal Özellikleri.....	5
2.3.1. Görünüm ve Boyanma.....	5
2.3.2. Üreme ve Kültür Özellikleri.....	5
2.3.3. Biyokimyasal Özellikleri.....	6
2.3.4. Genom Yapısı.....	6
2.4. Virulans ve Patojeniteleri.....	7
2.4.1. Kapsül.....	7
2.4.2. Hücre Duvarı.....	7
2.4.2.1. Peptidoglikan Tabaka.....	7
2.4.2.2. Teikoik Asit.....	8
2.4.2.3. Yüzey Proteinleri.....	9
2.4.3. Toksinler.....	9
2.4.3.1. Sitolitik Toksinler.....	9
2.4.3.2. Enterotoksin.....	10
2.4.3.3. Eksfoliyatif Toksin (Eksfoliyatin).....	11
2.4.3.4. Toksik Şok Sendromu Toksini-1 (TSST-1).....	11
2.4.4. Enzimler.....	11
2.4.4.1. Katalaz.....	11
2.4.4.2. Koagülaz.....	11
2.4.4.3. Lip az.....	11
2.4.4.4. Hiyalüronidaz.....	12
2.4.4.5. Fibrinolizin (Stafilokinaz).....	12
2.4.4.6. Fosfatidilinozitol – Spesifik Fosfolipaz C.....	12
2.4.4.7. Deoksiribonükleaz.....	12
2.4.4.8. Beta-Laktamaz (Penisilinaz).....	12
2.4.4.9. Slime Faktör.....	12
2.5. Epidemiyoloji.....	13
2.6. Stafilokokların Neden Olduğu İnfeksiyonlar.....	15
2.6.1. <i>Staphylococcus Aureus</i> İnfeksiyonları.....	15
2.6.1.1. Deri Ve Yumuşak Doku İnfeksiyonları.....	15
2.6.1.2. Dolaşım Sistemi İnfeksiyonları.....	15
2.6.1.3. Solunum Sistemi İnfeksiyonları.....	15
2.6.1.4. Kas ve İskelet Sistemi İnfeksiyonları.....	15



## TABLO LİSTESİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Bugüne kadar tanımlanmış stafilocok tür ve alt türleri.....	4
Tablo 2. Klinik olarak önemli stafilocok türlerinin tanımlanmasında kullanılan testler.....	20
Tablo 3. <i>S. aureus</i> ve KNS'larda CLSI tarafından önerilen oksasilin-sefoksitin disk.....	37
difüzyon ve E-test duyarlılık sınırları	
Tablo 4. LightCycler MRSA Detection Kit çalışma protokolü.....	40
Tablo 5. KNS türleri ve materyallere göre.....	42
Tablo 6. <i>S. aureus</i> ve KNS suşlarında fenotipik yöntemlerin uyumu [n (%)].....	43
Tablo 7. <i>S. aureus</i> ve KNS suşlarında mecA geni [n (%)].....	43
Tablo 8. mecA geni içermelerine karşın fenotipik yöntemlerle farklı duyarlılık.....	44
sonuçları izlenen suşlara ait veriler	
Tablo 9. mecA geni içermemelerine karşın fenotipik yöntemlerle farklı duyarlılık.....	45
sonuçları izlenen suşlara ait veriler	
Tablo 10. <i>S. aureus</i> ve KNS suşlarına uygulanan fenotipik yöntemlerin genotipik yöntem ile karşılaştırılması ve yöntemlerin uyumu.....	45
Tablo 11. MRS ve MSS suşlarında disk difüzyon yöntemi ile diğer antibiyotiklere.....	46
duyarlılık [n (%)].	
Tablo 12. <i>S. aureus</i> için kullanılan testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü.....	47
Tablo 13. KNS'lar için kullanılan testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü.....	47

## ŞEKİL LİSTESİ

### Şekil No

### Sayfa No

Şekil 1. Mec gen kompleksinin dört sınıfı.....	25
Şekil 2. ccr gen kompleksinin yapısı.....	26
Şekil 3. Stafilokoklarda tanımlanan SCCmec tipleri.....	28
Şekil 4. Stafilokok izolatlarının kliniklere göre dağılımı.....	41
Şekil 5. <i>S. aureus</i> suşlarının klinik örneklerle göre dağılımı.....	41
Şekil 6. KNS suşlarının klinik örneklerle göre dağılımı.....	42
Şekil 7. mecA geni pozitif olan suşların real-time PZR görüntüsü.....	44

## KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
BOS	: Beyin Omurilik Sıvısı
BORSA	: Borderline Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
CRF	: Coagulase Reacting Factor
DDT	: Disk Difüzyon Test
FRET	: Fluoresance Resonance Energy Transfer
KNS	: Koagülaz Negatif Stafilokok
MRS	: Metisilin Rezistan Stafilokok
MRKNS	: Metisilin Rezistan Koagülaz Negatif Stafilokok
MRSA	: Metisilin Rezistan <i>Staphylococcus aureus</i>
MSS	: Methicilline Susceptibility <i>Staphylococcus</i>
MSSA	: Methicilline Susceptibility <i>Staphylococcus aureus</i>
SCC	: Staphylococcal Cassette Chromosome
MİK	: Minunum İnhibisyon Konsantrasyonu
MODSA	: Moderately Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MHA	: Muller Hinton Agar
Nİ	: Nozokomiyal İnfeksiyon
NAG	: N-asetil glukozamin
NAM	: N-asetil muramik asit
PBP	: Penisilin Bağlayan Protein
PFGE	: Pulsed Field Gel Electrophoresis
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SSSS	: Staphylococcal Scalded Skin Syndrome
TSST-1	: Toxic Shock Syndrome Toxin-1
TK-MRSA	: Toplum Kökenli-Metisiline Rezistan <i>Staphylococcus aureus</i>
Vitek 2-AST	: Vitek- 2 Antimicrobial Susceptibility Test
Vitek-2 GP	: Vitek-2 Gram Positive İdentification Card
VISA	: Vancomycin Intermediate <i>Staphylococcus aureus</i>
VRSA	: Vancomycin Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>

## ÖZET

### Hastane İzolatı *Staphylococcus aureus* ve Koagülaz Negatif *Staphylococcus* Suşlarında Metisilin Direncinin Farklı Yöntemlerle Araştırılması

**Amaç:** Hastane izolatı *Staphylococcus aureus* ve koagülaz negatif stafilocoklarda metisilin direnci, oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon testi, oksasilin E-testi, tuz agar tarama testi ve dirençten sorumlu mecA genin polimeraz zincir reaksiyonu ile gösterilmesi planlandı.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmada 2006 ile 2007 yılları arasında hastanemizde yatan hastalardan izole edilen 90 *Staphylococcus aureus* ve 90 koagülaz negatif stafilocok suşunda bu testler yapıldı. İzolatlar Vitek 2 otomatize sistemiyle tür düzeyinde tanındı. Altın standart olarak kabul edilen mecA geni ise polimeraz zincir reaksiyonu ile araştırıldı.

**Bulgular:** Oksasilin disk difüzyon testine göre *Staphylococcus aureus* izolatlarının 45 (% 50)'i, koagülaz negatif stafilocok izolatlarının 47 (% 52.2)'si dirençli, sefoksitin disk difüzyon testine göre *Staphylococcus aureus* izolatlarının 45 (% 50)'i, koagülaz negatif stafilocok izolatlarının 46 (% 51.1) 'sı dirençli, oksasilin E-teste göre *Staphylococcus aureus* izolatlarının 45 (% 50)'i, koagülaz negatif stafilocok izolatlarının 47 (% 52.2)'si dirençli, tuz agar tarama yöntemine göre *Staphylococcus aureus* izolatlarının 44 (% 48.9)'ü, koagülaz negatif stafilocok izolatlarının 41 (% 45.5)'i ve Vitek 2 otomatize sisteme göre *Staphylococcus aureus* izolatlarının 44 (% 48.9)'ü, koagülaz negatif stafilocok izolatlarının 47 (% 52.2)'si dirençli bulundu. *Staphylococcus aureus* izolatlarının mecA- polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile 44 (% 48.9)'ünde mecA geni pozitif iken koagülaz negatif stafilocok izolatlarının 45 (% 50)'inde mecA geni pozitif bulundu.

**Sonuç:** Stafilocoklarda heterojen dirençli suşlar nedeniyle metisilin direncinin fenotipik yöntemlerle gösterilmesi sıklıkla yanlışlıklara neden olmaktadır. Bu sorunun özellikle koagülaz negatif stafilocok suşlarında, *Staphylococcus aureus*'a göre daha da belirgin olduğu gözlenmektedir. Çalışmamızda *Staphylococcus aureus*'lar da fenotipik yöntemlerden, oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon, oksasilin E-test ve tuz agar tarama testi sonuçları aynı bulundu (duyarlılık % 97.72, özgüllük % 95.65 ). Koagülaz negatif stafilocok suşlarında fenotipik yöntemlerden sefoksitin disk difüzyon testi diğer yöntemlere göre altın standart teste en yakın test olarak bulundu (duyarlılık % 97.77, özgüllük % 97.77 ). Ancak, hem *Staphylococcus aureus*, hem de koagülaz negatif stafilocok suşlarında metisilin direncinin gösterilmesinde en uygun yöntem polimeraz zincir reaksiyonu ile mecA geninin belirlenmesidir.

**Anahtar sözcükler:** Koagülaz negatif stafilocok, mecA, metisilin direnci, *Staphylococcus aureus*.

## ABSTRACT

### **Detection of Methicillin Resistance in Nosocomial Isolates of *Staphylococcus aureus* and Coagulase Negative *Staphylococcus* Strains by Different Methods**

**Objective:** Methicillin resistance of nosocomial *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci was planned to be detected by oxacillin and cefoxitine disk diffusion tests, oxacillin E-test, salt agar screen and *mecA* gene which is responsible for the resistance by polymerase chain reaction.

**Material and Methods:** In this study, 90 *Staphylococcus aureus* and 90 coagulase negative staphylococci strains isolated from patients who were hospitalized in Çukurova University Hospital between 2006-2007. The isolates were identified by the Vitek 2 automated system. *mecA* gene which is accepted as gold standard was tested by polymerase chain reaction.

**Results:** In the oxacillin disk diffusion test, 45 (50 %) of the *Staphylococcus aureus* and 47 (52.2 %) of the coagulase negative staphylococci isolates, in the cefoxitine disk diffusion test 45 (50 %) of the *Staphylococcus aureus* and 46 (51.1 %) of the coagulase negative staphylococci isolates, in the oxacillin E-test 45 (50 %) of the *Staphylococcus aureus* and 47 (52.2 %) of the coagulase negative staphylococci isolates, in the salt agar screen 44 (48.9 %) of the *Staphylococcus aureus* and, 41 (45.5 %) of the coagulase negative staphylococci isolates, and in the Vitek 2 automated system, 44 (48.9 %) of the *Staphylococcus aureus* isolates and 47 (52.2 %) coagulase negative staphylococcus isolates were found to be resistant. The *mecA* gene was positive in 44 (48.9 %) of the *Staphylococcus aureus* and, 45 (50 %) of the coagulase negative staphylococci isolates polymerase chain reaction studies.

**Conclusion:** Detection of methicillin resistance in staphylococci by phenotypical methods often leads to false results. This problem is more evident in the coagulase negative staphylococci than the *Staphylococcus aureus* isolates. In our study, the results of the phenotypical methods, oxacillin and cefoxitine disk diffusion tests, oxacillin E-test and salt agar screen test were found to be consistent (sensitivity 97.72 %, specificity 95.65 %). Cefoxitine disk diffusion test was found to be the most accurate test reaching almost to the gold standard compared to the other methods in coagulase negative staphylococcus strains (sensitivity 97.77 %, specificity 97.77 %). However, the most appropriate method for detecting the methicillin resistance for both *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *staphylococci* isolates is detection of *mecA* gene by polymerase chain reaction.

**Key Words:** Coagulase negative *staphylococci*, *mecA*, methicillin resistance, *Staphylococcus aureus*.

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

*Micrococcaceae* ailesinin üyesi olan stafilocoklar, deri ve mukozalarda kolonize olabilen, değişik türleri ile farklı hastalıklar yapabilen önemli bir bakteri cinsidir. *Staphylococcus aureus*, çeşitli doku ve organlarda ağır infeksiyonlar oluşturabilen en önemli türüdür. *S.aureus* dışında ki türler koagülaz negatif stafilocok (KNS) olarak isimlendirilir. KNS'lar geçmişte sadece normal flora elemanı olarak kabul edilirken; günümüzde *S .aureus* kadar önemli bir mortalite ve morbidite nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır.

Stafilocoklar'ın nozokomiyal ve toplum kökenli infeksiyon etkenleri arasında önemi gün geçtikçe artmaktadır. Normal flora üyesi olan bu tür mikroorganizmalar, infeksiyon-kolonizasyon ayrımı yapmada ve direnç paternlerini değerlendirmede hekimleri zor durumda bırakmaktadır. Metisiline dirençli stafilocoklar (MRS) beta-laktam antibiyotiklerin yanı sıra diğer antibiyotiklere de dirençli olmaları nedeniyle; direnç özelliklerinin hızlı ve güvenilir olarak en kısa sürede tanımlanması, hem uygun antibiyotiğin kullanılması hem de tedavinin maliyeti açısından önemlidir.

Stafilocoklarda metisilin direnci; *mecA* geni tarafından kodlanan yeni bir penisilin bağlayıcı protein (PBP) olan PBP2a yapımı sonucu izlenir. Ancak, metisilin direncinin ekspresyonu, çevre koşullarından kolay etkilenir ve her zaman rutin kullanılan fenotipik testlerle belirlenemeyebilir. Bu nedenle *mecA* geninin tespitini sağlayan genotipik çalışmalar büyük önem taşımaktadır. Son yıllarda metisilin direncini göstermede çevre koşullarından ve heterojen metisilin direncinden daha az etkilenen sefoksitin disk difüzyon testi (sefoksitin DDT) giderek daha fazla kullanılan bir yöntem olmuştur.

Bu çalışmada; gün geçtikçe daha fazla mortalite ve morbidite etkeni olan MRS'ların metisilin direncinin daha güvenilir bir şekilde tespit edilmesi, izolatların metisilin duyarlılıklarının en kısa sürede belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu bilgiler ışığında *S.aureus* ve KNS'larda metisilin direnci Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü – CLSI önerileri doğrultusunda; oksasilin disk difüzyon test (oksasilin DDT), oksasilin E-test, sefoksitin DDT, tuz agar tarama metisilin direncini belirlemede kullanılmış, ancak altın standart olarak *mecA* geninin tespiti kabul edilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

Stafilokoklar *Micrococcaceae* ailesi içerisinde yer alan, doğada yaygın olarak bulunan Gram pozitif koklardır. Memelilerin deri ve muköz membranlarında normal flora elemanıdır. Stafilokoklar genelde buldukları yerde konakla iyi huylu ve simbiyotik bir ilişkiye sahiptirler, ancak deri ve mukozal travma, enjeksiyon veya cerrahi müdahaleler ile dokuya girmesi sonucu patojen olabilirler.<sup>1</sup>

### 2.1. Tarihçe

Stafilokokları ilk olarak 1878'de Robert Koch ışık mikroskopunda tanımlamış, 1880'de Pasteur sıvı besiyerinde üretmiştir. İskoçyalı cerrah Alexander Ogston 1881 de stafilokokların fareler ve kobaylar için patojen olduğunu gösterirken bu mikroorganizmalara; üremeleri sırasında birbirlerinden ayrılmayıp, üzüm salkımına benzeyen düzensiz kümeler oluşturmaları sonucu "*Staphylococcus*" (*Staphyle*: üzüm salkımı) adını vermiştir. Rosenbach 1884'de ilk kez insandan izole etmiştir. *S. albus* olarak adlandırılan bakteri grubunun birden fazla alt tür içerdiği ve 1970'lerden itibaren *S. epidermidis* dışındaki diğer KNS türleri de tanınmaya başlamıştır.<sup>1,2</sup>

Alexander Fleming'in 1928'de penisilini bulması ve 1940'da Florey ve Chain tarafından penisilin üretiminin başarılması ile stafilokok infeksiyonlarının tedavisinde önemli bir aşama kaydedilmiştir. Penisilinaz üretimi ilk olarak 1940'da Abraham Chain tarafından *Escherchia coli*'de bildirilmiştir. *S.aureus* suşlarında ise penisilin direncini 1944'de Kirby tanımlamıştır.<sup>3</sup>

İlk semisentetik penisilinaza dirençli antimikrobiyal olan metisilin 1959'da klinik kullanıma girmiştir. İki yıl sonra, ilk metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatları İngiltere'den bildirilmiştir. *S. aureus* suşlarındaki bu direnç 1960'lı yıllarda Avrupa'da ve 1970'li yıllarda ABD'nde önemli bir sorun haline gelmiştir. MRSA suşları özellikle 1980'li yıllarda hastane kaynaklı salgın etkeni olarak bildirilirken; kinolonlar, klindamisin, makrolidler, kloramfenikol, tetrasiklinler, aminoglikozidler, trimetoprim-

sulfametoksazol ve rifampisin gibi antibiyotiklere karşı çoklu direnç ile sık karşılaşmıştır.<sup>4,5</sup>

Çoklu direnç gösteren MRSA suşlarına bağlı infeksiyonların artması nedeniyle, son 25 senedir vankomisin, stafilokokal nozokomiyal infeksiyonların (Nİ) tedavisinde kullanılır hale gelmiştir. İlk olarak 1995'de Fransa'da,<sup>6</sup> 1996'da Japonya'da,<sup>7</sup> 1997 yılı içinde ABD,<sup>8</sup> Hong Kong<sup>9</sup> ve Kore'de<sup>10</sup> vankomisine azalmış duyarlılık (VISA:Vancomycin intermediate *S. aureus*) gösteren MRSA suşlarının izole edilmesi direnç sorununun ne kadar önemli olduğunu göstermiştir. İlk vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA) suşu, Haziran 2002'de ABD'nde diyaliz tedavisi gören 40 yaşındaki bir erkek hastanın kateter ucundan izole edilmiştir.<sup>11,12</sup> Direnç probleminin artmasıyla birlikte MRSA tüm dünyada nozokomiyal epidemilere yol açan ciddi bir sağlık sorunu haline gelmiştir.

## 2.2. Sınıflama

Bergey'in 1986'da yaptığı sistematik bakteriyoloji sınıflamasına göre, Micrococcaceae ailesinde *Stomatococcus* ve *Planococcus* ile birlikte yer alan *Staphylococcus* ve *Micrococcus* türleri Gram pozitif, katalaz pozitif koklardır.<sup>13</sup> Bununla birlikte DNA dizi analizi, DNA-rRNA hibridizasyonu, 16S rRNA'nın karşılaştırmalı oligonükleotid kataloglaması *Staphylococcus* ve *Micrococcus* türlerinin yakın ilişkili olmadığını göstermektedir. *Staphylococcus* türleri aynı zamanda *Bacillus*, *Brochothrix*, *Gemella*, *Listeria* ve *Planococcus* ile de nispeten yakın ilişkili bulunmuştur. Bu türler geçici olarak stafilokoklar ile *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* kümesinin Bacillaceae ailesindeki diğer türler ile birlikte sınıflandırılmıştır.<sup>1,2</sup>

Sonraki çalışmalar, mikrokokların oksidaz pozitif olduğunu, G+C oranının (%63-73 mol) yüksek olduğunu, laboratuvar koşullarında stafilokokların tersine furazolidon (100 µg/ml) ve lizostafine (200 µg/ml) dirençli iken, basitrasine (0.04 µg/ml) duyarlı olduklarını göstermiştir.<sup>1,2</sup>

Stafilokoklar içerisinde en patojen tür olan *S. aureus* infeksiyonlarda ilk sırada yer almaktadır. *S. aureus* dışında ki tüm stafilokok türleri genel olarak KNS'lar adı altında

anılmaktadır.<sup>13</sup> KNS'lar içerisinde klinik örneklerden en sık izole edilen tür bir deri flora üyesi olan *S. epidermidis*'tir.<sup>13,14</sup>

*Staphylococcus* cinsi içinde bugüne kadar 35 tür tanımlanmış olup, bunlardan 17 tanesi klinik örneklerden izole edilmiştir.<sup>2,13</sup>

**Tablo 1. Bugüne kadar tanımlanmış stafilocok tür ve alt türleri**<sup>2,13</sup>

Tür	Alt tür	Referans
<i>S.arlettae</i> <sup>¶</sup>		Schleifer et al. 1984
<i>S.aureus</i>	<i>anaerobius</i>	De la Fuente et al. 1985
<i>S.aureus</i> <sup>*</sup>	<i>aureus</i>	Rosenbach 1884
<i>S.auricularis</i> <sup>*</sup>		Kloos and Schleifer 1983
<i>S.capitis</i> <sup>*</sup>	<i>capitis</i>	Kloos and Schleifer 1975
<i>S.capitis</i> <sup>*</sup>	<i>ureolyticus</i>	Bannerman and Kloos 1991
<i>S.caprae</i> <sup>*</sup>		Devriese et al. 1983
<i>S.carnosus</i> <sup>¶</sup>	<i>carnosus</i>	Schleifer and Fischer 1982
<i>S.carnosus</i> <sup>¶</sup>	<i>utilis</i>	Probst et al. 1998
<i>S.chromogenes</i> <sup>§</sup>		(Devriese et al. 1978), Hajek et al. 1986
<i>S.cohnii</i> <sup>*</sup>	<i>cohnii</i>	Schleifer and Kloos 1975
<i>S.cohnii</i> <sup>*</sup>	<i>urealyticum</i>	Kloos and Wolfshohl 1991
<i>S.condimenti</i>		Probst et al. 1998
<i>S.delphini</i> <sup>§</sup>		Varaldo et al. 1988
<i>S.epidermidis</i> <sup>*</sup>		Winslow and Winslow 1908; Evans 1916
<i>S.equorum</i> <sup>§</sup>	<i>equorum</i>	Schleifer et al. 1984
<i>S.equorum</i> <sup>§</sup>	<i>linens</i>	Place et al. 2003
<i>S.felis</i> <sup>§</sup>		Igimi et al. 1989
<i>S.fleurettii</i>		Vernozy-Rozand et al. 2000
<i>S.gallinarum</i> <sup>§</sup>		Devriese et al. 1978
<i>S.haemolyticus</i> <sup>*</sup>		Schleifer and Kloos 1975
<i>S.hominis</i> <sup>*</sup>	<i>hominis</i>	Kloos and Schleifer 1975
<i>S.hominis</i> <sup>*</sup>	<i>novobiosepticus</i>	Kloos et al. 1998
<i>S.hyicus</i> <sup>§</sup>		(Sompolinski 1953), Devriese et al. 1978
<i>S.hyicus</i>	<i>chromogenes</i>	Devriese et al. 1978
<i>S.intermedius</i>		Hajek 1976
<i>S.kloosii</i> <sup>¶</sup>		Schleifer et al. 1984
<i>S.lentus</i> <sup>§</sup>		Kloos et al. 1976, Schleifer et al. 1983
<i>S.lugdunensis</i> <sup>*</sup>		Freney et al. 1988
<i>S.lutrae</i>		Foster et al. 1997
<i>S.muscae</i> <sup>§</sup>		Hajek et al. 1992
<i>S.pasteuri</i> <sup>*</sup>		Chesneau et al. 1993
<i>S.piscifermentans</i> <sup>¶§</sup>		Tanasupawat et al. 1992
<i>S.saccharolyticus</i> <sup>*</sup>		Kilpper-Balz and Schleifer 1981
<i>S.saprophyticus</i>	<i>bovis</i>	Hajek et al. 1996
<i>S.saprophyticus</i> <sup>*</sup>	<i>saprophyticus</i>	Shaw et al. 1951
<i>S.schleiferi</i> <sup>*</sup>	<i>coagulans</i>	Igimi et al. 1990
<i>S.schleiferi</i>	<i>schleiferi</i>	Freney et al. 1988
<i>S.sciuri</i>	<i>carnaticus</i>	Kloos et al. 1997
<i>S.sciuri</i> <sup>§</sup>	<i>lentus</i>	Kloos et al. 1976
<i>S.sciuri</i> <sup>§</sup>	<i>rodentium</i>	Kloos et al. 1997

**Tablo 1'in devamı**

<b>Tür</b>	<b>Alt tür</b>	<b>Referans</b>
<i>S.sciuri</i> <sup>§</sup>	<i>sciuri</i>	Kloos et al 1976
<i>S.simulans</i> <sup>*</sup>		Kloos and Schleifer 1975
<i>S.succinus</i>	<i>casei</i>	Place et al. 2003
<i>S.succinus</i>	<i>succinus</i>	Lambert et al. 1998
<i>S.vitulinus</i> <sup>§</sup>		Webster et al. 1994
<i>S.warneri</i> <sup>*</sup>		Kloos and Schleifer 1975
<i>S.xylosus</i> <sup>*</sup>		Schleifer and Kloos 1975

\* İnsanlarda ve insan dışı primatlarda bulunanlar

¥ Diğer hayvanlarda bulunanlar

§ Daha çok doğa ve toprakta bulunanlar

## **2.3. Morfolojik ve Kimyasal Özellikleri**

### **2.3.1. Görünüm ve Boyanma**

Stafilokoklar; 0.5-1.5 µm çapında, Gram pozitif, yuvarlak, hareketsiz, sporsuz mikroorganizmalardır. Zorunlu anaerop olan *S. saccharolyticus* ve *S. aureus subsp. anaerobius* dışında fakültatif anaerop olup çoğunlukla aerop üremeyi tercih ederler. Genellikle katalaz pozitif (*S. saccharolyticus* ve *S. aureus subsp. anaerobius* hariç), oksidaz negatif (*S. sciuri*, *S. lentus* ve *S. vitulinus* hariç), kapsülsüz mikroorganizmalardır. Katı besiyerinde bölünebilme özellikleri nedeni ile mikroskopta çoğunlukla düzensiz kümeler (üzüm salkımı) oluştururlar. Pürülan örnek içinde, infekte vücut sıvılarında veya sıvı besiyerlerinde morfolojik özellikleri üçlü-dörtlü kısa zincir yapan koklar şeklinde değişebilir. Bu görünümleri ile streptokoklara benzeyen stafilokoklar, katalaz testinin pozitif olması ile ayırt edilirler.<sup>1,2,13</sup>

### **2.3.2. Üreme ve Kültür Özellikleri**

Kanlı agar, nutrient agar, triptik soy agar veya beyin kalp infüzyon agar gibi besiyerlerinden izole edilen stafilokok türlerinin çoğunluğu 30-37°C'de 18-24 saat içinde 1-3 mm çapında koloni oluştururlar.<sup>1,2</sup> *S.aureus* kolonileri 18-24 saatte pigmente (krem rengi, sarı-portakal rengi), S tipi, yuvarlak, hafif kabarık ve çoğunluğu kanlı agarda beta hemoliz oluşturur. Belirgin kapsül oluşturan suşlar parlak ve ıslak görünüme sahip olabilir. *S.aureus*'un kanlı besiyerinde küçük, pigmentsiz ve hemoliz oluşturmeyen koloniler şeklinde üreyen küçük koloni varyantları tanımlanmıştır.<sup>1,15-17</sup>

KNS kolonileri hafif konveks kabarık, S tipi, parlak, ve genellikle pigmentsizdir. Kuvvetli slime tabakası oluşturan nadir türler mukoid koloni morfolojisi gösterirler. *S.haemolyticus* kolonileri genellikle *S.epidermidis* ve *S.hominis* kolonilerinden büyüktür. *S.epidermidis* ve *S.saprophyticus* suşlarının bazılarında beta hemoliz görülebilir.<sup>1,13</sup>

### 2.3.3. Biyokimyasal Özellikleri

*S. aureus* suşları koagülaz pozitifdir. Koagülaz pozitif olan diğer stafilokoklar; *S. intermedius*, *S. lugdunensis*, *S. hyicus*, *S. delphini*, *S. lutrae* ve *S. schleiferi subsp.dir*. Stafilokoklar glukozu fermantatif olarak parçalar ve son ürün olarak laktik asit oluştururlar. Ayrıca laktoz, sükroz, mannoz, trehaloz ve maltozu da fermente edebilirler. Mannitolu ise sadece *S. aureus* fermente eder.<sup>17,18</sup> Stafilokokların çoğunluğu % 7.5-10 NaCl içeren basit besiyerlerinde üreyebilirler. Suşların optimal üreme ısıları 30-37°C ve pH 7-7.5 arasındadır. Furazolidon ve lizostafine duyarlı olmalarına karşın, basitrasin ve lizozime direnç gösterirler. Nitratları nitritlere indirgerler. *S.aureus* ısıya ve kuruluğa dayanıklıdır. Stafilokoklar dezenfektan ve antiseptiklere duyarlıdır. Kuarterner amonyum klorür bileşikleri ile etkin bir şekilde dezenfekte edilebilir ayrıca alkol ve iyot gibi antiseptiklere de oldukça duyarlıdır.<sup>1,13</sup>

### 2.3.4. Genom Yapısı

Genomu yaklaşık 2000-3000 kbp bir kromozom ile profajlar, plazmidler ve transpozonlardan oluşur. Stafilokokların DNA'larındaki G+C oranı % 30-39 moldür.<sup>2,19</sup> *S. aureus* genomu, 2500 yakın geni kodladığı düşünülen 2800 kbp uzunluğunda tek bir kromozomdan oluşup, G+C içeriği yaklaşık % 32 moldür. *S.epidermidis*'in genomu, 2500 kbp uzunluğundaki bir kromozom ve çeşitli sayıdaki plazmidlerden (*S.epiermidis* ATCC12228 altı plazmid ve RP62A suşu tek plazmid içerir) oluşur. Bu türler % 32'lik G+C içeriğine sahiptir ve 2400-2500 kodlanmış sekans içermektedir.<sup>1,2,20-23</sup>

## 2.4. Virulans ve Patojeniteleri

### 2.4.1. Kapsül

*S. aureus*'un özellikle mukoid türlerinde polisakkarid yapıda bir mikrokapsül bulunmaktadır. Bunlar elektron mikroskop incelemelerle infekte kalp pillerinde, periton ve intravenöz kateterlerde gösterilmiştir. Bu ekzopolisakkarit, bakteriyi fagositozdan korur ve konak hücrelerine özellikle de kateterler gibi yabancı cisimlere adherensini kolaylaştırır. Stafilokoklarda 11 mikrokapsüler polisakkarit serotipi tanımlanmıştır. *S. aureus* suşlarının % 70-80'inde tip 5 ve tip 8 kapsül serotiplerine rastlanmıştır.<sup>2,13,17</sup> Penisiline dirençli *S.aureus* suşlarının büyük çoğunluğu tip 5 kapsül içerirken, toksik şok sendromu toksini üreten suşların çoğunda tip 8 kapsül bulunmaktadır.<sup>13,17</sup>

### 2.4.2. Hücre Duvarı

#### 2.4.2.1. Peptidoglikan tabaka

Hücre duvarının esas yapısını oluşturan, hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerde bulunan karmaşık bir makromoleküldür. Stafilokoklarda peptidoglikan tabaka hücre duvarı kuru ağırlığının yaklaşık % 50-60'ını oluşturur. İnsan hücrelerinde bulunmayıp bakteri hücresinde bulunduğundan antibakteriyel ilaçlar için iyi bir hedef oluşturmaktadır. Bu tabaka üç bölümden oluşur. Bunların ilki  $\beta$ 1-4 glikozid bağları ile bağlanan N-asetil glukozamin (NAG) ve N-asetil muramik asit (NAMA) alt gruplarından oluşan disakkarid yapısıdır. İkinci tabaka N-asetil muramik asite bağlı D ve L aminoasitlerinden oluşmuş pentapeptid zincirdir. NAMA de bağlanan pentapeptid yapısı sırası ile; L-alanin, D-glutamik asit, L-lizin, D-alanin, D-alanin şeklindedir. Son tabaka da ise NAMA'e bağlı olan pentapeptid yan zincirleri, pentaglisin köprüleri ile bir zincirde D-alanin ile diğer zincirdeki L-lizin arasında olacak şekilde birbirlerine çapraz bağlanır. Çapraz bağlar hücre duvarının sağlamlılığı ile yakından ilişkilidir ve bu bağların yapısı türler arasında farklılık gösterir. *S.aureus*'da çapraz bağlantı oranı yüksektir ve bu özellik bakterinin lizozim enzimine karşı dirençli olmasını sağlar.<sup>2,13,17,24,25</sup>

Transglikozilaz disakkarid pentapeptidlerin birbirlerine bağlanmalarını, transpeptidaz pentapeptid köprüler oluşturarak peptidoglikan yapının retiküler bir yapı kazanmasını ve D-karboksipeptidaz pentapeptid yapı içindeki son D-alaninin zincirden ayrılmasına neden olur. Beta-laktam antibiyotikler, peptidoglikan sentezini, spesifik olarak karboksipeptidaz ve özellikle de transpeptidazları inhibe ederek durdururlar. Bu enzimlere penisilin bağlayan proteinler (PBP) adı verilir, çünkü inhibisyon beta-laktam antibiyotiklerin bu enzimlere bağlanması sonucu gelişir. *S. aureus*'ta PBP1, PBP2, PBP3, PBP4 olmak üzere dört tane PBP vardır.<sup>17,24,25</sup>

Stafilokokların peptidoglikan tabakası; makrofajlardan sitokin salınımını uyarır, komplemanın aktivasyonuna yol açar ve trombosit agregasyonuna neden olur. Ayrıca monositlerden IL-1 salınımını uyararak polimorfonükleer lökositlerin infeksiyon bölgesine toplanmalarına ve sonuçta apse oluşumuna da yol açar. Ter, gözyaşı ve lökositlerde bulunan lizozim (muramidaz) enziminin hedefi stafilokok ve diğer Gram pozitif bakterilerin peptidoglikan tabakasının  $\beta$ 1-4 bağlarıdır. Stafilokoklardaki pentaglisin köprülerinin lizostafin enzimine özgül bir duyarlılığı vardır.<sup>2,13,17,24,25</sup>

#### 2.4.2.2. Teikoik asit

Teikoik asit, suda eriyebilen, fosfodiester bağları ile bağlanarak uzun zincirler oluşturan şeker-alkol-fosfat polimerleridir. Peptidoglikan tabakasındaki N-asetil muramik asit molekülüne fosfodiester bağlarıyla kovalent olarak bağlanmıştır. Hücre duvarı kuru ağırlığının yaklaşık olarak % 30-50'sini oluşturur. Kalınlığının yaklaşık 10-12 nm arasında olduğu belirlenmiştir. İki tiptir; bunlar ribitol teikoik asit ve gliserol teikoik asittir. Teikoik asit; *S. aureus*'da özgün ribitol (5-karbon monosakkarid) fosfat polimeri yapısında iken, *S. epidermidis*'de gliserol fosfat yapısındadır. Sadece Gram pozitif bakterilerin hücre duvarında bulunan bu yapı hücre yüzeyine negatif yük vererek, çeşitli metal iyonlarının, katyonların lokalizasyonunda ve otolitik enzimlerin aktivasyonunda rol oynar. Stafilokokların türe özgü antijenleri teikoik asitlerdir. Mukozalarda bulunan özgül reseptörleri (fibronektin, fibrinojen, laminin, trombospondin, vitronektin, elastin, sialoprotein ve kollojen) ile birleşerek stafilokokların konağa adherensini sağlar.<sup>2,13,17,19</sup>

### 2.4.2.3. Yüzey proteinleri

Protein A, elastin, kollajen, fibronektin bağlayan proteinler ve kümeleşme faktörü (clumping faktör) kimyasal yapıları ve hücre duvarı yerleşimleri birbirlerine benzeyen stafilokoksik yüzey proteinleridir. Bu proteinler stafilokokların konak dokularında kolonize olmasında en önemli faktörlerdir.<sup>2,13,18,19</sup> Protein A, 42 kilodalton ağırlığında olup bu grubun prototipidir. İlk olarak 1940'da Wervey tarafından tanımlanmıştır. Büyük bir kısmı peptidoglikan yapıya kovalan olarak bağlanmıştır. Bir kısmı ise hücre dışı ortama salınmaktadır.<sup>2,13,17</sup> En önemli özelliği IgG3 dışındaki tüm IgG ve IgA2 ile bazı IgM'lerin Fc reseptörleri ile birleşebilmesidir. Bu nedenle protein A'nın antikomplemanter ve antifagositer etkinliği vardır.<sup>13,18</sup>

### 2.4.3. Toksinler

#### 2.4.3.1. Sitolitik Toksinler

Stafilokoklar, konak hücre morfolojisini ve/veya fonksiyonunu etkileyen çok sayıda ekstrasellüler toksin üretebilir. Bu toksinler sayesinde stafilokoklar yoğun inflamatuvar yanıt olan bölgelerde üremelerini sürdürebilirler. Bunlardan en iyi tanımlananları hemolizinler ve lökositindir.<sup>18</sup>

#### A- Hemolizinler

Hemolizinler, çeşitli hayvan eritrositleri üzerinde hemolitik etki yapıp yapmamalarına, hemoliz için gerekli ısı derecesi ve zamana, toksisite derecelerine bağlı olarak ayrımlar gösterirler. Bu toksinler dört tiptir.

**1- Alfa hemolizin (Alfa toksin):** En güçlü membran hasar proteini olup 33 kDa ağırlığındadır. *S.aureus* suşlarının ana hemolizindir. Bakteriyel kromozomlarda ve plazmidlerde kodlanır. Tavşan eritrositleri için hemolitik aktivitesi yüksektir. İnsan makrofaj ve trombosit hücre membranları üzerinde litik etkiye sahiptir fakat monositlere etkisizdir. Hemolitik, dermonekrotik ve sitolitik etkileri vardır. Formol ile toksoid haline getirilebilir.<sup>2,13,17,18</sup>

**2- Beta hemolizin (Beta toksin):** Stafilokokal sfingomyelinaz olup 35 kDa ağırlığındadır. En iyi koyun eritrositlerine, daha az olarak da insan ve tavşan eritrositlerine litik etki gösterir. Toksinin en önemli özelliği sıcak-soğuk lizis yapabilme yeteneğidir. Eritrositler üzerindeki etkisi soğukla artar. Fibroblast ve lökosit hücrelerine

de toksik etki gösterir. Antijeniktir, antitoksini ile nötralize olur ve formol ile toksoid haline getirilebilir.<sup>2,13,17,18</sup>

**3- Gama hemolizin (Gama toksin):** İnsan eritrositleri üzerine orta derecede etkilidir. Tavşan ve koyun eritrositleri duyarlıdır. Özellikle stafilokokal kemik infeksiyonlarında kanda bu toksine karşı antikör düzeyinin yüksek bulunması, toksinin bu hastalıklarda etkili olduğunu düşündürmektedir.<sup>13,17,18</sup>

**4- Delta Hemolizin (Delta toksin):** Hücre membran bütünlüğünü bozar ve adenilat siklazı aktive ederek cAMP salınımına neden olur. Bu enzimatik aktivite, Stafilokoksik Toksik Şok Sendromu (STSS) ve stafilokokal besin zehirlenmesinde rol oynar. İnsan, tavşan ve maymun eritrositlerine etkilidir. Ayrıca, lökosit, makrofaj, lenfosit ve trombositleri de hasara uğratar. Alfa ve delta toksin insanda hastalık oluşturan stafilokok suşlarında en çok bulunanlardır. *S.aureus* suşlarının % 95'inde bunlardan biri veya diğeri bulunurken, % 82'inde her ikisi de birlikte bulunabilmektedir.<sup>2,13,18</sup>

#### **B- Lökosidin ( Panton-Valentine Toksin)**

Bir ekzotoksindir. Birbirlerini sinerjik olarak etkileyen F (fast) ve S (slow) adında iki protein komponentinden oluşmuştur. Bunların moleküler ağırlıkları 32 ve 35 kDa'dur. Her biri iyi antijen yapısında olup her birinden ayrı toksoid oluşturulur. Toksin aktivitesi için bu alt birimlerin her ikisi de gereklidir. Toksin, hücre zarında potasyum ve diğerkatyonlara karşı geçirgenliği artırıcı gözeneklerin açılmasını sağlayarak etkili olur. Lökositler ve makrofajlar üzerine litik etkisi vardır. Lökositler tarafından fagosite edilseler de lökosidin üreten stafilokoklar hücre içerisinde üremeye devam ederler. Bu toksini bulduran türlerin infeksiyonlarında hızlı ilerleme, kanama ve nekrotizan pnömoni tablosu görülmektedir.<sup>2,13,17,18</sup>

#### **2.4.3.2. Enterotoksin**

Isıya dirençli, 100°C'ye 30 dakika dayanabilen, polipeptid yapısında maddelerdir. Enterotoksinin A, B, C1, C2, C3, D, E ve F olmak üzere sekiz immünolojik tipi vardır. Enterotoksin; makrofaj ve yardımcı T hücrelerinden, sırasıyla IL-1 ve IL-2 salınımını uyarıp, sindirim kanalında bir süper antijen olarak davranır. *S. aureus* suşlarının % 35-50'inin bu toksinleri oluşturabildiği saptanmıştır. A ve D besin zehirlenmelerinde sık karşılaşılan toksinlerdir.<sup>13,17</sup>

#### **2.4.3.3. Eksfoliyatif toksin (Eksfoliyatin)**

Epidermolitik bir toksindir. Stafilokokal infeksiyonların veziküler ve eksfoliyatif deri lezyonlarından sorumludur. Antijenik ve biyokimyasal özelliklerine göre iki tipe ayrılır. Eksfoliyatif toksin A; ısıya duyarlı ve plazmid orjinlidir, eksfoliyatif toksin B ise ısıya dirençli ve yapısal geni kromozomaldır. Bu iki protein yapısal olarak farklı olmasına rağmen benzer biyolojik aktiviteye sahiptir. Stafilokokal Haşlanmış Deri Sendromu (SSSS)'ndan sorumludur.<sup>13,17</sup>

#### **2.4.3.4. Toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1)**

TSST-1; sistemik olarak salınır ve toksik şok sendromuna neden olur. Süper antijen olarak davranır. T lenfosit proliferasyonu ve monositlerden IL-1 salınımını uyarır. *S. aureus* suşlarının % 5-25'i TSST-1 geni taşır. Son yıllarda KNS'lara bağlı toksik şok sendromu da bildirilmiştir.<sup>13,17,26</sup>

### **2.4.4. Enzimler**

#### **2.4.4.1. Katalaz**

Tüm stafilokoklar (*S. saccharolyticus* ve *S. aureus subsp. anaerobius* hariç) tarafından üretilen toksik hidrojen peroksidi (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), toksik olmayan oksijen ve suya ayırtıran bir enzimdir. Bakteriler, bu enzim sayesinde fagositlerin içinde toksik oksijen radikalleri tarafından öldürülmeye direnç kazanır.<sup>13</sup>

#### **2.4.4.2. Koagülaz**

Stafilokoklar tarafından üretilen bir plazma pıhtılaşma proteinidir. İki tip koagülaz bulunur; serbest koagülaz ve bağlı (clumping factor) koagülaz. Bu enzimlerin farklı mekanizmalarla plazmayı pıhtılaştırdıkları belirlenmiştir. Koagülaz pozitif stafilokokların üzerinde oluşan kalın fibrin tabakasının, mikroorganizmayı fagositoza karşı koruyarak, patojenliğe katkı sağladığı ileri sürülmektedir.<sup>13,18</sup>

#### **2.4.4.3. Lipaz**

*S.aureus* suşlarının tümü ve KNS'ların yaklaşık % 30'undan fazlası lipaz enzimi üretir. Lipaz , yağları hidrolize ederek vücudun lipid içeren bölgelerinde stafilokokların

yaşamasını sağlamakta ve yüzeyel dokuları invaze ederek fronkül ve karbonkül gibi infeksiyonlarının gelişimine neden olmaktadır.<sup>13,18</sup>

#### **2.4.4.4. Hiyalüronidaz**

Konak bağ dokusu matriksinde asit mukopolisakkaritlerden olan hiyalüronik asiti parçalayarak mikroorganizmanın kolayca yayılmasını sağlar. Antijenik özelliğe sahip bir enzimdir. *S.aureus* suşlarının % 90'dan fazlası hiyalüronidaz oluşturur.<sup>13,18</sup>

#### **2.4.4.5. Fibrinolizin (Stafilokinaz)**

Stafilokoklar tarafından ortama salınan kinazlar, plazmada bulunan plazminojeni aktive ederek plazmin oluşturur. Fibrinolitik etki ile fibrini parçalayarak organizmanın yayılmasına yardımcı olur.<sup>13</sup>

#### **2.4.4.6. Fosfatidilinozitol – spesifik fosfolipaz C**

Özellikle erişkin tip solunum zorluğu sendromu ve dissemine intravasküler koagülasyon bulunan hastalardan izole edilen suşlarda saptanan bir enzimdir. Bu suşlar antimikrobiyal ajanlara özellikle de penisiline daha dirençlidir.<sup>13</sup>

#### **2.4.4.7. Deoksiribonükleaz**

DNaz enzimleri endo ve ekzonükleaz aktivitesine sahip, nükleik asitleri 3'-fosfomononükleotidlere parçalayan fosfodiesterazlardır. *S.aureus* suşlarının % 90'dan fazlasında bulunur. Isıya dirençli bir enzimdir.<sup>13</sup>

#### **2.4.4.8. Beta-laktamaz (penisilinaz)**

Stafilokoklar salgıladıkları beta-laktamaz enzimi ile penisilin grubu antibiyotiklerdeki beta-laktam halkasının hidroksil grubunu parçalayarak etkisizleştirir. Genetik taşınma plazmid ve transpozonlarla sağlanır.<sup>1,2,13</sup>

#### **2.4.4.9. Slime faktör**

Slime maddesi amorf kapsül yapısında, glikokaliks materyali olup % 40 karbonhidrat, % 27 protein içermektedir. Çok kuvvetli antijenik yapıda olduğundan, tavşanlara şırınga edildiğinde çok yüksek titrede antikor cevabı elde edilir. Slime pozitif

stafilokok suşlarının daha virülen ve antibiyotiklere daha dirençli oldukları bildirilmektedir. Slime faktör hücrel immün yanıtı baskılar, opsonizasyonu, nötrofil kemotaksisini ve nötrofil fagositozunu inhibe eder.<sup>13,18</sup>

## 2.5. Epidemiyoloji

Hastaneye yatırılan hastalara tanı ve tedavi amacıyla uygulanan endoskopi, kateterizasyon, biopsi, mekanik ventilasyon, trakeostomi gibi girişimler konak savunma mekanizmasının bozulmasına ve konağın özgül florasının yerine, hastane ortamında yaygın olan mikroorganizmalarla kolonizasyonuna yol açar. Bu mikroorganizmaların başında MRSA gelmektedir. MRSA özellikle 1980'lerin başından itibaren önemli bir klinik ve epidemiyolojik sorun olarak ortaya çıkmıştır.<sup>17,27,28</sup>

Doğumdan itibaren *S. aureus* göbek, perine ve deriye kolonize olur. Çocukluk döneminde başlıca yerleşim yeri nazofarenksler iken, erişkin dönemde burundur. Erişkinlerde burun taşıyıcılığı oranının % 20-40 arasında olduğu tahmin edilmektedir. Toksik şok sendromu için risk altında olan doğurganlık çağındaki kadınların % 10'nunun vajeninde *S. aureus* taşıyıcılığı bildirilmiştir, ayrıca rektal, faringeal, aksillar ve perineal taşıyıcılıktan da söz edilmiştir.<sup>17,28,29</sup>

Sağlık çalışanları, insülin kullanan diyabetikler, kronik hemodiyaliz hastaları, intravenöz ilaç alışkanlığı olanlar, ayaktan periton diyalizi uygulanan hastalar, kronik dermatolojik hastalığı olanlar ve HIV pozitif hastalarda taşıyıcılık oranı daha fazladır. Bununla birlikte hastanede uzun süreli yatış öyküsü, yoğun antibiyotik kullanma, yanık ünitesinde tedavi görme, yoğun bakım servislerinde kalma, intravasküler kateter varlığı, cerrahi girişim geçirme öyküsü, MRSA ile kolonize veya infekte hasta ile temas ve aynı ailede sağlık alanında çalışan kişi varlığı MRSA infeksiyonu için başlıca risk faktörlerini oluşturmaktadır.<sup>17,28,29</sup>

Nozokomiyal infeksiyonların en sık etkenlerinden biri olan MRSA suşlarının esas kaynağı infekte veya kolonize hastalar ile birlikte sağlık personelleridir. MRSA suşları özellikle sağlık personellerinin elleri ile diğer hastalara yayılmaktadır. Hastaların başka nedenlerle antibiyotik almaları kolonizasyon riskini çok fazla artırmaktadır. Hava

yoluyla bulaş, yoğun bakım servislerinde pnömoni olgularında ve yanık ünitesi birimlerinde önem kazanmaktadır.<sup>2,28,29</sup>

Son yıllarda toplum kökenli MRSA (TK-MRSA) infeksiyonları da giderek önem kazanmaya başlamıştır. TK-MRSA infeksiyonları sağlıklı kişilerde, özellikle çocuk ve genç erişkinlerde görülür. Çoğunluğu Panton-Valentine toksini taşıyan bu suşlar daha çok deri-yumuşak doku infeksiyonları ve pnömoniye yol açarlar.<sup>30,31</sup>

MRSA kolonizasyonu ve infeksiyonunu önlemek amacıyla el yıkama eğitimi ve antibiyotik kullanımının kısıtlanması hastanelerde daha etkin ve maliyeti düşük yöntemlerdir. Burun taşıyıcılığının önlenmesinde seçilmiş olgularda mupirosin kullanımı ile birlikte vücudun klorheksidinli sabunlarla yıkanması etkili olabilmektedir.<sup>27,29</sup>

MRSA infeksiyonlarının sıklığı ülkeden ülkeye, hastaneden hastaneye ve hatta hastane içinde değişik servisler arasında bile büyük farklılık göstermektedir. Bu bakteri ile görülen infeksiyonların sıklığı İskandinav ülkelerinde % 1'den, Yunanistan, İtalya, İspanya ve Fransa da olduğu gibi % 80'lere kadar değişmektedir.<sup>32</sup> ABD yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *S.aureus* suşlarının % 52'sinde, yoğun bakım dışı ünitelerden izole edilenlerin ise % 42'sinde metisiline direnç saptanmıştır.<sup>33</sup> İspanya'da 143 hastaneyi içeren geniş bir çalışmada stafilokok suşlarının metisilin direnci *S. aureus*'ta % 31.7, KNS'da % 67 olarak bulunmuştur. KNS içinde en sık % 56 oranında *S. epidermidis* izlenmiştir.<sup>32,34</sup> KNS açısından bakıldığında ABD'de bakteriyemilerden izole edilen suşların % 65'inin metisiline dirençli olduğu görülmüştür.<sup>32</sup> Avrupa da Bouza ve ark.<sup>35</sup> kateterlerden izole edilen metisiline dirençli stafilokok (MRS) suşlarından; *S.aureus* suşlarının % 40'ının, KNS suşlarının % 63.7'sinin dirençli olduğunu görmüşlerdir.

Türkiye'de 1996-1999 yılları arasında yapılan dokuz ayrı çalışmada bildirilen metisilin direncinin ortalama % 47.5 olduğu hesaplanmış, 2000-2003 yıllarında ise sekiz ayrı çalışma sonuçlarının ortalaması da bu orana çok yakın (% 46.6) bulunmuştur. Ancak son yıllarda hastanede yatan hastalardan izole edilen *S.aureus* suşlarına ilişkin verileri içeren yayınlar, metisilin direncinin % 52'ye yükseldiğini göstermiştir.<sup>36</sup> Türkiye geneline bakıldığında KNS'larda 2003-2004 yıllarında belirlenen metisiline direnç oranının (% 50), *S.aureus* suşlarındakine benzer olduğu gözlenmiştir.<sup>37</sup>

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi'nde 2007-2008 yıllarında, metisilin direnç oranı *S.aureus* suşlarında % 49, KNS suşlarında ise % 60 olarak bulunmuştur.

## **2.6. Stafilokokların Neden Olduğu İnfeksiyonlar**

### **2.6.1. *Staphylococcus aureus* infeksiyonları**

**2.6.1.1. Deri ve yumuşak doku infeksiyonları:** İmpetigo, follikülit, fronkül, karbonkül ve hidradenitis süpurativa gibi klinik formlara yol açabilir. Deri infeksiyonları hızla yayılarak sellülit, lenfanjit, lenfadenit ve hatta nekrotizan fassiite neden olabilir.<sup>2,17,28</sup>

**2.6.1.2. Dolaşım sistemi infeksiyonları:** Bakteriyemi, endokardit ve perikardit şeklinde seyreder.<sup>2,17,28</sup>

**2.6.1.3. Solunum sistemi infeksiyonları:** Toplumdan kazanılmış *S.aureus* pnömonileri genellikle influenza epidemilerinden sonra görülür. Hastane kökenli *S.aureus* pnömonileri ise genellikle entübasyon sonrası veya aspirasyona bağlı olarak görülür.<sup>2,17</sup>

**2.6.1.4. Kas ve iskelet sistemi infeksiyonları:** Osteomyelit, septik artrit, septik bursit ve piyomyozit şeklinde görülür.<sup>2,17,28</sup>

**2.6.1.5. Santral sinir sistemi infeksiyonları:** Tanısal girişimler veya cerrahi sonrası doğrudan yayılımla ya da nadiren bakteriyemi ve endokardite sekonder hematojen yolla gelişirler. İleri yaş, kardiovasküler hastalıklar ve immün yetmezlik kolaylaştırıcı faktörlerdir.<sup>2,17,28</sup>

**2.6.1.6. Üriner sistem infeksiyonlar:** Hematojen yolla veya kateter kullananlarda asendan yolla gelişebilir.<sup>2,17,28</sup>

### 2.6.1.7. Toksinlere bağlı olarak gelişen infeksiyonlar

#### a) Haşlanmış Deri Sendromu

Çoğunlukla yeni doğan ve bir yaşın altındaki çocuklarda görülür. *S.aureus*'un eksfoliyatif toksini sorumludur. Erişkinde nadiren görülür. Sağlam görünümdeki deri hafif bir temasla kolayca soyulur (Nikolsky belirtisi). Sıvı ve elektrolit kaybı sonucu hipovolemi ve sepsis oluşabilir.<sup>2,17,28</sup>

#### b) Toksik Şok Sendromu

Toksik şok sendromu; ateş, eritroderma, kusma, diyare, böbrek yetmezliği gibi klinik belirtileriyle bir multisistem hastalık olup adet kanamalarında tampon kullanan ve vajinada *S. aureus* taşıyıcısı olan kadınlarda rastlanmaktadır. Olguların % 50'sinde TSST-1 üreten *S. aureus* suşları sorumlu iken diğer % 50'sinden enterotoksin B ve C üreten suşların sorumlu olduğu anlaşılmıştır.<sup>2,17,26,28</sup>

#### c) Besin Zehirlenmesi

Stafilokok üremiş ve enterotoksin oluşmuş besinlerin alınmasını izleyen 2-6 saat içinde bulantı, kusma ve ishal ile başlar. Toksin ısıya dayanıklı olduğu için genel olarak kısa süreli pişirmede tahrip olmaz. Stafilokokkal enterotoksinler barsaktan sıvı kaybına neden olduğu gibi, süperantijen olarakta etkilidirler. Kremalı pasta, mayonez, sütlü tatlılar, etli gıdalar ve dondurma en sık sorumlu tutulan besinlerdir. Genellikle 8 saat içinde klinik kendiliğinden düzelir.<sup>2,17,26,28</sup>

### 2.6.2. KNS İnfeksiyonları

Başta *S.epidermidis* olmak üzere KNS'lar son yıllarda hastane infeksiyonlarının önemli etkenleridir. Bu durumun nedeni normal flora bakterileri olmaları ve invazif girişimler sonucu kolayca alınabilmeleridir. İnsanlarda en fazla patojen olanlar *S.epidermidis* ve *S.saprophyticus*'tur. Bunu *S.haemolyticus*, *S.lugdunensis*, *S.hominis* ve *S.schleiferi* izlemektedir. KNS'ların etken olduğu infeksiyonların çoğu kateter veya protez ile ilişkilidir. *S.epidermidis* infeksiyonlarının büyük çoğunluğu hastane kökenli iken, *S.saprophyticus* infeksiyonları genellikle toplum kökenlidir.<sup>28,38</sup>

KNS'lar özellikle damar kateterlerinin sık kullanıldığı servislerde nozokomiyal bakteriyeminin en sık nedenidir. Protez kapak endokarditinde etken genellikle *S.epidermidis*'tir. KNS'ların neden olduğu kateter infeksiyonlarında  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ -lizin üretimi ve slime (glikokaliks) yapımı önemli patojenite faktörlerindedir. Şant infeksiyonlarının 2/3'sinden KNS'lar sorumludur ve etken sıklıkla *S. epidermidis*'tir. Peritonitte de en sık etken *S. epidermidis* olup bunu *S. haemolyticus* izler.<sup>28,38,39</sup>

KNS'lar göğüs ve kalp cerrahisi sonrası gelişen sternal osteomyelitler, protez eklem etrafındaki kemik infeksiyonları ve infekte hemodiyaliz şantlarından kaynaklanan hematojen osteomyelitlerin önemli etkenlerindedir. Bu grupta yer alan *S. epidermidis* göz cerrahisi sonrasında gelişen infeksiyonların en önemli nedenlerindedir. *S. saprophyticus* ise özellikle doğurgan çağıdaki sağlıklı kadınlarda komplike olmayan akut üriner sistem infeksiyonu etkenleri arasında *E. coli*'den sonra ikinci sırayı alır.<sup>28,38,39</sup>

## 2.7. Tanı

Stafilokoklar, mikrokoklardan farklı olarak oksidaz negatif olup basitrasine dirençlidir, furazolidone ve lizostafine ise duyarlıdır. Stafilokokların laboratuvar tanısında koloni morfolojisi, boyanma, pigment üretimi, hemoliz, mannitol fermantasyonu, yüksek tuz konsantrasyonlu ortamda üreme gibi özellikler araştırılmalıdır. *S. aureus*'un bütün suşları koagülaz pozitif olup mannitolü fermente ederler. *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* da üreaz testi pozitifdir. KNS'lar kendi aralarında öncelikle novobiyosin (5 µg/ml) duyarlılıklarına göre iki gruba ayrılırlar. Novobiyosine duyarlı grup genel olarak *S. epidermidis* grubu, dirençli grup ise *S. saprophyticus* grubu (*S. saprophyticus subsp.saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. cohnii* ve *S. sciuri*) olarak adlandırılır. Novobiyosin duyarlılığı dışında laboratuvarlarda KNS'larda tür tanımlanması yoğun emek, uzun zaman ve maliyete neden olduğundan rutin olarak yapılmaz.<sup>1,2,13</sup>

Stafilokokların tanısında ticari sistemler de kullanılmaktadır. API Staph (BioMerieux- Vitek), Minitex Gram pozitif panel (BD Microbiology System), ID 32 Staph (BioMerieux), Rapidec Staph (BioMerieux-Vitek), Vitek1 (BioMerieux) ve Vitek

2 sistem (BioMerieux) örnek olarak verilebilir. Ayrıca epidemiyolojik araştırmalar için MRSA suşları arasında antibiyotip, bakteriyofaj tiplendirilmesi, kapsül tiplendirilmesi gibi fenotipik ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), “pulsed field” jel elektroforezi (PFGE), kromozomal DNA restriksiyon analizi gibi genotipik farkları esas alan testler de yapılmaktadır.<sup>1,2,13</sup>

**2.7.1. Katalaz Testi:** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, su ve oksijene ayrıştırılmaya yarayan katalaz enziminin gösterilmesi için yapılır. Bu test Gram pozitif olan stafilokok ve mikrokokların, streptokok üyelerinden ayrımını sağlar.<sup>13</sup>

**2.7.2. Koagülaz Testi:** *S.aureus*'u diğer stafilokoklardan ayırt etmede en yaygın kullanılan ve genel olarak kabul gören bir tanı testidir. Tüp ve lam testi olmak üzere iki şekilde yapılabilir. Her iki test için EDTA'lı tavşan plazması önerilmekle birlikte insan plazması da kullanılabilir.<sup>13,40</sup>

**1-Tüp koagülaz testi:** Stafilokokların besiyerine salgıladıkları serbest koagülaz araştırılır. Bu madde plazmada bulunan “coagulase reacting factor” (CRF) ile ilişki kurar ve trombokinaza benzeyen bir etki ile fibrinojeni pıhtılaştırır. Tavşan veya insan plazması kullanılır. Pıhtının oluşması pozitif sonuç olarak değerlendirilir. Sitrata metabolize eden bazı mikroorganizmaların (örneğin *P.aeruginosa*, *S.marcescens*, bazı enterokoklar) yalancı pozitif sonuç verebilmesi nedeniyle sitratlı plazmanın kullanımı uygun değerdir.<sup>13,40</sup>

**2-Lam koagülaz testi:** Bu test ile bağlı koagülaz = kümeleştirme faktörü = “clumping factor” gösterilmektedir. Bağlı koagülaz kültür filtratlarına geçmez, hücreye bağlıdır. Etkinliğinin ortaya çıkması için CRF'a gereksinim yoktur. Besiyerinden öze ile alınan stafilokok kolonisi lam üzerinde bir damla distile su ile homojenize edilir ve üzerine bir damla plazma damlatılıp elde çevrilerek karıştırılır. Olumlu sonuçlarda gözle görülen kümeleşmeler oluşur.<sup>13,40</sup>

**2.7.3. Vitek 2 otomatize sistem:** Gram pozitif ve negatif bir çok bakterinin identifikasyon / duyarlılık sonuçlarının belirlenmesinde kullanılan otomatize bir sistemdir. Sistemde Gram pozitif ve negatif mikroorganizmaların identifikasyon ve duyarlılık kartları farklıdır. Vitek 2 Gram pozitif identifikasyon kartı (GP) (BioMerieux) ile çoğu önemli Gram pozitif bakterinin otomatize identifikasyonu amaçlanmıştır. GP kartı ile identifikasyon, biyokimyasal metodlara ve yeni geliştirilmiş substratlara dayanmaktadır. Sistemde karbon kaynağı kullanımı, enzimatik aktivite ve direnci ölçen 43 biyokimyasal test mevcuttur. İdentifikasyon sonuçları yaklaşık olarak 8 saat içinde verilmektedir.<sup>13,41</sup>

Tablo 2. Klinik olarak önemli stafilkok türlerinin tanımlanmasında kullanılan testler

	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. lugdunensis</i>	<i>S. schleiferi</i>	<i>S. saprophyticus</i>	<i>S. hominis</i>
Büyük koloniler	+	-	+	d	d	+	-
Pigment oluşumu	+	-	d	d	-	d	d
Koagülaz	+	-	-	-	-	-	-
Clumping factor	+	-	-	(+)	+	-	-
Isıya dayanıklı nükleaz	+	-	-	-	+	-	-
Hemolizinerler	+	d	(+)	(+)	(+)	-	-
Katalaz	+	+	+	+	+	+	+
Oksidaz	-	-	-	-	-	-	-
Alkalen fosfataz	+	+	-	-	+	-	-
Prolidomil arilamidaz	-	-	+	+	+	-	-
Ornitin dekarboksilaz	-	d	-	+	-	-	-
Üreaz	d	+	-	d	-	+	+
$\beta$ - galaktosidaz	-	-	-	-	(+)	+	-
Aseton üretimi	+	+	+	+	+	+	d
Novobiyosin direnci	-	-	-	-	-	-	+
Polimiksin B direnci	+	+	-	d	-	-	-
Mannitolden asit oluşumu	+	-	d	-	-	d	-

+: Susuların % 90 ve daha fazlası pozitif

(+): Reaksiyon geç pozitifleşir

-: Susuların % 90 ve daha fazlası negatif

d: Susuların % 11-89'u pozitif

## 2.8. Stafilokok İnfeksiyonlarında Tedavi

Stafilokoklar antibiyotiklere hızlı direnç geliştirdiklerinden, uygun antibiyotiğin seçimi için antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılması gerekmektedir. Direnç gelişimi özellikle *S.aureus* suşlarında daha sık görülmektedir. *S. aureus*'un neden olduğu bakteriyemi, pnömoni, endokardit ve osteomyelit gibi ağır seyirli infeksiyonlarda yüksek dozlarda ve uzun süreli antibiyotik uygulanması buna neden olabilmektedir.<sup>1,2,17,42,43</sup>

Günümüzde stafilokok suşlarının çoğunun beta-laktamaz üretmeleri nedeniyle penisilin G tedavide kullanılamaz duruma gelmiştir. Aynı zamanda metisiline dirençli stafilokok (MRS) suşlarının çoğu, başta diğer beta-laktam antibiyotikler olmak üzere, aminoglikozidlere ve tetrasikline de dirençlidir.<sup>2,42-44</sup>

### 2.8.1. Stafilokok infeksiyonlarında kullanılan başlıca antibiyotikler

**1- Penisilinaza dirençli penisilinler (Antistafilokokal penisilinler):** Metisilin, nafsilin ve izoksazolil penisilinler (kloksasilin, dikloksasilin, flukloksasilin ve oksasilin) bu grupta yer almaktadır. Bu antibiyotikler beta-laktamazların hidrolizine dirençlidirler. Etkinlikleri stafilokok infeksiyonları ile sınırlıdır, bu nedenle "anti-stafilokokal penisilinler" de denilmektedir. Metisilin direnci, PBP2a denen protein varlığına bağlıdır. PBP2a'yı kodlayan gen bakteriyel kromozom üzerinde taşınmaktadır. Stafilokoklarda metisilin direnci, beta-laktamlara genel direncin ifadesidir. Bu nedenle MRS'larla oluşan infeksiyonların tedavisinde beta-laktam antibiyotikler önerilmemektedir.<sup>2,42-45</sup>

**2- Beta-laktamaz inhibitörlü kombine penisilinler:** Klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam ile ampisilin, amoksisilin, tikarsilin, piperasilin gibi penisilin türevlerinin kombinasyonu ile beta-laktamaz salgılayan bakterileri etkileyen ilaçlar geliştirilmiştir.<sup>2,42-45</sup>

**3- Sefalosporinler:** Etki mekanizmalarını bakteri hücre duvarı sentezinde rol oynayan BPB'lere bağlanarak inhibisyon yoluyla gösterirler. Sefalosporin direnci sıklıkla PBP'lerde değişiklik sonucu gelişir. Yapılarına ve antimikrobiyal etkinliklerine göre dört kuşak altında toplanırlar. Birinci kuşak sefalosporinler, metisiline duyarlı

stafilokoklara (MSS) en etkili gruptur. Ancak hiç bir sefalosporin kuşağının MRSA üzerine etkinliği yoktur.<sup>42-44,46</sup>

**4- Karbapenemler:** Karbapenemlerin iki üyesi; imipenem ve meropenemdir. Beta-laktam antibiyotikler içinde en geniş spektruma sahip antibiyotiklerdir. Karbapenemlerin Gram pozitif aerop bakterilere etkileri iyidir. MSSA suşlarına etkin, MRSA suşlarına etkisizdirler.<sup>42-45,47</sup>

**5- Aminoglikozidler:** Bakteri ribozomunun 30S subunitine bağlanarak protein sentezini bozarlar. Stafilokoklarda plazmid ve transpozonlarda bulunan genler aracılığıyla aminoglikozid modifiye edici enzim sentez edilir. Aerop bakteriler arasında aminoglikozidlere karşı direnç oluşumunda en önemli mekanizma enzimatik inaktivasyondur. Stafilokoklara en etkili aminoglikozid amikasin ve netilmisindir.<sup>42,44,48</sup>

**6- Makrolidler:** Bakteri ribozomunun 50S subunitine bağlanarak protein sentezini bozarlar. Ribozomal hedefin değişmesi, aerop ve anaerop Gram-pozitif bakteriler arasında en sık görülen direnç mekanizmasıdır. Klaritromisin MSSA suşlarına etkinliği eritromisinden daha fazladır. MRSA suşları ise genellikle bu gruba dirençlidir.<sup>2,42,44,49</sup>

**7- Trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SMZ):** Sülfonamidler, paraaminobenzoik asit (PABA) analogları olup bu metabolik yolda dihidropteroat sentaz (DHPS) enzimini, trimetoprim ise dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimini inhibe ederek bakterilerde tetrahidrofolik asit sentezini engeller. En sık gözlenen sülfonamid direnci, bakterinin sülfonamidlere düşük affinite gösteren DHPS sentezlemesi olup bu olay plazmid kontrolündedir.<sup>2,42,44,50</sup>

**8- Kinolonlar:** Nalidiksik asit türevi olan florokinolonlar, DNA girazı ve topoizomerez IV'ü hedefler. Siprofloksasin ve ofloksasinin klinik kullanıma girdiği ilk yıllarda *S. aureus*'a karşı çok iyi etkinlik gözlenmiş ancak kısa sürede direnç gelişmiştir. Florokinolonlara karşı oluşan direnç kromozomal kaynaklı olup etki mekanizması giraz enzimindeki mutasyonlardır (GyrA, GyrB).<sup>2,42,44,51</sup>

**9- Linkozamidler:** Bu grupta linkomisin ve klindamisin bulunur. Bakteri ribozomunun 50S subunitine bağlanarak protein sentezini bozarlar. Ribozomal hedefin değişmesi en sık görülen direnç mekanizmasıdır.<sup>2,42,49</sup>

**10- Kloramfenikol:** Bakteri ribozomunun 50S subunitine bağlanarak protein sentezini bozarlar. Direnç mekanizması plazmid kontrolünde sentezlenen ve hücre içi bir enzim olan kloramfenikol asetil transferaz enzim aktivitesidir.<sup>2,42,44,52</sup>

**11- Tetrasiklin:** Ribozomun 30S subunitine bağlanıp aminoaçil-tRNA'yı bloke ederek protein sentezini inhibe ederler. Stafilokoklarda tet (K), tet (L), tet (M) olmak üzere üç direnç geni bulunmaktadır. tet(M) geni minosiklin ve doksisisikline kromozomal direnci kodladığı için klinik açıdan önemlidir.<sup>2,42,44,53</sup>

**12- Rifampisin:** Gram-pozitif bakteriler ile mikobakterilerde DNA'ya bağımlı RNA polimeraz enziminin beta alt birimine bağlanarak etki eden, bakterisidal bir ilaçtır. RNA polimeraz enzimini kodlayan rpoB gen bölgesinde oluşan kromozomal mutasyonlar rifampisin direncine yol açar. Diğer antistafilokokal ilaçlarla birlikte MSS ve MRS infeksiyonlarının tedavisinde kullanılır.<sup>42,44,54</sup>

**13- Fusidik asit:** Bakterinin protein sentezini ribozomlara bağlanmadan inhibe eden steroid benzeri bir antibiyotiktir. Etki mekanizmasının özgüllüğü nedeniyle diğer antibiyotiklerle arasında çapraz direnç görülmemektedir. MRS infeksiyonlarında glikopeptit antibiyotiklere oral kullanım kolaylığı ve maliyet açısından alternatif oluşturabilecek bir antibiyotiktir.<sup>42,44,55</sup>

**14- Streptograminler (Kinopristin/Dalfopristin):** Moleküler yapılarına göre başlıca A ve B olmak üzere iki gruba ayrılır. Dalfopristin A, kinopristin B grubunda yer almakta olup, birlikte iyi sinerjistik etki gösterirler. Bakteriyel ribozomun 50S subunitesine bağlanarak protein sentezini sinerjistik olarak inhibe ederler. Hem MSS hem de MRS suşlarına etkilidirler.<sup>2,42,56</sup>

**15- Oksazolidinonlar:** Linezolid ve Eperozolid bu grubun iki üyesidirler. Ribozomlarda 50S alt birimine bağlanarak 70S başlangıç kompleksinin oluşmasını önlerler. Etki mekanizmalarının farklı olması nedeniyle diğer antibiyotiklerle çapraz direnç göstermezler. Hem oral hem parenteral kullanılabilme özelliğine sahiptir. MSS ve MRS suşlarına etkilidir.<sup>42,57</sup>

**16- Mupirosin:** Primer ve sekonder deri infeksiyonlarında etken olan stafilokoklara mükemmel in-vitro etkinlik gösterir. Mupirosin kalsiyum % 2 nazal pomadının 5 gün, günde iki kez burun deliğine uygulanmasının, metisiline dirençliler de dahil *S. aureus* nazal taşıyıcılığının eradikasyonunda etkili olduğu bildirilmektedir.<sup>58</sup>

**17- Glikopeptidler:** Bu grup antibiyotikler (vankomisin, teikoplanin, ristosetin, avoparsin) Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarı sentezini, peptidoglikan öncüllerindeki peptidil D-alanin-D-alanin uç kısmına bağlanarak transglikozilaz ve transpeptidaz enzimlerinin hedeflerini bozarak inhibe eder. Glikopeptidler MSS ve MRS suşlarına *in-vitro* olarak çok etkilidir. Vankomisinin serum düzeyi inhibitör konsantrasyonunun altına düşükten sonra da 2 saat süren bir postantibiyotik etki ile antibakteriyel aktivitesi sürmektedir.<sup>2,42,56</sup>

### **2.8.2. Stafilokoklarda Penisilin Direnci**

Günümüzde stafilokok suşlarında penisilin direnci % 80-90'lara ulaşmıştır. Penisilinazlar, penisilin ile beraber bazı beta-laktam antibiyotikleri de parçaladıkları için beta-laktamaz olarak adlandırılırlar. Aktarılabılır bir gen olan beta-laktamaz geni; genelde diğer antibiyotik direnç genleri ile birlikte bir plazmid üzerinde taşınır. Stafilokoklarda tanımlanan beta-laktamaz; blaZ geni tarafından kodlanır. Bu gen bölgesinin ekspresyonu blaR1, blaR2 (regulator) ve blaI (inhibitor) gibi düzenleyici genler ile sağlanır. Gram negatif bakterilerde olduğu gibi stafilokoklarda da beta-laktamaz üretiminin indüklenebilirlik özelliği vardır. İnhibisyondan sorumlu blaI geni ortamda beta laktam antibiyotik yokluğunda blaZ ve blaR gen bölgelerinin çalışmasını baskı altında tutarak düşük seviyede beta-laktamaz üretimine sebep olur. Ortamda beta-laktam antibiyotik varlığında ise blaR1 tarafından blaZ geni uyarılarak artmış miktarda beta-laktamaz üretimi sağlanır.<sup>2,42,44</sup>

### **2.8.3. Stafilokoklarda Metisilin Direnç Mekanizmaları**

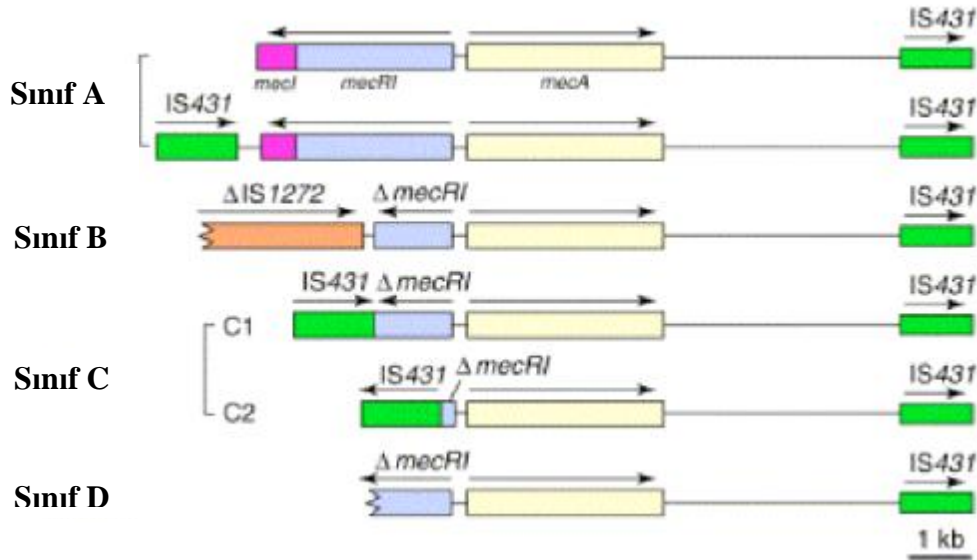
#### **2.8.3.1. Yeni bir penisilin bağlayıcı protein (PBP2a) sentezi nedeniyle oluşan direnç**

En sık karşılaşılan dirençtir. MRS suşlarında metisiline hassas stafilokok (MSS) suşlarından farklı olarak ek bir PBP vardır ve PBP2a olarak adlandırılmaktadır. PBP2a'nın beta-laktam antibiyotiklere afinitesi diğer PBP'lerden daha düşüktür. PBP2a, 2 kb'lik DNA segmentine lokalize bir gen olan mecA geni tarafından kodlanmaktadır. Bazen bu gen indüklenebilir ve transdüksiyon ile dirençli suşlardan duyarlı suşlara aktarılabılır. mecA geni regülasyonunu sağlayan mecI (represör gen) ve mecRI (sinyal dönüştürücü gen) genleriyle beraber stafilokokal kaset kromozomu (staphylococcal

cassette chromosome-SCC) ismi verilen genetik yapının üzerinde taşınır. *mecR1* ve *mecI*'nin plazmid aracılı stafilkokal beta-laktamaz geni olan *blaZ*'nin ekspresyonunda rolü olan *blaR1* ve *blaI* ile protein sekans homolojisi yüksektir. Bu da *mecA*'nın regülatör genlerini, *blaZ* sisteminden aldığı düşünmektedir.<sup>59-63</sup>

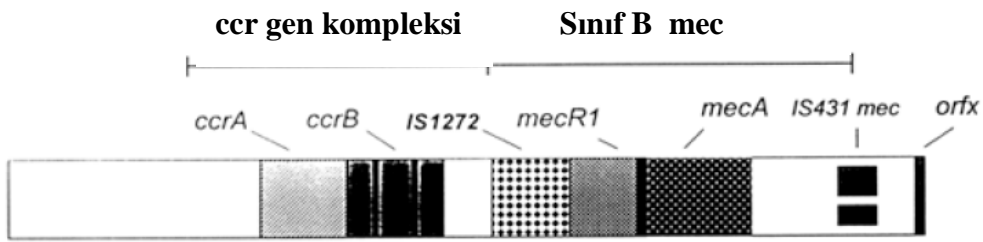
SCC; stafilkok türleri arasında genetik madde alışverişine aracılık eden hareketli bir elemandır. KNS türlerinde ve metisiline hassas *S. aureus* (MSSA) izolatlarında da bulunmaktadır. Yapı olarak patojenite adasına benzemekle birlikte, hiç virulans geni içermemektedir. *mecA* geni SCCmec adı verilen ve SCC ailesinin metisilin direnci açısından özelleşmiş bir üyesinde bulunmaktadır.<sup>59-61,64</sup>

SCCmec, 21-67 kb büyüklüğünde bir DNA dizisi olup, kromozomda replikasyon başlangıcının (*oriC*) yakınındaki *orfX*'in 3' ucunda *attBsc* bölgesinde yer almaktadır. SCCmec'in replikasyon merkezine yakın bir bölgede yerleşmesi, antibiyotik direnç genlerini çabuk almasını sağlayarak bakteriyeye önemli bir avantaj kazandırmaktadır.<sup>61-65</sup> SCCmec, *mec* gen kompleksi (*mecA* ve regüle edici genler) ve *ccr* kompleksinden oluşmuştur. *mec* gen kompleksi metisilin direncinden sorumludur. İçerdikleri yapılar göre *mec* gen kompleksi dört sınıfta incelenir.<sup>60,64-66</sup>



Şekil 1. *mec* gen kompleksinin dört sınıfı

SCCmec kasetinde ikinci ana genetik yapı olan *ccr* gen kompleksi kasetin bakteriyel genoma integrasyonu ve eksizyonundan sorumludur. Bunlar invertaz/rezolvas ailesinden *ccrA*, *ccrB* ve yeni tanımlanan *ccrC* olmak üzere üç farklı rekombinaz kodlayan genlerdir. SCCmec'in mobilitesini sağlarlar. *ccrA* invertaz varlığında, SCCmec kromozomun doğru bölgesine girer ve *ccrB* rezolvas ile kromozomdan tam bir şekilde, eksiksiz olarak ayrılır.<sup>64,66,67</sup>



Şekil 2. *ccr* gen kompleksinin yapısı

SCCmec elemanının diğer kısımlarında ise, SCC mec tipleri içinde farklılık gösteren ve J (junkyard) bölgesi olarak adlandırılan çeşitli diziler bulunur. SCCmec'in boyut değişikliklerinin bu nedenle olduğu düşünülmektedir. J dizileri arasında "insertion sequence" denilen IS elemanları, farklı antibiyotiklere dirençten sorumlu transpozonlar yer almaktadır.<sup>60,64,66</sup>

Günümüze kadar SCCmec'in 5 farklı tipi tanımlanmıştır. Tip I, tip II ve tip III Ito ve arkadaşları<sup>68</sup> tarafından, tip IV Ma ve arkadaşları<sup>69</sup> tarafından ve tip V yine Ito ve arkadaşları<sup>70</sup> tarafından tarif edilmiştir.

**SCCmec TipI;** sınıf B mec gen kompleksi ve tipI *ccr* gen kompleksinden oluşmaktadır. 34.364 bp'lik olup, transpozon veya plazmid taşımamaktadır. Metisilin ve ağır metaller dışındaki ilaçlara karşı direnç geni taşımamaktadır.<sup>66-68</sup>

**SCCmec TipII;** sınıf A mec gen kompleksi ve tipII *ccr* kompleksinden oluşmaktadır. 53.017 bp'lik olup metisilin direnci oluşturan *mecA* ve *mecR1* genleri dışında, J bölgesinde pUB110 plazmidi ve Tn554 transpozonu taşımaktadır. Tn554; makrolid,

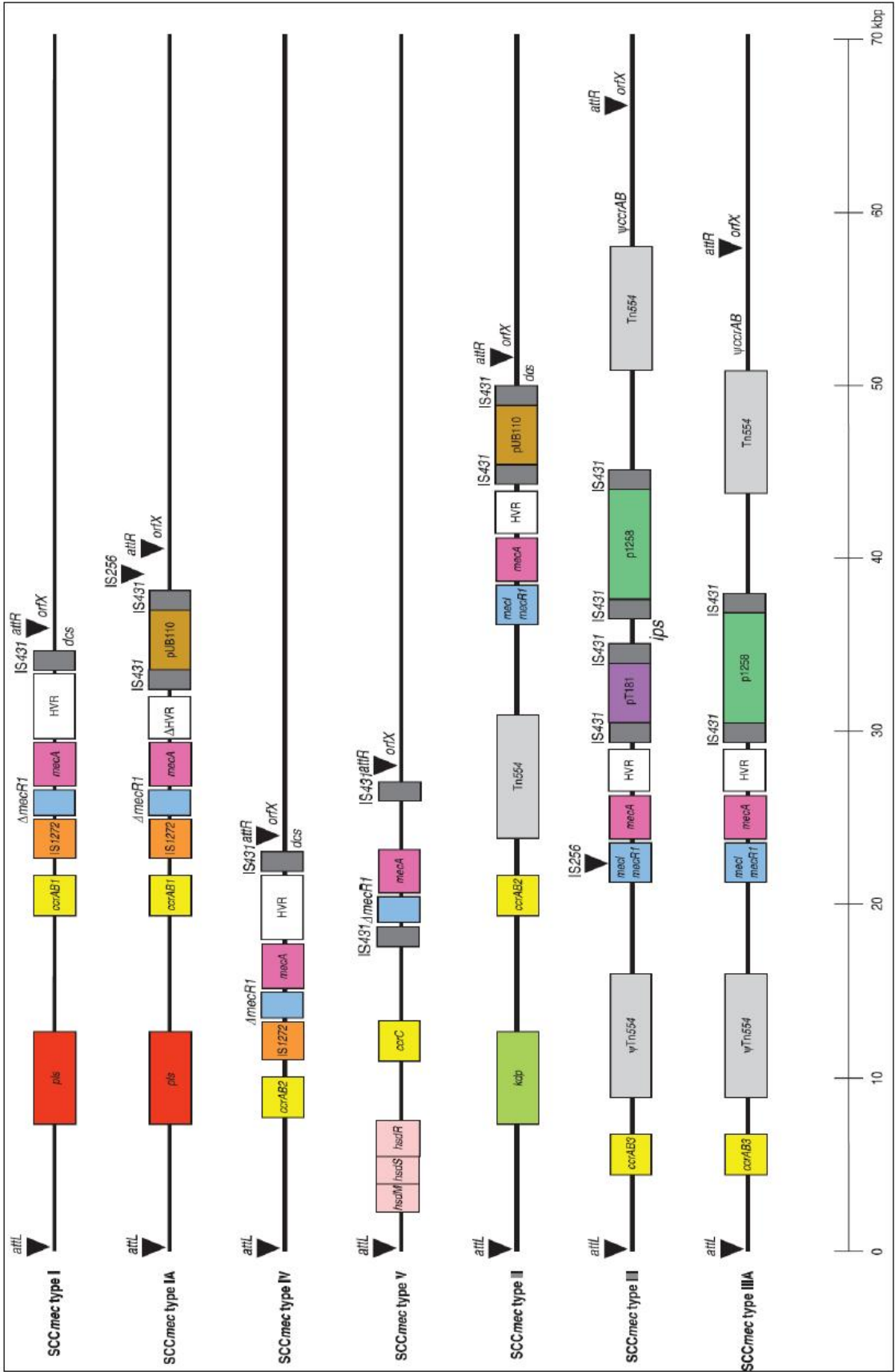
klindamisin ve streptogramin B'ye karşı dirençten, pUB110 ise aminoglikozidlere karşı dirençten sorumludur.<sup>66-68</sup>

**SCCmec TipIII;** sınıf A mec gen kompleksi ve tip III ccr gen kompleksinden oluşmaktadır. Beş tipin en büyüğü 66.896 bp olup, mecA, mecR1 dışında pT181 plazmidi, Tn554 transpozonu ve pseudo Tn554 ( $\Psi$ Tn554) taşımaktadır.  $\Psi$ Tn554 kadmiyuma karşı dirençten, pT181 tetrasiklin ve civaya karşı dirençten sorumludur. Diğer tiplerde bulunmayan  $\Psi$ ccr geni adı verilen geni de içerir.<sup>66-68</sup>

**SCCmec TipIV:** sınıf B mec gen kompleksi ve tip 2 ccr gen kompleksinden oluşmaktadır. Bu yapı küçük olup mecA dışında direnç geni taşımaz.<sup>66,67,69</sup>

**SCCmec TipV;** sınıf C mec gen kompleksi ile ccrC içermektedir. Ito ve ark. tarafından bir Avustralya suşundan tanımlanmıştır. Bu kasetin boyutu 27.624 bp olup tipIV'den biraz büyüktür. Sadece metisilin direnci kodlayan genlere sahiptir.<sup>66,67,70</sup>

İngiltere'de 1961'de izole edilen ilk MRSA (NCTC 10442) suşunun Tip I, Japonya'da 1982'de izole edilen MRSA (N315) suşunun Tip II, Yeni Zelanda'da 1985'de izole edilen MRSA (85/2082) suşunun Tip III SCCmec içerdiği saptanmıştır.<sup>66,68,71</sup> SCCmec tiplerinden, Tip I, II ve III genellikle hastane kökenli, Tip IV ve V ise toplum kökenli MRSA izolatlarında bulunmaktadır. mecA dışında direnç geni taşımadıklarından dolayı toplum kaynaklı suşlar genelde beta-laktam dışı antibiyotiklere duyarlılardır.<sup>66,72</sup>



Şekil 3. Stafilokoklarda tanımlanan SCCmec tipleri

Stafilokoklarda metisilin direnci fenotipik olarak iki farklı biçimde karşımıza çıkabilmektedir.

**Homojen direnç:** Bakteri kolonisini oluşturan tüm bakteriler *mecA* genini taşırlar ve hepsinde *mecA* geni fonksiyoneldir. Direnç ortamın pH'sı, ısı, tuz konsantrasyonu, inkübasyon süresi gibi çevresel faktörlerle ilişkili değildir.<sup>44,61,63</sup>

**Heterojen direnç:** Klinik uygulamada daha sık görülen, ancak tespiti güç olan direnç türüdür. *mecA* geni taşımalarına rağmen,  $10^4$  yada  $10^8$  bakteriden birinde direncin olması durumudur. Bunun nedeninin; *mecA* dışındaki düzenleyici genetik elemanların mutasyonu olabileceği düşünülmektedir. Aynı zamanda bu suşlarda direnç, ortamın pH'sı, ısı, tuz konsantrasyonu, inkübasyon süresi ile ilişkilidir.<sup>44,61,63</sup>

Ayrıca *mecA* varlığına rağmen metisilin minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) düzeylerinin düşük olduğu izolatlar bulunmaktadır. Pre-MRSA olarak adlandırılan bu izolatlarda *mecI-mecRI* düzenleyici genleri işlevseldir. *In-vitro* ortamda metisilin direnci görülmezken, *in-vivo* ortamda beta-laktam ajanla karşılaşınca direnç ortaya çıkar. Bu nedenle heterojen dirençli izolatların saptanmasında *mecR1* için daha iyi ve hızlı bir indükleyici olan sefoksitin kullanılması, otolizinlerin etkisini azaltmak için besiyerine % 2-4 oranında NaCl eklenmesi, *mecA* gen ekspresyonunun artırılması için düşük ısıda uzun süre inkübasyon gibi yöntemleri kullanılmaktadır.<sup>2,44,45,63</sup>

### 2.8.3.2. Aşırı beta laktamaz salgılanması ile oluşan direnç

Beta laktamazların aşırı salgılanması metisilini kısmen parçalayarak metisilin direncine neden olur. Bu tür direnç, beta laktam antibiyotiklerin beta laktamaz inhibitörü ile kombine edilmesi ile yenilebilir.<sup>42,45,63</sup>

### 2.8.3.3. Mevcut PBP'lerde beta laktam antibiyotik afinitesinde azalma ile oluşan direnç

Son yıllarda *mecA* geni taşımadıkları halde metisiline dirençli stafilokoklar tespit edilmiştir. Çok az sayıda görülen bu suşlar incelendiğinde, bu bakterilerin mevcut PBP'lerinin beta laktam antibiyotiklere düşük afinite gösterdikleri saptanmıştır.<sup>2,42,63</sup> Ayrıca *mecA* negatif olmasına rağmen oksasilin MİK değerleri 8-16 mg/L civarında olan suşlar bulunabilmektedir. Bunların bir kısmı beta-laktamazın aşırı üretiminden [Borderline resistant *S.aureus* (BORSA)], bir kısmı da var olan PBP'lerdeki (özellikle

PBP2 ve PBP4) nokta mutasyonlarından [Moderately resistant *S. aureus* (MODSA)] veya PBP4'ün (düşük molekül ağırlıklı PBP) aşırı yapımından kaynaklanabilir.<sup>2,42,63</sup>

#### 2.8.4. Metisilin direncini etkileyen internal faktörler

**1- Belirli Uzunluktaki Glikan Zincirleri:** PBP2a, PBP2'nin transglikozilaz aktivitesine bağımlıdır. Beta laktamlar yüksek molekül ağırlıklı PBP'lerin transpeptidaz "domain"ini inhibe ederken, transglikozilaz "domain"ine bir etki göstermezler. Transglikozilaz "domain"inin inaktivasyonu daha kısa olan glikan zincirlerin sayısında artışa ve metisilin direncinde belirgin azalmaya neden olur.<sup>63,73</sup>

**2- Normal Peptid Konfigürasyonu İçin Gerekli Kök Peptidler:** Ortama glisin konulduğunda, peptidoglikan zincirinin sonunda normal koşullarda olması gereken iki alanin rezidüsünün yerini, iki glisin rezidüsünün almasının metisilin direncinde azalmaya ve homojen fenotipin heterojen fenotipe dönüşmesine neden olduğu bilinmektedir. UDP-N-asetil tripeptid sentatazi kodlayan gen olan murE (femF)'nin inaktivasyonu sonucunda da metisilin direncinde azalma olur. Nedeni hücre duvarı öncülleri havuzundaki UDP-bağlı muramil pentapeptidlerin azalması ve UDP-bağlı muramil dipeptidlerin birikmesidir. Bu sonuçlar PBP2a'nın doğru uzunlukta ve normal seride peptid elde edilmesi için kök peptidlerine ihtiyaç olduğuna işaret etmektedir.<sup>63,73</sup>

**3- Intakt Olmak İçin Gerekli Pentaglisin Çapraz Köprüleri:** Glikan zincirlerini birbirine bağlayan pentaglisin çapraz köprülerinin yapımından femA, femB ve femX sorumludur. FemX birinci glisini, femA ikinci ve üçüncü glisinleri ve femB de dördüncü ve beşinci glisinleri köprüye sokar. femA ve femB arasında değişme olmadığından bu proteinlerden herhangi birini kodlayan genlerin inaktivasyonu sonucu mono veya tri-glisinli çapraz köprüler oluşur. femA ve femB genlerinin herhangi birinin inaktivasyonu bakteri için letal olduğundan, femA ve femB proteinleri ilaç çalışmalarının yeni hedefleridir.<sup>63,73</sup>

#### 2.8.5. Metisilin direncini etkileyen eksternal faktörler:

Tuz konsantrasyonu, pH, ozmolarite ve ortam ısısı metisilin direncini etkileyen eksternal faktörlerdendir. Yüksek NaCl konsantrasyonunun (% 6.5) ve düşük sıcaklığın

(30-35 °C) metisilin direncini nasıl artırdığı tam olarak bilinmemektedir. İnkübasyon süresinin 18 saat yerine 24 saate uzatılmasının metisilin dirençli suşların saptanmasını artırdığıda bilinmektedir.<sup>63,73</sup>

## 2.8.6. Metisilin Direncinin Belirlenmesinde Kullanılan Yöntemler

MRS'lar, Nİ'ların en önemli etkenlerinden biridir. MRS'larda tüm beta-laktam yapısındaki antibiyotiklere ve aynı zamanda diğer grup antibiyotiklere olmak üzere çoklu ilaç direnci görülmektedir. Bu nedenden dolayı metisilin direncinin en kısa sürede doğru olarak saptanmasının bu infeksiyonların kontrol altına alınmasında ve tedavisinde doğru antibiyotiğin seçilmesinde büyük önem taşımaktadır. Günümüzde metisilin direncinin saptanmasında mecA geninin moleküler yöntemlerle saptanması altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak, bu yöntemlerin klinik laboratuvarlarda uygulanması zor ve pahalıdır. Bu nedenle klinik laboratuvarlarda stafilokok izolatlarında metisilin direncinin saptanmasında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır.

### 2.8.6.1. Fenotipik Yöntemler

**Disk difüzyon yöntemi:** En sık kullanılan yöntemdir. İnokulum yoğunluğu McFarland 0.5 standartına eşdeğer olacak şekilde hazırlanır. Mueller Hinton agar (MHA) besiyerine eküvyon ile ekim yapıldıktan sonra diskler yerleştirilir ve 35°C'de 16-18 saat (oksasilin için 24 saat) inkübe edilir. Bunun sonucunda, disk çevresinde bakterilerin üremediği dairesel bir inhibisyon alanı oluşur. Bu alanın çapı mm cinsinden ölçülerek 'duyarlı', 'orta duyarlı', 'dirençli' olacak şekilde duyarlılık belirlenir. Diskler arasındaki mesafe en az 2 cm olmalıdır.<sup>74,75,76,77</sup>

**E-test yöntemi:** Bakteri süspansiyonu yine McFarland 0.5 standartında hazırlanır ve MHA'a eküvyon ile ekim yapılır. E-test stribi yerleştirilip, 35°C'de 24 saat inkübe edilir. İnkübasyon süresi sonunda, elips şeklindeki inhibisyon alanının stribi kestiği konsantrasyon MİK olarak belirlenir.<sup>74,77</sup>

**Tuz agar tarama:** Bu yöntemde, 6 µg/ml oksasilin ve % 4 NaCl içeren MHA besiyerine, McFarland 0.5 standardında bakteri süspansiyonundan eküvyon ile ekim yapılır. Plaklar 24 saat 35°C’de inkübe edilir. Bir tek koloni üremesi dahi suşun metisiline dirençli olduğunu gösterir. Testin duyarlılık ve özgüllüğü oldukça yüksektir. Bu test KNS için önerilmemektedir.<sup>74,77</sup>

**Vitek 2 otomatize sistem:** Vitek 2 sistem antibiyotik duyarlılık test (AST) kartı, Gram pozitif mikroorganizmaların otomatize kantitatif veya kalitatif duyarlılık testi için kullanılır. Antibiyotik duyarlılık sonuçları sistem tarafından 16-24 saat içinde verilmektedir. VITEK 2 otomatize sistemde *S. aureus* ve KNS’lar için oksasilin MIK değeri CLSI önerileri doğrultusunda rapor edilmektedir.<sup>41,77</sup>

### 2.8.6.2. Moleküler yöntemler

Stafilokoklarda metisilin direncinin belirlenmesi için, moleküler olarak mecA geninin saptanması, fenotipik yöntemlere kıyasla daha duyarlıdır. PZR ve DNA hibridizasyon teknikleri ile mecA geninin saptanması altın standart olarak kabul edilmektedir.<sup>1,2,74,75</sup>

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

olur. Çoğaltılan DNA parçaları bir çok değişik yöntemle belirlenebilir. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanı agaroz jel elektroforezdir.<sup>78,79</sup>

Bu yöntemlerden biri de ticari olarak geliştirilmiş, nükleik asit amplifikasyonu ile birlikte eř zamanlı artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle kısa sürede sonuç veren real-time PZR yöntemidir. Ticari olarak geliştirilmiş üç tipi bulunmaktadır. Bunlar LightCycler (Roche), TaqMan (PE Biosystem) ve iCycler (BIO-RAD)'dır.<sup>78,80</sup>

Çalışmada Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Balcalı Hastanesi Merkez Laboratuvarında bulunan LightCycler sistemi kullanılmıştır. Sistemde iki tür uygulama şekli mevcuttur. LightCycler sistemin bir uygulamasında; yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresans veren boyalar (Cyber green I) kullanılarak, amplifikasyona bağlı DNA artışı ile ortaya çıkan floresansın miktarı ile ölçülmektedir. Primerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan "cyber green" miktarı artmakta ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir. Bu uygulamada, floresans artışı her zaman spesifik amplifikasyonu göstermeyebilir. Çünkü, ift sarmal DNA'ya entegre olan "cyber green" ortamda hedef moleküller olmadığında, primerlerin kendi aralarında gerçekleşecek olan bağlanmalar (primer dimerleri) sonucunda da yapıya katılarak floresans oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu olumsuz faktörü gidermek için amplifikasyon ürünlerinin "melting curve" (erime eğrisi) analizi yapılmaktadır. Her ift sarmal DNA, kendine özgü "melting temperature, T<sub>m</sub>" (ift sarmal DNA'nın % 50'sinin tek sarmal hale geçmesi için gerekli sıcaklık) değerine sahiptir. PZR amplifikasyonunun ardından sıcaklık yavaş yavaş yükseltilerek, belirli aralıklarla tüpteki floresans miktarı kaydedilir. Çift sarmal DNA zincirleri birbirinden ayrılmaya başlayınca "Cyber green" boya serbest kalmakta ve floresans miktarı azalmaktadır. Denatürasyon olduğunda floresans sinyal aniden düşmektedir. Erime eğrisinden yararlanılarak ampikonun T<sub>m</sub> derecesi saptanabilmektedir. Klinik örneğe ait T<sub>m</sub> derecesi, aynı koşullarda işleme alınan pozitif kontrolün T<sub>m</sub> derecesiyle karşılaştırılarak, PZR sonucunun doğru veya hatalı olduğuna karar verilmektedir.<sup>80</sup>

LightCycler'in diğer bir uygulama şekli de çalışmamızda kullanılan hedefe özgül proplardır. Bu proplarla testin özgüllüğü arttırılmıştır. Proplardan biri 3' ucundan floresans boya ile işaretili (donör boya), diğer 5' ucundan alıcı boya (acceptor dye) ile işaretilenmiştir. Proplar hedef ampikonlar üzerinde birbirine yakın (1-5 nükleotid

uzaklıkta) yere bağlanmakta ve işaretli uçlar yan yana gelmektedir. İki boyanın yan yana gelmesiyle açığa çıkan enerji ikinci prop üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresans oluşumuna yol açmaktadır. Fluoresance resonance energy transfer (FRET) olarak adlandırılan bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı, ortamdaki hibridizasyonun derecesine diğer bir ifade ile PZR siklusu süresince oluşan ampliconların miktarına bağlı olarak artmaktadır.

Real-time PZR kısa sürede kantitatif sonuç verebilmektedir. Tüpler açılmadan tanıya gidildiği için kontaminasyon riski düşüktür. Elektroforeze gerek kalmadan amplifikasyon esnasında sonuç alınabilmektedir. Ayrıca floresans veren probler kullanılarak hedef nükleik asitteki mutasyonlar saptanabilmektedir.<sup>80</sup>

Çalışmamızda, *S .aureus* ve KNS'larda metisilin direncinin çeşitli yöntemlerle araştırılması ve elde edilen sonuçların karşılaştırılması, ayrıca metisilin/oksasilin duyarlılığının saptanmasında laboratuvarımızda en uygun olan yöntemin belirlenmesi amaçlanmıştır.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmada, 2006-2007 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Balcalı Hastanesi merkez laboratuvarına gönderilen klinikörneklerden, hastalık etkeni olarak izole edilen 90 *S. aureus* ve 90 KNS suşu olmak üzere toplam 180 suş incelendi. Suşların identifikasyonu ve duyarlılığı laboratuvarında rutin olarak kullanılan Vitek 2 otomatize sistemde yapıldı. Bu suşlarda metisilin direnci; oksasilin DDT, sefoksitin DDT, oksasilin E-test, tuz agar tarama ve real-time PZR yöntemi ile araştırıldı.

#### 3.1. Klinik Örneklerden İzolasyon

Kliniklerden gelen kan kültürü şişeleri, rutin olarak Bactec 9240 otomatize kan kültürü cihazına (Becton-Dickinson) konuldu ve cihaz pozitif uyarı verene kadar en fazla yedi gün inkübe edildi. Pozitif kan kültürleri Gram boyama ile değerlendirildi. Bronko-alveolar lavaj, trakeal aspirat örnekleri, beyin omurilik sıvısı (BOS), asit mayi, plevral mayi örnekleri, yara, apse, idrar örnekleri ve diğer klinik örnekler % 5 koyun kanlı agar (COS; bioMerieux), McConkcey agar (MCK; bioMerieux) ve çikolata besiyerine (PVX; bioMerieux) ekildi ve 35-37°C'de, 18-24 saat inkübe edildi. Anaerop kültür için de kanlı agar ve çikolata besiyerine ekim yapıldı ve anaerogen kiti (Oxoid) içeren anaerop jar içine konuldu ve 24-48 saat sonra değerlendirildi. Aynı zamanda BOS, apse gibi örnekler tiyoglikolatlı sıvı besiyerine (THIO-T; bioMerieux) ekildi ve 35-37°C'de, 48-72 saat inkübe edildi.

#### 3.2. Değerlendirme

Bakteri üremesi saptanan kolonilerden Gram boyası yapılarak Gram pozitif kok olanlara katalaz ve plazma koagülaz testi uygulandı.

**3.2.1. Katalaz testi:** Eritrositlerde var olan katalaz aktivitesi nedeniyle, çikolata besiyerinden lam üzerine alınmış koloniye % 3'lük hidrojen peroksitten (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) birkaç damla damlatıldı ve hava kabarcığının oluşması pozitif test olarak kabul edildi. Kontrol suş olarak *S. aureus* ATCC 29213 kullanıldı.

**3.2.2. Plazma koagülaz testi:** Gram pozitif kok boyanan ve katalaz testi pozitif olan tüm izolatlaraya uygulandı. Çalışmada, tüp koagülaz testi yapıldı ve insan plazması kullanıldı. Besiyerinden öze ile alınan birkaç koloni, 1ml insan plazması içinde ezildi ve emülsiyon haline getirildi. Tüpler 37°C'ye kaldırıldı 2., 4., ve 24. saatlerde pıhtı oluşup oluşmadığı kontrol edildi. Bu süre içinde pıhtı oluşturmayan suşlar koagülaz negatif kabul edildi. Tüp koagülaz testinde pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 29213 suşu kullanıldı.

**3.2.3. Vitek 2 Otomatize Sistem:** Katalaz ve plazma koagülaz işlemlerinden sonra, suşlar identifikasyon ve duyarlılık için rutin olarak kullanılan Vitek 2 otomatize sisteme verildi. Gram pozitif identifikasyon kartı GP (bioMerieux) ve Gram pozitif duyarlılık kartı AST-P536 (bioMerieux) kullanıldı. Referans suş olarak *S. aureus* ATCC-29213 kullanıldı. Steril salinden (% 0.45-0.50 NaCl, pH 4.5-7.0) sistem için özel kullanılan şeffaf plastik deney tüpüne (12x75 mm) 3 ml konuldu. Tüpe öze ile saf koloniler aktarıldı ve McFarland 0.50-0.60'a eşdeğer yoğunlukta homojen bir süspansiyon hazırlandı. Süspansiyon tüpü, GP kartı ve AST-P536 kartı kasete yerleştirildi. Veri girişi ve kasetin cihaza yüklenmesi Vitek 2 otomatize sistem kullanım talimatına uygun şekilde yapıldı.

Çalışmada incelenen toplam 180 suş Mikrobank saklama tüpünde -20°C'de saklandı. Ayrıca Vitek 2 otomatize sistem sonuçları ile tüp koagülaz testi sonuçları uyumlu bulundu.

### **3.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri:**

**3.3.1. Disk difüzyon yöntemi:** Kirby-Bauer disk difüzyon tekniği ile CLSI döküman M2-A9 önerileri dikkate alınarak yapıldı. Ticari firmadan satın alınan 1 µg oksasilin diski (Oxoid) ve 30 µg sefoksitin diski (Oxoid) kullanıldı. İnkübasyon periyodu sonunda *S. aureus* ve KNS suşları için önerilen üreme zon çapları mm cinsinden değerlendirildi. Kontrol suşu olarak metisiline duyarlı *S. aureus* ATCC 29213 kullanıldı.

Ayrıca çalışmamızda stafilokok infeksiyonlarında tercih edilen bir çok antibiyotik içinde disk difüzyon yöntemi kullanıldı. Bu antibiyotikler; 10 µg penisilin, 5 µg

rifampin, 15 µg eritromisin, 2 µg klindamisin, 30 µg tetrasiklin, 10 µg gentamisin, 30 µg kloramfenikol, 5 µg siprofloksasin, 10 µg fusidik asit, 30 µg vankomisin ve 25 µg trimetoprim-sulfametoksazol olup değerlendirmede CLSI tarafından önerilen duyarlılık sınırları kullanıldı. Fusidik asit duyarlılığı Fransa Mikrobiyoloji Cemiyeti Antibiyogram Komitesi' nin 1996'da belirlediği kriterlere göre yapıldı.

**3.3.2. E-Test yöntemi:** CLSI'nın M7-A7 belgesi önerileri dikkate alınarak yapıldı. İnokulum disk difüzyon yöntemindeki gibi hazırlandı. Oksasilin E-test (AB Biodisk) stripleri kullanıldı. Testte kontrol suşu olarak *S. aureus* ATCC 29213 kullanıldı.

**Tablo 3. *S.aureus* ve KNS'larda CLSI tarafından önerilen oksasilin-sefoksitin disk difüzyon ve E-test duyarlılık sınırları**

	Antibiyotik	Zon çapı (mm)			MİK (mg/ml)	
		R	I	S	R	S
<i>S. aureus</i> ve <i>S. lugdunensis</i>	Oksasilin	≤10	11-12	≥13	≥4	≤2
	Sefoksitin	≤19	-	≥20	≥8	≤4
<b>KNS'lar</b> ( <i>S. lugdunensis</i> dışında)	Oksasilin	≤17	-	≥18	≥0.5	≤0.25
	Sefoksitin	≤24	-	≥25	-	-

**3.3.3. Tuz Agar Tarama Yöntemi:** Oksasilin agar tarama CLSI döküman M7-A7 standartlarına göre yapıldı. Mueller Hinton toz agara (Oxoid) % 4 NaCl eklendi, 121°C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra 50°C ye soğutuldu ve steril şartlarda 6 µg/ml olacak şekilde oksasilin toz (Sigma) eklenerek 4 mm kalınlığında petrilere besiyeri döküldü. İnokulum disk difüzyon için tarif edildiği gibi hazırlandı. Besiyerleri 35°C'de 24 saat inkübe edildi. Tek bir koloni üremesi halinde bile oksasiline dirençli kabul edildi. Kontrol suşu olarak *S.aureus* ATCC 29213 kullanıldı.

### 3.4. Moleküler Yöntem:

#### 3.4.1. DNA Ekstraksiyonu

Çalışmada DNA ekstraksiyonu High Pure PCR Template Preparation kit (Roche, Kat No: 11 796 828 001) ile yapıldı. Kit oda ısısında (15-25°C) saklandı, ancak proteinaz K solusyon haline getirilince -20°C'ye alındı. Kitin içeriği aşağıda verilmiştir.

Tissue Lysis Buffer (20 ml)

Binding Buffer (20 ml)

Proteinase K

Inhibitor Removal Buffer (33 ml, add 20 ml ethanol)

Wash Buffer (20 ml, add 80 ml ethanol)

Elution Buffer (40 ml)

High Pure Filter Tubes

Collection Tubes (2 ml)

DNA ekstraksiyon işlemi üretici firmanın önerisi doğrultusunda aşağıdaki sıraya göre yapıldı.

- 1- Çalışılacak suş, % 5 koyun kanlı agarda 35°C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra, 2-3 koloni alınarak 200 µL fosfat buffer saline ( PBS) içeren mikrosantrifüj tüp içerisinde süspanse edildi.
- 2- Aynı tüpe önce 200 µL Binding buffer, sonrada 40 µL Proteinaz K eklendi ve karışım yaklaşık 10 saniye vortekslendi. Tüp 70°C'lik ısı bloğunda 10 dakika bekletildi. Elution buffer dan da sonra kullanmak üzere 200 µL alınıp 70°C'ye bırakıldı.
- 3- Isı bloğundan alınan mikrosantrifüj tüpe 100 µL isopropanol eklendi ve yaklaşık 10 saniye kadar vortekslendi.
- 4- Mikrosantrifüj tüp içerisinden 570 µL karışım alınıp kolleksiyon tüp içerisine yerleştirilen filtreli tüpe konuldu. Tüp 8000 xg de 1 dakika santrifüj edildi. Alt tüp atıldı, filtreli tüp yeni bir kolleksiyon tüpüne aktarıldı.
- 5- Filtrenin üstüne 500 µL inhibitör removal buffer eklendi ve 8000 xg de 1 dakika santrifüj edildi. Karışımın süzüldüğü kolleksiyon tüp atıldı, filtreli tüp yeni bir kolleksiyon tüpe konuldu.

6- Filtrenin üstüne 500 µL Wash buffer eklendi ve tekrar 8000 xg de 1 dakika santrifüj edildi. Filtreli tüp alınarak yeni kolleksiyon tüpüne aktarıldı.

7- Filtreli tüpe tekrar 500 µL Wash buffer eklendi ve 8000 xg de 1 dakika santrifüj edildi. Kolleksiyon tüpü boşaltılarak maksimum devirde 20 saniye daha santrifüj yapıldı. Filtreli tüp 1.5ml'lik mikrosantrifüj tüpün içine yerleştirildi.

8- Isı bloğundan çıkartılan Elution buffer dan 200 µL konuldu ve 8000 xg de 1 dakika santrifüj edildi ve filtreli tüp atıldı.

9- Elde edilen DNA, LightCycler Real-Time PCR da kullanılmak üzere -20°C de saklandı.

### **3.4.2. Real-Time PCR**

LightCycler cihazı ile gerçekleştirildi. Sistemde LightCycler MRSA Kit (Roche, Kat. No: 3 335 038) kullanıldı. Kit 20 µL'lik mixlerle 56 test çalışılmak üzere dizayn edilmiştir. Bu 56 testten 48'i örnek, 8'i kontroldür. Önerilen depolanma -20°C dir. Kitin içeriği aşağıda verilmiştir.

- LightCycler MRSA detection mix [10x conc.]; mecA ve internal kontrol gen bölgelerine spesifik primer ve hibridizasyon proplar içerir.
- LightCycler MRSA enzim solüsyonu; içinde FastStart Taq DNA polimeraz bulunur.
- LightCycler MRSA reaksiyon mix; içeriğinde FastStart Taq DNA polimeraz reaksiyon buffer ve dNTP bulunur.
- LightCycler MRSA pozitif kontrol.
- LightCycler MRSA internal kontrol.
- MgCl<sub>2</sub> solüsyonu; 25 mM MgCl<sub>2</sub>.
- Distile su.

#### Mixin Hazırlanması:

Bileşen	Hacim
Distile su	6.3 µl
MgCl <sub>2</sub> solüsyonu	2.4 µl
LightCycler MRSA detection mix	2 µl
LightCycler MRSA internal kontrol	2 µl
LightCycler MRSA reaksiyon mix	1.7 µl
LightCycler MRSA enzim solüsyonu	0.6 µl
Toplam mix	15 µl
Örnek DNA	5 µl

Her bir kapillere 15 µl mix ve 5 µl örnek DNA konularak kapillerler hazırlandı ve cihaza yerleştirildi. Cihaz en fazla 32 kapiller almakta olup bunların 30'u örnek, biri pozitif kontrol ve diğeri negatif kontroldür. Cihaz aşağıda belirtilen protokol girildikten sonra çalıştırıldı.

**Tablo 4. LightCycler MRSA Detection Kit çalışma protokolü**

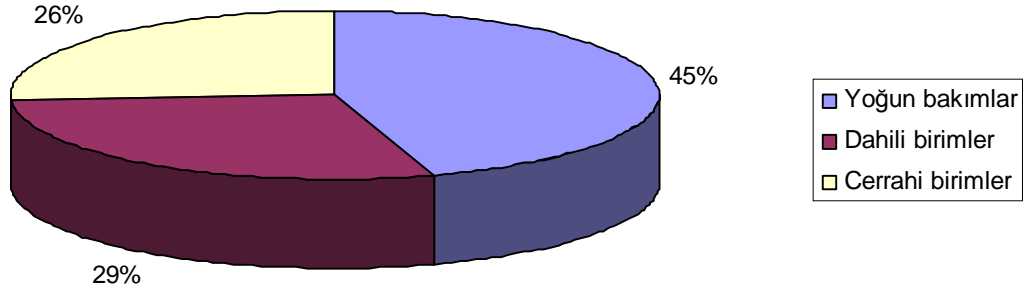
Parametre	1. Denaturasyon	2. Amplifikasyon		
Siklus	1	45		
Segment	1	1	2	3
Isı (°C)	95	95	55	72
Zaman (sa:dk:sn:)	00:10:00	00:00:10	00:00:10	00:00:12

**Tablo 4'ün devamı**

Parametre	3. Erime Eğrisi Analizi				4. Soğuma
Siklus	1				1
Segment	1	2	3	4	1
Isı (°C)	95	59	45	85	40
Zaman (sa:dk:sn:)	0	00:00:20	00:00:20	0	00:00:30

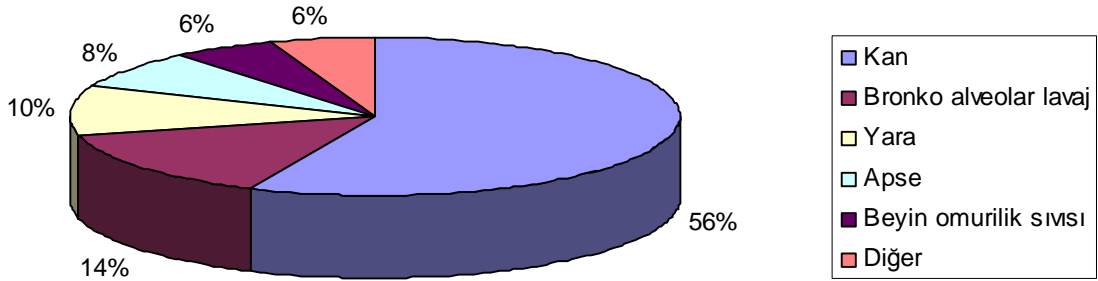
#### 4. BULGULAR

Çeşitli klinik örneklerden izole edilen 90'ı *S. aureus*, 90'ı KNS toplam 180 suş çalışmaya alındı. Bunların 81'i yoğun bakım ünitelerinden, 52'si dahili birimlerden ve 47'si cerrahi birimlerden gönderilen klinik örneklerden izole edildi (Şekil 4).



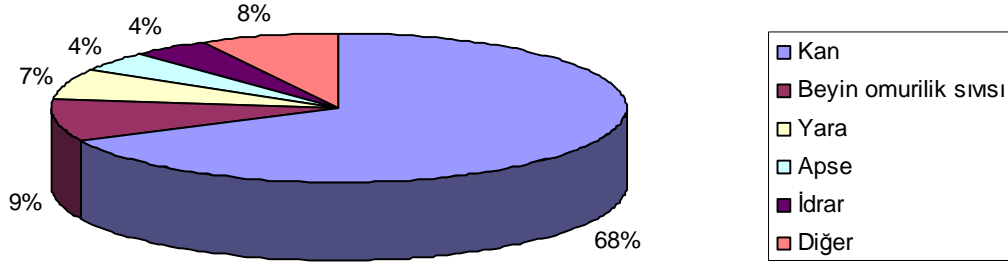
Şekil 4. Stafilokok izolatlarının kliniklere göre dağılımı

*S. aureus* suşlarının 51'i kan kültüründen, 13'ü bronko-alveolar lavajdan, 9'u yaradan, 7'si abseden, 5'i beyin omurilik sıvısından, 5'i de diğer klinik örneklerden elde edildi (Şekil 5).



Şekil 5. *S.aureus* suşlarının klinik örneklere göre dağılımı

KNS suşlarının 61'i kan kültüründen, 8'i beyin omurilik sıvısından, 6'sı yaradan, 4'ü apsenden, 4'ü idrardan, 7'si de diğer klinik örneklerden elde edildi (Şekil 6).



Şekil 6. KNS suşlarının klinik örneklerle göre dağılımı

Tür düzeyinde tanınan KNS'lar içerisinde klinik örneklerden en sık izole edilen *S. epidermidis* olup bunu *S. hominis* izledi (Tablo 5).

Tablo 5. KNS türleri ve klinik örneklerle göre dağılımı

Suş	Kan	BOS	Yara	Apse	İdrar	Diğer	Toplam
<i>S. epidermidis</i>	29	5	5	4	-	4	47
<i>S. hominis</i>	23	1	-	-	1	2	27
<i>S. haemolyticus</i>	4	1	-	-	1	1	7
<i>S. capitis</i>	2	1	-	-	-	-	3
<i>S. saprophyticus</i>	-	-	-	-	2	-	2
<i>S. auricularis</i>	1	-	-	-	-	-	1
<i>S. caprae</i>	1	-	-	-	-	-	1
<i>S. lugdunensis</i>	-	-	1	-	-	-	1
<i>S. warneri</i>	1	-	-	-	-	-	1

*S. aureus* suşlarının 44'ü metisiline dirençli iken 46'sı metisiline duyarlı bulundu. KNS suşlarının ise 47'si metisiline dirençli, 43'ü metisiline duyarlı bulundu. CLSI'nin önerileri doğrultusunda bu suşlarda metisilin direncini tespit etmek için 1 µg oksasilin disk difüzyon testi, 30 µg sefoksitin disk difüzyon testi, oksasilin E-test ve tuz agar tarama uygulandı (Tablo 6).

**Tablo 6. *S.aureus* ve KNS suşlarında fenotipik yöntemlerin uyumu [n (%)]**

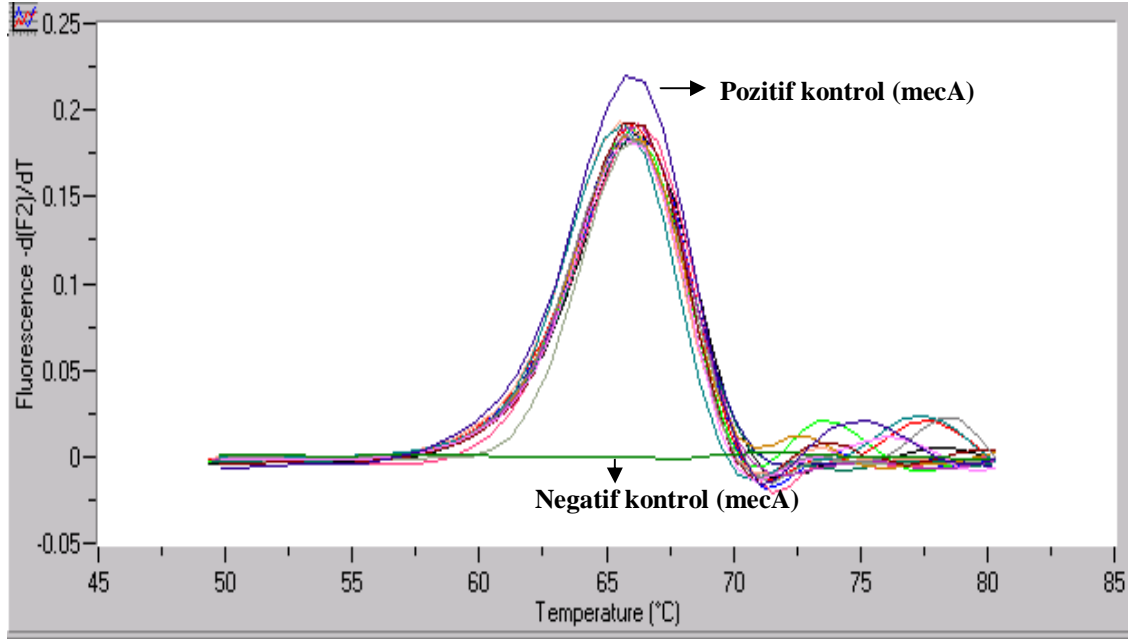
Yöntem	<i>S. aureus</i> n=90			KNS n=90		
	Dirençli	Orta duyarlı	Duyarlı	Dirençli	Orta duyarlı	Duyarlı
Vitek 2 sistem	44 (% 48.9)	-	46 (% 51.1)	47 (% 52.2)	-	43 (% 47.8)
Oksasilin DDT	45 (% 50)	1 (% 1.1)	44 (% 48.9)	47 (% 52.2)	-	43 (% 47.8)
Sefoksitin DDT	45 (% 50)	-	45 (% 50)	46 (% 51.1)	-	44 (% 48.9)
Oksasilin E-test	45 (% 50)	-	45 (% 50)	47 (% 52.2)	-	43 (% 47.8)
Tuz agar tarama	44 (% 48.9)	-	46 (% 51.1)	41 (% 45.5)	-	49 (% 54.4)

Metisilin direncinin belirlenmesinde *mecA* geninin moleküler yöntemlerle saptanması altın standart olarak kabul edilmektedir. Çalışmamızda *mecA* geni real-time PZR yöntemiyle araştırıldı (Tablo 7).

**Tablo 7. *S.aureus* ve KNS suşlarında *mecA* geni varlığı [n (%)]**

	<i>mecA</i>	
	Pozitif	Negatif
<i>S. aureus</i>	44 (% 48.9)	46 (% 51.1)
KNS	45 (% 50)	45 (% 50)

LightCycler sisteminde real-time PZR çalışılarak *mecA* gen pozitif ve negatif suşlar tespit edildi. *mecA* gen varlığı altın standart olarak değerlendirildi.



Şekil 7. *mecA* geni pozitif olan suşların real-time PZR görüntüsü

*mecA* geni tespit edilmiş olmakla birlikte 2 *S. aureus* ve 3 KNS suşunda uygulanan fenotipik yöntemlerde farklı duyarlılık sonuçları belirlendi (Tablo 8).

Tablo 8. *mecA* geni içermelerine karşılık fenotipik yöntemlerle farklı duyarlılık sonuçları izlenen suşlara ait veriler

Stafilokok türü	Vitek 2	Oksasilin DDT	Oksasilin E-test	Sefoksitin DDT	Tuz agar tarama
<i>S. aureus</i>	Duyarlı	<b>Dirençli</b>	<b>Dirençli</b>	Duyarlı	<b>Dirençli</b>
<i>S. aureus</i>	Duyarlı	Orta duyarlı	Duyarlı	<b>Dirençli</b>	Duyarlı
KNS	Duyarlı	<b>Dirençli</b>	<b>Dirençli</b>	<b>Dirençli</b>	Duyarlı
KNS	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	<b>Dirençli</b>	Duyarlı
KNS	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı	<b>Dirençli</b>	Duyarlı

mecA geni içermemelerine karşılık 2 *S.aureus* ve 5 KNS suşunda fenotipik yöntemlerde farklı sonuçlar elde edildi (Tablo 9).

**Tablo 9. mecA geni içermemelerine karşılık fenotipik yöntemlerle farklı duyarlılık sonuçları izlenen suşlara ait veriler**

Stafilokok türü	Vitek 2	Oksasilin DDT	Oksasilin E-test	Sefoksitin DDT	Tuz agar tarama
<i>S. aureus</i>	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli
<i>S. aureus</i>	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli
<b>KNS</b>	Dirençli	Dirençli	Dirençli	<b>Duyarlı</b>	<b>Duyarlı</b>
<b>KNS</b>	Dirençli	Dirençli	Dirençli	<b>Duyarlı</b>	<b>Duyarlı</b>
<b>KNS</b>	Dirençli	<b>Duyarlı</b>	<b>Duyarlı</b>	<b>Duyarlı</b>	<b>Duyarlı</b>
<b>KNS</b>	Dirençli	Dirençli	Dirençli	<b>Duyarlı</b>	Dirençli
<b>KNS</b>	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli	Dirençli

**Tablo10. *S. aureus* ve KNS suşlarına uygulanan fenotipik yöntemlerin genotipik yöntem ile karşılaştırılması ve yöntemlerin uyumu**

Yöntem	Sonuç	<i>S.aureus</i> mecA		KNS mecA		<i>S.aureus</i>	KNS
		Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif		
Vitek 2 sistem	Dirençli	42	2	42	5	<i>p</i> =0.911	<i>p</i> =0.727
	Duyarlı	2	44	3	40		
Oksasilin DDT	Dirençli	43	2	43	4	<i>p</i> =0.999	<i>p</i> =0.787
	Duyarlı	1	44	2	41		
Oksasilin E-test	Dirençli	43	2	43	4	<i>p</i> =0.999	<i>p</i> =0.787
	Duyarlı	1	44	2	41		
Sefoksitin DDT	Dirençli	43	2	44	1	<i>p</i> =0.999	<i>p</i> =0.999
	Duyarlı	1	44	1	44		
Tuz agar tarama	Dirençli	43	2	38	2	<i>p</i> =0.999	<i>p</i> =0.180
	Duyarlı	1	44	7	43		
<b>Toplam</b>		44	46	45	45		

Ayrıca çalışmamızda Vitek 2 sistem ile izole edilen stafilokok suşlarına çeşitli antibiyotiklerle disk difüzyon testi yapılarak duyarlılıkları belirlendi (Tablo 10).

**Tablo 11. MRS ve MSS suşlarında disk difüzyon yöntemi ile diğer antibiyotiklere duyarlılık [n (%)].**

Antibiyotik	<i>S. aureus</i> n=90		KNS n=90	
	MRSA n= 44	MSSA n=46	MRKNS n=47	MSKNS n=43
Penisilin	0	8 (% 17)	0	13 (% 32)
Eritromisin	6 (% 14)	37 (% 80)	5 (% 11)	29 (% 77)
Klindamisin	19 (% 43)	43 (% 93)	19 (% 40)	40 (% 93)
Tetrasiklin	9 (% 20)	38 (% 83)	25 (% 53)	36 (% 84)
Gentamisin	1 (% 2.2)	43 (% 93)	19(% 40)	39 (% 91)
Koramfenikol	39 (% 89)	44 (% 96)	40 (% 85)	41 (% 95)
Trimetoprim-sulfametoksazol	39 (% 89)	42 (% 91)	19 (%40)	36 (% 84)
Siprofloksasin	0	39 (% 85)	16 (% 33)	41 (% 95)
Rifampin	0	41 (% 89)	17 (% 36)	41 (% 95)
Fusidik asit	43 (% 98)	46 (% 100)	25 (% 53)	38 (% 88)
Vankomisin	44 (% 100)	46 (% 100)	47 (% 100)	43 (% 100)

#### 4.1. İstatistiksel İnceleme

İstatistiksel analiz için SPSS 17.0 paket programı kullanıldı. Grupların karşılaştırılmasında istatistiksel hesaplamalar için kullanılan dört gözlü tablo yapıldı; duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif ve negatif prediktif değer hesaplandı. Yöntemlerin altın standartla uyumunun incelenmesinde McNemar testi kullanıldı. Çalışmada mecA gen varlığı altın standart olarak kabul edildi. Oksasilin DDT ile orta duyarlı bulunan bir *S. aureus* suşu istatistiksel hesaplamada duyarlı olarak kabul edildi.

**Tablo 12. *S.aureus* için kullanılan testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü**

Kullanılan test	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	PPD (%)	NPD (%)
Oksasilin disk difüzyon	97.72	95.65	95.55	97.72
Oksasilin E-test	97.72	95.65	95.55	97.72
Sefoksitin disk difüzyon	97.72	95.65	95.55	97.72
Tuz agar tarama	97.72	95.65	95.55	97.72
VITEK 2	95.45	95.65	95.45	95.65

PPD: Pozitif prediktif değer, NPD: Negatif prediktif değer

**Tablo 13. KNS'lar için kullanılan testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü**

Kullanılan test	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	PPD (%)	NPD (%)
Oksasilin disk difüzyon	95.55	91.11	91.48	95.34
Oksasilin E-test	95.55	91.11	91.48	95.34
Sefoksitin disk difüzyon	97.77	97.77	97.77	97.77
Tuz agar tarama	84.44	95.55	95	86
VITEK 2	93.33	88.88	89.36	93.02

PPD: Pozitif prediktif değer NPD: Negatif prediktif değer

## 5. TARTIŞMA

Stafilokoklar günümüzde hem toplum kökenli hem de hastane kökenli patojenler arasında ilk sıralarda yer almaktadır. *S. aureus* ve KNS'ların her ikisi de *mecA* geni tarafından kodlanan, beta-laktam antibiyotiklere düşük afiniteli bir PBP olan PBP2a üretmeleri nedeniyle metisiline ve dolayısıyla diğer beta-laktam antibiyotiklere direnç kazanabilirler. Metisiline dirençli suşlar; genetik direnç aktarımı sırasında diğer antibiyotik direnç genlerinin de beraber aktarımı nedeniyle çoğunlukla makrolidler, aminoglikozitler, klindamisin, florokinolon, kloramfenikol ve ko-trimoksazol gibi bir çok antibiyotiğe de dirençlidirler.<sup>2,42,81</sup>

Metisilin direncinin en doğru şekilde belirlenmesi her klinik mikrobiyoloji laboratuvarının görevidir. Stafilocoklarda özellikle yüksek düzey heterojen direncin varlığı nedeniyle dirençli suşlar sıklıkla gözden kaçabilir. Fenotipik yöntemlerle metisilin direncinin saptanması, uygulanan test koşullarından etkilenmektedir. İnokulum miktarı, inkübasyon ısısı ve süresi, ortamın pH'sı ve NaCl konsantrasyonu gibi bir çok faktör direncin belirlenmesinde rol oynar. Bu nedenle direncin tespitinde *mecA* gen bölgesinin gösterilmesi, en iyi yöntem olarak kabul edilmektedir. Bu gen bölgesi PZR ya da DNA prob yöntemleri ile saptanabilmektedir. En önemli avantajları hızlı ve doğru sonuç alınması olan bu yöntemlerin, dezavantajları test başına maliyetlerinin yüksek olması ve eğitilmiş personel gerektirmesidir.<sup>2,81,82</sup>

Stafilokoklarda metisilin direnci, hızla yayılan ve özellikle hastanede yatan hastalarda yüksek seviyelere ulaşmış olması nedeniyle de tedavide sorunlar oluşturan önemli bir problemdir. MRS suşlarının beta-laktam antibiyotikler yanında diğer bir çok antibiyotiğe de dirençli olabilmeleri metisilin direncinin kısa sürede, doğru olarak tespit edilmesinin önemini daha da artırmaktadır. Bu direncin tespitinde genellikle maliyeti ucuz, uygulanımı kolay, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olan oksasilin DDT kullanılmaktadır.<sup>83,84</sup> Çalışmamızda MRS'ların doğru tanısında altın standart olarak tanımlanan *mecA* genini belirleyen genotipik yöntemlerle fenotipik yöntemleri karşılaştırılması ve güvenilir fenotipik yöntemin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Hem *S. aureus* hem de KNS suşlarının büyük bir kısmı yoğun bakım ünitelerinden ve kan kültürü örneklerinden izole edildi (Şekil 4, Şekil 5 ve Şekil 6). *mecA* gen varlığına göre metisilin direnç oranı *S. aureus* suşlarında % 49, KNS

suşlarında % 50 bulundu (Tablo7). Bu durum Türkiye (*S. aureus* için % 50-75, KNS için % 54- 83) ve dünya (*S. aureus* için % 55-75, KNS için % 63-78) literatürleri ile uyum göstermektedir.

Çalışmamızda 90 *S. aureus* ve 90 KNS suşunun metisilin duyarlılığı PZR-mecA gen varlığı altın standart kabul edilerek, oksasilin DDT, sefoksitin DDT, oksasilin E-test, tuz agar tarama testi ve Vitek 2 otomatize sistem ile araştırıldı. Suşlar öncelikle laboratuvarında rutin olarak kullanılan Vitek 2 otomatize tanı ve duyarlılık sisteminde çalışıldı. Sistem direnç belirlemede oksasilin MİK değerlerine göre CLSI önerilerini göz önüne alarak kural işlemekte ve sonuç yorumu yapmaktadır (Tablo 3). Özellikle KNS'larda MİK sınır değerleri düşürülerek yanlış negatifliklerin önüne geçilmeye çalışılmaktadır. mecA negatif suşlarda, fenotipik olarak dirençli bulunan suşların aşırı beta-laktamaz yapımı, metisilini inaktive eden enzimlerin varlığı, PBP2a dışında PBP'lerin bulunması gibi farklı mekanizmalar ile açıklanabileceği ifade edilmektedir.<sup>85-87</sup> Ayrıca otomatize sistemler ile genellikle yanlış negatif sonuçlara rastlanılmadığı, düşük oranda da olsa yanlış pozitif sonuçların elde edilebileceği, çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir.<sup>86-89</sup>

Oksasilin DDT'ne göre *S. aureus* suşlarının 45 (% 50)'i , KNS suşlarının 47 (% 52.2)'si, sefoksitin DDT'ne göre *S. aureus* suşlarının 45 (% 50)'i, KNS suşlarının 46 (% 51.1)'si, oksasilin E-teste göre *S. aureus* suşlarının 45 (% 50)'i, KNS suşlarının 47 (% 52.2)'si, tuz agar tarama yöntemine göre *S. aureus* suşlarının 44 (% 48.9)'ü, KNS suşlarının 41 (% 45.5)'i, Vitek 2 sistemine göre *S. aureus* suşlarının 44 (%48.9)'ü, KNS suşlarının 46 (% 52.2)'si dirençli bulundu. Real-time PZR yöntemi ile *S. aureus* suşlarının 44 (% 48.9)'ünde, KNS suşlarının ise 45 (% 50)'inde mecA geni pozitif bulundu.

Suşlarımızda oksasilin DDT, oksasilin E-test, sefoksitin DDT ve tuz agar tarama yöntemi ve Vitek 2 sonuçlarının, altın standart olarak kabul edilen mecA gen varlığı ile uyumu istatistiksel olarak incelendiğinde hem *S. aureus* hem de KNS suşlarında fenotipik testlerin tamamı uyumlu bulundu (McNemar  $p > 0.05$ ). *S. aureus* suşlarında bu testlerin ilk dördünün duyarlılık (% 97.72) ve özgüllüklerinin (% 95.65) aynı olduğu, Vitek 2 sistemde ise özgüllüğün (% 95.65) aynı olmasına karşılık duyarlılığının % 95.45 olduğu bulundu (Tablo 12). KNS'lar da oksasilin DDT ve oksasilin E-testte duyarlılık (% 95.55) ve özgüllük (% 91.11) aynı bulunurken, sefoksitin DDT'te ise

duyarlılık (% 97.77) ve özgülüğün (% 97.77) en yüksek olduğu, Vitek 2 ve tuz agar tarama yönteminde duyarlılığın sırası ile % 93.33 ve % 84.44, özgülüğün ise % 88.88 ve % 95.55 olduğu belirlendi (Tablo 13).

Geçtiğimiz 10 yılda MRSA tanımlaması için PZR esasına dayalı pek çok cihaz geliştirilmiştir. Murakami ve arkadaşları<sup>90</sup> *S. aureus*, Predari ve arkadaşları<sup>91</sup> ise KNS'lar için başarılı çalışmalar yapmışlardır. PZR sonuçları dört saat içerisinde, kültür sonuçları 48 saatte alınmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız real-time PZR yöntemi klasik PZR yöntemine göre daha hızlı ve daha az kontaminasyon riski taşıyarak direnç geni belirleyebilmektedir. Shrestha ve arkadaşları<sup>92</sup> MRSA'nın kan kültürlerinden LightCycler sistemi ile belirlenmesi için yaptıkları çalışmada *mecA* ve *sa442* genlerini hedeflemiş, LightCycler sisteminin MRSA için özgülüğü ve duyarlılığı % 100 iken, KNS'larda duyarlılık % 77.4, özgülük ise % 92.3 olarak bulunmuştur. Bu yöntem klinisyenin *S. aureus* bakteriyemisini ve metisilin direncini 24-36 saat daha erken öğrenmesini sağlamıştır.

Goffinet ve arkadaşları<sup>93</sup> 24 MRSA suşunu klasik PZR yöntemi, Vitek 2 sistemi ve/veya LightCycler Staphylococcus-MRSA kitinde ayrı ayrı tespit edebilmiştir. Bunlardan 14'ünü hem klasik PZR hem Vitek 2 hem de real-time PZR yönteminde, 4'ünü sadece Vitek 2 ile, 6'sını sadece real-time PCR ile belirlemişlerdir. Yazarlar, real-time PZR yönteminin MRSA saptanması için hızlı ve etkili bir yöntem olduğunu ve bütün işlem süresinin yaklaşık 4 saat olduğunu bildirmişlerdir.

Ruiz-Perz de Pipaon ve arkadaşları,<sup>94</sup> pozitif 131 kan kültürü şişesinde Gram pozitif kokları LightCycler real-time PZR yöntemi ile incelemişlerdir. LightCycler sisteminde metisilin direncini belirleyen *mecA* geninin yanı sıra *S. aureus*'lar için özgül olan *nucA* geni de incelenmiştir. *S. aureus* ve KNS'larda real-time PZR-*mecA* gen varlığının duyarlılık ve özgülüğünü % 100 ve % 97.5 bulmuşlardır. Real-time PZR yöntemini MRS ve MSS suşlarının hızlı bir şekilde doğrudan tanımlanması için yüksek derecede duyarlı ve özgül olarak bildirmişler.

Bizim çalışmamızda LightCycler MRSA kiti kullanıldı. Suşlar kültürden izole edildi ve Vitek 2 sisteminde tür düzeyinde tanındı. *mecA* geni, *S. aureus* suşlarının 44'ünde pozitif, 46'sında negatif iken, KNS suşlarının 45'inde pozitif, 45'inde negatif bulundu. Ancak, *mecA* geni içermelerine karşın fenotipik yöntemlerle farklı duyarlılık sonuçları veren iki *S. aureus* ve üç KNS suşuna (Tablo 8) ve *mecA* geni

içermemelerine karşın fenotipik yöntemlerle farklı duyarlılık sonuçları veren iki *S. aureus* ve beş KNS suşuna rastlanıldı (Tablo 9).

*S. aureus* izolatlarının metisilin direncinin saptanması sırasında kuşkulu sonuç alındığında, CLSI doğrulama testi olarak oksasilin tuz agar tarama testini önermektedir. *mecA* geninin saptandığı referans yöntemle en iyi uyumu bu yöntem göstermektedir. Ancak bu yöntem sadece *S. aureus* için önerilmekte, KNS'lar için önerilmemektedir.<sup>77,95</sup>

Sümbül ve arkadaşları,<sup>96</sup> 39 *S. aureus* ve 63 KNS suşunda metisilin direncini agar tarama, mikrodilüsyon, disk difüzyon, ve otomatize sistem ile araştırmışlardır. Agar tarama testinin yapılamadığı durumlarda oksasilin DDT'ni önermişlerdir. Kuzucu ve arkadaşları,<sup>97</sup> 112 *S. aureus* ve 93 KNS suşlarında mikrodilüsyon ve tuz agar tarama testleri çalışarak oksasilin DDT ile karşılaştırmışlardır. Uyumsuz sonuçlarda PZR ile *mecA* geni incelenmiştir. *S. aureus* suşlarının tamamı (% 100), KNS suşlarının % 69.9'u her üç yöntemle de metisiline dirençli olarak belirlenmiştir. KNS suşları için oksasilin tuz agar yönteminin yetersiz olduğunu belirtmişlerdir. Sancak ve arkadaşları,<sup>98</sup> 248 *S. aureus* ve 158 KNS suşlarında oksasilin DDT'ni PZR ile karşılaştırdığında, *S. aureus* suşları için duyarlılık ve özgüllük % 100, KNS'lar için de duyarlılık % 100, özgüllük % 79 olarak bulunmuştur.

Razlighi ve arkadaşları<sup>99</sup> metisilin direncinin belirlenmesinde mikrodilüsyon, DDT ve agar tarama yöntemlerini karşılaştırmış, mikrodilüsyon ve agar tarama yöntemlerini % 100 uyumlu bulunmuş, oksasilin DDT'nin iki yönteme göre duyarlılığını % 100, özgüllüğünü ise % 97.5 olarak bulmuşlardır. Swenson ve arkadaşları,<sup>95</sup> *S. aureus* türlerinde mikrodilüsyon, disk difüzyon ve oksasilin tuz agar tarama testi arasından, oksasilin tuz agar tarama yönteminin duyarlılığını en yüksek olarak saptamışlardır. York ve arkadaşları,<sup>100</sup> *mecA*'ya alternatif olabilecek duyarlılık testini belirlemek için, KNS'lar üzerinde DDT, mikrodilüsyon ve tuz agar tarama testlerini CLSI önerileri doğrultusunda uygulamışlardır. Sonuçta *mecA*'ya alternatif olarak uygulanabilecek testin tuz agar tarama testi olduğunu bildirmişlerdir. Oğuz ve arkadaşları,<sup>101</sup> toplam 117 *S. aureus* suşunda, agar dilüsyon, agar tarama ve disk difüzyon yöntemi ile metisilin direnci araştırmışlardır. Agar dilüsyona göre agar tarama ve disk difüzyon yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllükleri sırası ile % 100, % 95 ve % 100, % 92.6 bulmuşlardır.

Çalışmamızda *S. aureus* suşlarında DDT ve agar tarama testi 24. saatte, KNS suşlarında ise DDT 24. saatte, agar tarama testi 48. saatte sonuçlandırıldı. *S. aureus* suşları için oksasilin DDT ve agar tarama testi aynı duyarlılık (% 97.72) ve özgüllükte (% 95.65) bulundu (Tablo 12). Oksasilin DDT ve agar tarama testi referans yöntemine en uygun testler olarak izlendi ( $p= 0.999$ ). KNS'lar için oksasilin DDT'in duyarlılığı % 95.55, özgüllüğü % 91.11 ve agar tarama testinin duyarlılığı % 84.44, özgüllüğü % 95.55 idi. Sonuç olarak, bizim çalışmamızda da *S. aureus* suşları için tuz agar tarama ve oksasilin DDT uygun yöntemdi, ayrıca KNS'lar için agar tarama testi duyarlılığı en düşük test bulundu (Tablo 13), ancak referans yöntemle uyumlu görüldü ( $p= 0.180$ ).

Cavassini ve arkadaşları,<sup>82</sup> 200 *S. aureus* izolatında yaptıkları çalışmada, CLSI önerilerine göre uyguladıkları DDT ve tuz-agar tarama testlerinin sonuçlarını mec A sonuçlarıyla karşılaştırmışlar, DDT'in duyarlılığını % 61.3, özgüllüğünü % 96.7; tuz-agar tarama testinin duyarlılığını % 82.5; özgüllüğünü ise % 98.3 olarak tespit etmişler. Oksasilin agar tarama testi duyarlılık ve özgüllüğü yüksek bir test olarak bilinmesine karşılık, yazarlar MRSA suşlarında bu yöntemin duyarlılığını düşük bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda ise *S. aureus* suşlarında hem oksasilin DDT hem de agar tarama testinin duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olup referans test ile en uyumlu yöntemler arasında görüldü ( $p= 0.999$ ) (Tablo 12).

Kolbert ve arkadaşları,<sup>102</sup> 155 *S. aureus* ve 261 KNS izolatında mecA sonuçlarıyla, oksasilin DDT'ni karşılaştırmış, *S. aureus* izolatlarında mecA sonuçlarını DDT sonuçlarıyla uyumlu bulmuşlardır. KNS'larda ise, DDT'inde duyarlı olarak tespit ettikleri on izolatın mecA'larını pozitif, dirençli olan bir izolatın mecA genini ise negatif olarak rapor etmişlerdir. Sonuçta metisiline dirençli izolatları tanımlamada genotipik yöntemlerin duyarlı ve güvenilir olduğunu, duyarlılık testlerinin fenotipik değişikliklerden etkilendiğini belirtmişlerdir.

Bizim çalışmamızda da mecA pozitif olan bir *S. aureus* suşunda oksasilin DDT orta-duyarlı, oksasilin E-test duyarlı iken, iki KNS suşunda oksasilin DDT ve E-test duyarlı bulundu (Tablo 8). Aynı zamanda mecA negatif olan iki *S. aureus* suşunda oksasilin DDT ve oksasilin E-test dirençli iken, dört KNS suşunda oksasilin DDT ve oksasilin E-test dirençli bulundu (Tablo 9). Bu bize duyarlılık testlerinin fenotipik değişikliklerden etkilendiğini, metisilin direncini belirlemede genotipik yöntemlerin daha duyarlı ve güvenilir olduğunu göstermiştir. Metisilin direncinin doğru olarak

belirlenmemesi, etkili olmayan bir tedavinin uygulanmasına yol açarken, kliniğe yanlış pozitif sonuç verilmesi de gereksiz yere pahalı ve ciddi yan etkileri bulunan bir glikopeptid antibiyotiğin kullanılmasına neden olabilmektedir.

Oksasilin DDT'nin bir çok heterojen suşda % 61-96.4 arasında duyarlılık gösterdiğini belirten çalışmalar vardır.<sup>103-105</sup> Bazı çalışmalarda ise oksasilin DDT ile ilgili çok iyi duyarlılık sonuçları bildirilmiştir.<sup>95,105,106</sup> Disk difüzyon yönteminde görülen diğer bir problem, özgülüğünün duyarlılığından daha yüksek oluşudur (% 89-100). Bir başka deyişle, yanlış pozitif sonuç olasılığı, yanlış negatif sonuç olasılığından daha yüksektir. Çalışmamızda, oksasilin DDT'nin duyarlılığı (% 97.72) özgülüğüne (% 95.65) göre çok azda olsa yüksek bulundu (Tablo 12).

Oksasilin agar tarama yönteminin heterojen suşlar ile yapılan çalışmalarda duyarlılığının düştüğü gösterilmiştir (< % 95).<sup>95,103</sup> Diğer yandan, duyarlılığın % 97'den yukarıda olduğunu belirten çalışmalar da vardır.<sup>103,106,107</sup> Çalışmamızda bu testin duyarlılığı % 97.72, özgülüğü ise % 95.65 bulundu (Tablo 12).

Atay ve arkadaşları<sup>108</sup> *S. aureus* suşlarında metisilin direncinin belirlenmesinde, disk difüzyon testi ve mikrodilüsyon testi sonuçlarının, mecA gen varlığı ile karşılaştırıldığında duyarlılık ve özgülüklerinin birbirine eşit (% 100 ve % 91) olduğunu belirtmişlerdir. Yazarlar MSSA izolatlarında uygulanan induksiyon sonucunda (düşük ısı, yüksek NaCl) MİK değerlerinde yükselmeler olduğu ve yedi bakteride değerlerin direnç düzeyine kadar yükseldiğini belirlemişlerdir. Ancak, bu yedi izolatta mecA geni saptanamamıştır. Bu suşlarda beta-laktamaz üretiminin indüklendiği ve bunların BORSA suşları olduğu düşünülmüştür.

Çalışmamızda bütün fenotipik yöntemlere dirençli ancak mecA geni içermeyen iki *S. aureus* ve bir KNS olmak üzere toplam üç suş saptandı (Tablo 9). Bu suşlarda oksasilin E-test sonuçlarına göre oksasilin MİK değerlerinin 8-16 µg/ml arası olduğu görüldü. Direncin nedeni ya beta-laktamazın aşırı üretimine (BORSA suşları), ya var olan PBP'lerdeki (özellikle PBP2 ve PBP4) nokta mutasyonlarına (MODSA suşları), ya da PBP4'ün (düşük molekül ağırlıklı PBP) aşırı yapımına bağlı olabildiği düşünüldü. Ancak mecA geni içermesine karşılık bütün fenotipik yöntemlere duyarlı herhangi bir suşa rastlanmadı (Tablo 8).

Yamazumi ve arkadaşları<sup>109</sup> *S. aureus* izolatlarına, MRSA-Screen test, Vitek GPS kart, oksasilin agar tarama, mikrodilüsyon, ve PCR mecA testlerini uygulamışlardır.

mecA gen analizi sonuçlarına göre duyarlılık ve özgüllükleri sırası ile, % 96.9 ve % 98, % 98 ve % 99, % 100 ve % 100, %98 ve % 99 olarak bulmuşlardır. Atay ve Gülay<sup>110</sup> 111 *S. aureus* izolatının oksasiline duyarlılıklarını dört farklı yöntem (DDT, Vitek GPS 101, MRSA-Screen test ve PCR-mecA) kullanarak incelemiştir. mecA gen analizi sonuçlarına göre duyarlılık ve özgüllükleri sırasıyla, % 100, % 90, % 100 ve % 80, % 100, % 88 olarak bulunmuştur. Horstkotte ve arkadaşları,<sup>111</sup> 200 KNS suşunda metisilin direncini; Vitek 2 ve PZR-mecA geni sonuçları ile karşılaştırmış. Sonuç olarak Vitek 2 sistemde % 99.2 duyarlılık ve % 80 özgüllük bulmuşlardır. Bu nedenle MRKNS tespiti için Vitek-2 sistem yüksek güvenilirlik ve hızlı fenotipik yöntem bulunmuştur. Sakoulas ve arkadaşları<sup>107</sup> *S. aureus* suşlarında MRSA-Screen latex aglutinasyon testi, Vitek 1 sistem, Vitek 2 sistem, oksasilin agar tarama ve agar dilüsyon yöntemlerinin sonuçlarını altın standart olarak kabul ettikleri mecA-PZR ile karşılaştırmışlardır. Duyarlılık ve özgüllükleri sırası ile, % 100 ve % 99.1, % 99 ve % 100, % 99.5 ve % 97.2, % 99 ve % 98.1, % 99 ve % 100 olarak bulmuşlar.

*S. aureus*'lar için Vitek 2 sisteminin duyarlılığı % 95.45, özgüllüğü % 95.65 idi (Tablo 11). Bu yöntem referans test ile istatistiksel olarak yüksek uyum gösterdi ( $p=0.999$ ). KNS'lar da duyarlılık % 93.33, özgüllük % 88.88 idi ve referans yöntem ile uyumlu bulundu ( $p=0.727$ ) (Tablo 13). Bir çok çalışmada belirtildiği gibi bizim çalışmamızda da otomatize sistemde yanlış pozitif sonuç olasılığı, yanlış negatif sonuç olasılığından yüksek idi. Otomatize sistemde metisiline dirençli olarak tespit edilmesine karşı mecA geni içermemesi, farklı direnç mekanizmalarının bu durumun sebebi olabileceğini ve o nedenle dikkatli olmak gerektiğini gösterdi. Ayrıca Vitek 2 sistemde sonuçların çalışmada kullanılan diğer fenotipik yöntemlere göre daha kısa sürede tespit edildiği izlendi.

Ferreira ve arkadaşları,<sup>112</sup> 132 KNS izolatında metisilin direncini DDT, E-test, latex aglutinasyon ve PCR ile araştırmışlardır. Bu yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüklerini sırası ile, % 94.2 ve %91.8, % 100 ve % 71.4, % 97.1 ve % 98 olarak bulmuşlardır. Tveten ve arkadaşları<sup>113</sup> agar dilüsyon, E-test ve PCR yöntemini karşılaştırmışlar; duyarlılık ve özgüllüklerini sırası ile, % 97.6 ve % 95.4 ile % 100 ve % 95.4 olarak bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda *S. aureus* ve KNS suşları için E-testinin duyarlılık ve özgüllüğü sırası ile, % 97.72 ile % 95.65 ve % 95.55 ile % 91.11

olarak saptandı (Tablo 11, Tablo 12). Hem *S. aureus* hem de KNS suşların da oksasilin DDT ve oksasilin E-test duyarlılık ve özgüllükleri aynı bulundu.

Metisilin direnci tespit etmede karşılaşılan sorunlar nedeniyle genetik direnci, fenotipik yöntemlerle en iyi gösteren test veya yöntem arayışı sürmektedir. Heterojen dirence sahip stafilokoklarda, sefoksitin metisilin direncini oksasilinden daha iyi gösterdiğini kanıtlayan bir çok yayın bulunmaktadır. Sefoksitin, özellikle heterojen suşların tespitinde mecR1 için daha iyi ve hızlı bir indükleyici olduğu ve mecA gen varlığı ile uyumunun daha iyi olduğu bildirilmiştir.<sup>103,114,115,116</sup> CLSI 2005’de M100-S15 nolu belgesinde hem disk difüzyon hem de dilüsyon bölümlerindeki stafilokok tablosunda sefoksitin disk difüzyon yöntemini yeni test olarak önermiştir.<sup>117</sup>

Telli ve arkadaşları,<sup>118</sup> 300 *S. aureus* suşunda oksasilin DDT, sefoksitin DDT, lateks aglütinasyon test, oksasilin agar tarama test ve altın standart olarak kabul edilen PCR-mecA uygulamışlardır. Testlerin duyarlılıkları sırası ile, % 98.8, % 98.3, % 97.7 ve % 98.8; özgüllükleri ise sırası ile, % 99.1, % 99.1, % 97.4 ve % 98.3 olarak bulmuşlardır. Caurwelier ve arkadaşları,<sup>116</sup> 155 MRSA suşunda sefoksitin DDT, oksasilin DDT, oksasilin agar tarama ve lateks aglütinasyon testinin duyarlılık ve özgüllüklerini, PZR-mecA altın standart olarak karşılaştırmışlardır. Oksasilin DDT ile sefoksitin DDT sonuçlarını birbirine yakın duyarlılık ve özgüllükte bulmuşlardır. Felten ve arkadaşları<sup>103</sup> MRSA’ların tespitinde sefoksitin ve moksolaktam DDT, Vitek 2 sistemi ve lateks aglütinasyon yöntemlerini karşılaştırmış, DDT’in MRSA’ları tespit etmede en iyi performansa sahip olduğunu rapor etmişlerdir.

*S. aureus* için sefoksitin DDT, CLSI klavuzunda oksasilin ile duyarlılık ve özgüllük yönünden eşdeğer olarak gösterilmektedir. KNS suşlarında ise sefoksitin DDT’nin, oksasilin MİK testlerine göre aynı duyarlılıkta, buna karşın daha yüksek özgüllükte olduğu ifade edilmekte, sefoksitin DDT’nin oksasiline duyarlı suşları tanımlamada oksasilin MİK testinden daha doğru sonuç verdiği bildirilmektedir.<sup>114,117,119,120</sup>

Swenson ve arkadaşları,<sup>114</sup> 62 *S. aureus* ve 53 KNS suşunda sefoksitin DDT’ini PZR yöntemi ile karşılaştırmışlar. Duyarlılık ve özgüllüklerini; *S. aureus* suşları için % 98 ve % 100, KNS suşları için % 99 ve % 96 bulmuşlardır. Bu araştırmacılar bir başka çalışmalarında, 135 *S. aureus* izolatında sefoksitin ve oksasilin testlerini mecA-PZR sonuçları ile karşılaştırmışlardır. Yazarlar sefoksitin test sonuçlarının yüksek duyarlılık

ve özgülüğe sahip olduğunu bildirmişlerdir.<sup>121</sup> Roisin ve arkadaşları,<sup>122</sup> 213 *S. aureus* suşunda Vitek 2, DDT (sefoksitin ve moksalaktam) ve mecA-PZR yöntemini kullanmış, metisilin direncinde otomatize sistem ile DDT yönteminin karşılaştırılmasını amaçlamışlardır. Vitek 2 sistemin ortalama 7 saatte, DDT yöntemlerinin ise 24 saatte metisilin direnç tespiti için yüksek doğruluk değerine sahip olduğu görülmüştür. Boubaker ve arkadaşları,<sup>123</sup> 115 MRSA ve 350 MSSA izolatını test etmişler, sefoksitin disk difüzyon yönteminin özgülüğünü % 100 ve duyarlılığını % 96.5 olarak bulmuşlardır. Sharp ve arkadaşları,<sup>124</sup> Vitek 2 sistemi ile duyarlı ve dirençli bulunan 100'er suş kullanılmış ve uyumsuz sonuçlar mecA analizi yapılarak doğrulanmıştır. Sefoksitin DDT'nin performansının diğer testlere göre daha iyi olduğunu rapor etmişlerdir. Palazzo ve arkadaşları,<sup>125</sup> 58 *S. aureus* ve 58 KNS suşunda oksasilin agar dilüsyon, oksasilin DDT, sefoksitin DDT ve mecA-PZR ile metisilin direncini araştırmışlardır. Rutin laboratuvarlarda DDT yöntemlerinin daha ucuz, duyarlılık ve özgülüğünün yüksek olduğunu göstermişlerdir.

Çalışmamamız da *S.aureus* suşlarında oksasilin DDT, sefoksitin DDT, oksasilin E-test ve tuz agar tarama aynı duyarlılık ve özgülükte bulundu (Tablo 12). KNS suşlarında ise sefoksitin DDT ile belirlenen duyarlılığın ve özgülüğün diğer testlere göre daha yüksek olduğu bulundu (Tablo 13). mecA geni pozitif olan bir *S.aureus* ve iki KNS suşunda sadece sefoksitin DDT dirençli iken, diğer testler duyarlı idi (Tablo 8). mecA geni negatif olan üç KNS suşunda ise uygulanan diğer testler dirençli iken sefoksitin DDT duyarlı bulundu (Tablo 9). Sonuç olarak, metisilin direncini belirlemede *S.aureus* ve KNS'da sefoksitin DDT kullanımının yararlı olduğu ve mecA gen varlığı ile uyumunun daha iyi olduğu belirlendi.

Avrupa'da antibiyotik duyarlılık testleri standartlarını oluşturmuş, ulusal düzeyde altı ayrı kuruluş bulunmaktadır. Bunlar; İngiltere'de BSCA (British Society of Antimicrobial Chemotherapy), Fransa'da CASFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie), Danimarka'da CRG (Commissie Richtlijnen Gevoelighedsbepalingen), Almanya'da DIN (Deutsches Institut für Normung), Norveç'te NWGA (Norwegian Working Group on Antibiotics) ve İsveç'te SRGA (The Swedish Reference Group for Antibiotics)'dir. Bunlar dışındaki Avrupa ülkeleri ve Türkiye, daha çok ABD kaynaklı CLSI tarafından kabul edilen standartları kullanmaktadır.

Görüldüğü üzere, Avrupa ülkelerinin bile kendi aralarında antibiyotik duyarlılık testleri için görüş ayrılıkları bulunmaktadır, öte yandan heterojenite gösteren stafilokoklarda metisilin direncinin fenotipik yöntemlerle gösterilmesi için komitelerin farklı önerilerde bulunması hem laboratuvarları hem de klinisyenleri zor durumda bırakmaktadır.

Günümüzde çoklu direnç gösteren MRS suşlarının artması nedeniyle stafilokok infeksiyonlarının tedavisinde zorluklar yaşanmaktadır. Son 14 yıl içinde bir çok ülkede VISA ve VRSA suşları bildirilmiştir.<sup>6-12</sup> Dirençli suşlarda etkisiz, duyarlı suşlarda gereksiz antibiyotik kullanmamak için bunların antibiyogram sonuçlarını bilmemiz gerekmektedir. Çalışmamızda MRS ve MSS suşlarında bir çok antibiyotik için DDT yapıldı ve duyarlılıkları belirlendi (Tablo 11). Sonuçlar ülkemizde ve bir çok ülkede yapılan çalışmalarla benzerlik gösterdi.<sup>5,37,126-132</sup>

Metisilin direncinin belirlenmesindeki hatalar ciddi klinik sorunlara neden olabilir. Yalancı duyarlı sonuçlar tedavide yetersizliğe ve MRSA suşlarının yayılmasına, yalancı dirençli sonuçlar ise glikopeptidlerin aşırı kullanımı ve gereksiz izolasyon tedbirleri nedeniyle aşırı maliyetle sonuçlanmaktadır. Bu nedenle stafilokoklarda metisilin direncinin doğru tanımlanması gereklidir. mecA geninin belirlenmesi MRS suşlarının ortaya çıkarılmasında en kesin yöntemdir.<sup>82</sup>

Çalışmamızda hem *S. aureus* hem de KNS suşlarında fenotipik yöntemlerin genotipik yöntemle uyumu araştırıldı. Rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarında daha ucuza mal olan ve kolay uygulanabilen oksasilin ve sefoksitin DDT sonuçlarının güvenilirliğinin yüksek olduğu belirlendi. Otomatize sistem de referans test ile uyumlu bulunup, daha kısa sürede sonuç verdi. Fenotipik yöntemlerle değerlendirilemeyen suşlarda mecA gen varlığını göstermek için PZR yöntemi yapılması uygun görüldü. MRS suşlarının beta-laktam antibiyotikler yanında diğer bir çok antibiyotiğe de dirençli olması, metisilin direncinin klinik laboratuvarlarda kısa sürede ve doğru olarak tespit edilmesinin önemini artırmaktadır.

## SONUÇ VE ÖNERİLER

- 1- Çalışmamızda *S. aureus* suşlarında mecA gen varlığı altın standart olarak kabul edildiğinde; oksasilin DDT, oksasilin E-test, sefoksitin DDT ve tuz agar tarama yönteminin duyarlılık ve özgüllükleri aynı olup yalnızca Vitek 2 sisteminde özgüllük aynı iken duyarlılık çok az farkla düşük bulundu. Bu yöntemler referans test ile istatistiksel olarak yüksek uyum gösterdi.
- 2- KNS suşlarında da mecA gen varlığı altın standart olarak kabul edildiğinde oksasilin DDT, oksasilin E-test duyarlılık ve özgüllüğü aynı, sefoksitin DDT duyarlılık ve özgüllüğünün daha yüksek, tuz agar tarama testinin duyarlılığı, Vitek-2 sisteminde özgüllüğü düşük bulundu. Ancak, bu suşlarda da fenotipik yöntemlerin tamamı standart test ile uyumlu izlendi.
- 3- Otomatize sistem ile metisiline dirençli suşların tespitinde; çok küçük bir oranda da olsa mecA geni içermemesi, mecA yönünden yanlış pozitif sonuçlar elde edilebileceğini, ancak farklı direnç mekanizmalarının bu duruma neden olabileceği görüldü.
- 4- Sefoksitin DDT sonuçlarının metisilin direncini göstermedeki üstünlüğü bizim çalışmamızda da izlendi. Hem oksasilin hem sefoksitin diskinin antibiyogram plaklarına beraber konulup farklarının değerlendirilmesinin uygun bir yöntem olabileceği düşünüldü. Yanlış pozitifliğin sefoksitin diskinde daha az olabileceği de göz ardı edilmemelidir.
- 5- Stafilokoklarda heterojen dirençli suşlar nedeniyle metisilin direncinin fenotipik yöntemlerle gösterilmesi sık olmasa da yanlışlıklara neden olmaktadır. Bu sorunun özellikle KNS'larda, *S. aureus*'a göre daha da belirgin olduğu görülmektedir. Fenotipik yöntemlerin çevre şartlarından çok etkilendiği göz önünde tutulmalı ve önerilen standartlar dışında uygulamalardan kaçınılmalıdır.
- 6- Ancak, hem *S. aureus* hem de KNS'larda metisilin direncinin belirlenmesinde altın standart olarak kabul edilen PCR ile mecA geninin saptanması ve bu yönteminin giderek rutin laboratuvarlarda kullanıma girmesidir. Özellikle tedaviye klinik yanıtın olmadığı olgularda ya da direnç sonuçlarının çıkması için 24-48 saat bekleyemeyecek hastalar gibi seçilmiş olgularda moleküler yöntemlerin kullanılması daha hızlı ve doğru bir tercih olabilir.

## KAYNAKLAR

1. **Bannerman TL.** *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In Murray PR., Baron EJ., Jorgensen JH., Tenover FC., Tenover FC., Tenover FC. (Ed.) *Manual of Clinical Microbiology* . 8<sup>th</sup> Ed. Washington: DC, **2003**: 384-404.
2. **Peacock SJ.** *Staphylococcus*. In Borriello SP, Murray PR, Funke G. (Ed). *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 10<sup>th</sup> Ed. Hodder Arnold, London, United Kingdom. **2005**: 771-832.
3. **Shopsin B, Kreiswirth BN.** Molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis*, **2001**; 7:323-326.
4. **Grüneberg RN.** Anti-Gram positive agents: What we have and what we would like. *Drugs* **1997**; 6:29-38.
5. **Şardan YÇ.** Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* infeksiyonlarının epidemiyolojisi ve kontrolü. *Hastane İnfek Derg*, **2000**; 4:205-207.
6. **Ploy M, Grelaud C, Martin C et al.** First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. *Lancet*, **1998**; 351:1212.
7. **Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H et al.** Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet*, **1997**; 350:1670-1673.
8. **Centers for Disease Control and Prevention.** *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin-United States 1997. *MMWR*, **1997**; 46:765-766.
9. **McManus J.** Vancomycin resistant *staphylococcus* reported in Hong Kong. *BMJ*, **1999**; 318:626.
10. **Mi-Na K, Pai CH, Woo JH et al.** Vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* in Korea. *J Clin Microbiol*, **2000**; 38:3879-3881.
11. **Centers for Disease Control and Prevention.** *Staphylococcus* resistant to vancomycin-United States, 2002. *MMWR*, **2002**; 51:565-7.
12. **Centers for Disease Control and Prevention.** Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* Pennsylvania, 2002. *MMWR*, **2002**; 51:902.

13. **The gram-positive cocci:** Part 1: Staphylococci and related organism. In: Alen S, Koneman E, Janda W, Schreckenberger P, Winn W, Woods G, Procop G. Eds. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 5<sup>th</sup> Ed, Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins, **2006**: 539-576.
14. **Kawamura Y, Hou XD, Sultana F et al.** Distribution of *Staphylococcus* species among human clinical specimens and emended description of *Staphylococcus caprae*. *J Clin Microbiol*, **1998**; 36(7):2038-2042.
15. **Proctor RA, Peters G.** Small colony variants in staphylococcal infections: diagnostic and therapeutic implications. *Clin Infect Dis*, **1998**; 27:419-423.
16. **Looney, W. J.** Small colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Br J Biomed Sci*, **2000**; 57:317-322.
17. **Moreillon P, Que Y, Glauser MP.** *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock) In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6<sup>th</sup> Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, **2005**; 2321-2351.
18. **Cengiz AT.** *Staphylococcus*. Ustaçelebi Ş. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabından*. Ankara: Güneş Kitabevi, **1999**: 339-346.
19. **Tünger A.** *Staphylococcus aureus*: Mikrobiyoloji, patogenez ve epidemiyoloji. In: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. *Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları*. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, **2004**; 9-68.
20. **Baba T, Takeuchi F, Kuroda M et al.** Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet*, **2002**; 359: 1819-1827.
21. **Gill SR, Fouts DE, Archer GL et al.** Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain and biofilm-producing methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* strain. *J Bacteriol*, **2005**; 87:2426-2438.
22. **Holden, MT, Feil EJ, Lindsay JA et al.** Complet genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence fort he rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2004**; 101:9786-9791.
23. **Kuroda M, Ohta T, Uchiyama T et al.** Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, **2001**; 357:1225-1240.
24. **Ünal S.** *Staphylococcus aureus*: Direnç mekanizmaları. In: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. *Gram-pozitif bakteri infeksiyonları*. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, **2004**: 23-38.
25. **Lodise TP, McKinnon PS.** Clinical and economic impact of meticillin resistance in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **2005**; 52:113-22.

26. **Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM.** Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev*, **2000**; 13:16-34.
27. **Haddadin AS, Fappiano SA, Lipset PA.** Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the intensive care unit. *Postgrad Med J*, **2002**; 78:385-392.
28. **Dündar V, Dündar DÖ.** Stafilokok Enfeksiyonları. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Ed. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, **2008**; 2065-2077.
29. **Kluytmans J, Van Belkum A, Verbrugh H.** Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology of underlying mechanisms and associated risks. *Clin Microbiol Rev*, **1997**; 10:505-520.
30. **Maltezou H, Giamarellou H.** Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Int J Antimicrob Agents*, **2006**; 27:87-96.
31. **Boyle-Vavra Daum R.S.** Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin. *Lab Invest*, **2007**; 87:3-9.
32. **Martins A, Cunha MLRS.** Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: Epidemiological and molecular aspects. *Microbiol Immunol Rev*, **2007**; 51:787-795.
33. **National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System.** NNSI System Report, data summary from January 1992 through June 2004. *Am J Infect Control*, **2004**; 32:470-485.
34. **Cuevas O, Cercenado E, Vindel A et al.** Evolution of the antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. in Spain. Five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother*, **2004**;48:4240-4245.
35. **Bouza E, San Juan R, Munoz P, Pascau J, Voss A, Desco M.** Cooperative Group of the European Study Group on Nosocomial Infections (ESGNI). A European perspective on intravascular catheter-related infections: report on the microbiology workload, aetiology and antimicrobial susceptibility (ESGNI-005 Study). *Clin Microbiol Infect*, **2004**; 10:838-842.
36. **Derbentli Ş.** Cerrahi infeksiyonlarda dirençli Gram pozitif bakteri sorunu. *ANKEM Derg*, **2004**; 18:215-221.
37. **Derbentli Ş.** Stafilokoklarda antibiyotik direnci: 2003-2004 Türkiye haritası. *ANKEM Derg*, **2005**; 19:54-60.
38. **Archer GL, Climo MW.** *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6<sup>th</sup> Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, **2005**: 2352-2360.

39. **Kloos WE, Bannerman TL.** Update on clinical significance of Coagulase-Negative Staphylococci. *Clin Microbiol Rev*, **1994**; 7: 117-140.
40. **Bilgehan H.** Gram olumlu koklar. *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. İzmir: Fakülteler kitabevi, **2002**; 31: 496-523.
41. **VITEK 2** Product Information bioMérieux. Durham, North Carolina 27704-0969/ USA. <http://www.biomerieux.com>
42. **Rice LB, Sahm D, Bonomo RA.** Mechanism of resistance to antimicrobial agents. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RC. Ed. *Manual of Clinical Microbiology* 8<sup>th</sup> Ed. Washington DC, **2003**: 1074-1101.
43. **Gülay Z.** Antibakteriyel ilaçların etki mekanizmaları. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, **2008**; 227-243.
44. **Gür D.** Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, **2008**: 243-257.
45. **Ayaz C.** Beta laktamların genel özellikleri ve penisilinler. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. , İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, **2008**: 266-278.
46. **Sakarya S.** Sefalosporinler. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, **2008**: 278-288.
47. **Şenol E.** Karbapenemler ve Monobaktamlar. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul; **2008**: 288-294.
48. **Topçu AW.** Aminoglikozidler. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, **2008**: 294-303.
49. **Tünger Ö.** Makrolidler, ketolitler, linkozamitler. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, **2008**: 313-326.
50. **Aksu HSZ, Candevir A.** Sulfonamidler, Trimetoprim ve Trimetoprim-Sulfametoksazol. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, **2008**: 368-372.
51. **Topçu AW, Koç MM.** Kinolonlar. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, **2008**: 341-355.
52. **Mutlu B.** Kloramfenikol. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, **2008**: 303-308.

53. **Çokça F.** Tetrasiklinler. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, **2008**: 308-313.
54. **Erol S.** Rifamisinler. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, **2008**: 372-376.
55. **Gündeş SG.** Fusidik asit. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008: 358-362.
56. **Arman D.** Glikopeptidler, streptograminler ve lipopeptidler. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008: 326-337.
57. **Usluer G.** Oksazolidinonlar. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, **2008**: 337-341.
58. **Felek S.** Mupirosin. In: Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S. *Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler*. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2003: 427-430.
59. **Hiramatsu K, Katayama Y, Yuzawa H et al.** Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*, **2002**; 292:67-74.
60. **Ito T, Okuma K, Ma XX et al.** Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resist Update*, **2003**; 6:41-52.
61. **Chambers HF.** Methicillin resistance in staphylococci: Molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*, **1997**; 10:781-91.
62. **Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, et all.** Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, **2001**; 357:1225-1240.
63. **Ünal S.** *Staphylococcus aureus*: Direnç mekanizmaları. In: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. *Gram-pozitif bakteri infeksiyonları*. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, **2004**: 23-38.
64. **Hanssen AM, Ericson Sollid JU.** SCCmec in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol*, **2006**; 46:(1):8-20.
65. **Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T.** The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol*, **2001**; 9:486-93.
66. **Martins A, Cunha MRS.** Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. *Microbiol Immunol*, **2007**; 51(9):787-795.

67. **Zhang K, McClure JA, Elsayed S et al.** Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome mec types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, **2005**; 43:5026-5033.
68. **Ito T, Katayama Y, Asada K et al.** Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome in methicillin resistant *Staphylococcus*. *Antimicrob Agents Chemother*, **2001**; 45:1323-1336.
69. **Ma XX, Ito T, Tiensasitorn C et al.** Novel type of staphylococcal cassette chromosome mec identified in community-acquired methicillin –resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother*, **2002**; 46:1147-1152.
70. **Ito T, Ma XX, Takeuchi F et al.** Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, ccrC. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004; 48:2637-2651.
71. **Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K.** Cloning and nucleotide sequence determination of the entire mec DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother*, **1999**; 43:1449-1458.
72. **François P, Renzi G, Pittet D et al.** A novel multiplex real-time PCR assay for rapid typing of major staphylococcal cassette chromosome mec elements. *J Clin Microbiol*, **2004**; 42:3309-12.
73. **Bachi BB, Rohrer S.** Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Arch Microbiol*, **2002**;178:165-171.
74. **Turnidge JD, Ferraro MJ, Jorgensen JH.** Susceptibility testing methods: General considerations. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (Eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 8th Ed. Washington DC: ASM Pres, **2003**: 1102-1107.
75. **Jorgense J.H, Turnidge J.D.** Susceptibility testing methods: Dilution and disk diffusion methods. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (Eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 8th Ed. Washington DC: ASM Pres, **2003**: 1108-27.
76. **CLSI.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement. CLSI Document M100-S19 Pennsylvania, **2009**; 29:52-59.
77. **CLSI.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Informational Supplement. CLSI Document M100-S18 Pennsylvania, **2008**; 28:110-114.
78. **Nolte FS, Caliendo AM.** Molecular detection and identification of microorganisms. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (Eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 8th Ed. Washington DC: ASM, **2003**; 234-256.
79. **Köksal F.** Nükleik asit çoğaltma yöntemleri. Durmaz R (Ed). *Uygulamalı moleküler mikrobiyoloji*, **2001**: 15-34.

80. **Durmaz R.** Polimeraz zincir reaksiyonunun tipleri. Durmaz R (Ed). *Uygulamalı moleküler mikrobiyoloji*, **2001**: 35-43.
81. **Rasheed JK, Tenover FC.** Detection and characterization of antimicrobial resistance genes in bacteria. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. (Ed.) *Manual of Clinical Microbiology* 8<sup>th</sup> Ed. Washington DC, **2003**; 1196-1212.
82. **Cavassini M, Wenger A, Jaton K et al.** Evaluation of MRSA-screen, a simple anti-PBP2a slide latex agglutination kit, for rapid detection of methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, **1999**; 37:1591-1594.
83. **Hussain Z, Stoakes L, Garrow S et al.** Rapid detection of mecA-positive and mecA negative coagulase negative staphylococci by an anti-penicillin binding protein 2a slide latex agglutination test. *J Clin Microbiol*, **2000**; 38:2051-2054.
84. **Gradelski E, Valera L, Aleksunes L et al.** Correlation between genotype and phenotypic categorization of staphylococci based on methicillin susceptibility and resistance. *J Clin Microbiol*, **2001**; 39:2961-2963.
85. **Tenover FC, Jones RN, Swenson JM et al.** Methods for improved detection of oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci: Result of multicenter study. *J Clin Microbiol*, **1999**; 37:4051-4058.
86. **Roisin S, Nonhoff C, Denis O et al.** Evaluation of new Vitek 2 card and disk diffusion method for determining susceptibility of *Staphylococcus aureus* to oxacillin. *J Clin Microbiol*, **2008**; 46:2525-2528.
87. **Horstkotte MA, Knobloch JKM, Rohde H et al.** Rapid detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci with the Vitek 2 system. *J Clin Microbiol*, **2002**; 40:3291-3295.
88. **Brown DFJ, Edwards DI, Hawkey PM et al.** Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Antimicrob Chemother*, **2005**; 56:1000-1018.
89. **Frebourg NB, Nouet D, Lemee L et al.** Comparison of ATB Staph, Rapid ATB Staph, Vitek and E-test methods for detection of oxacillin heteroresistance in staphylococci possessing mecA. *J Clin Microbiol*, **1998**; 36:52-57.
90. **Murakami K, Minamide W, Wada K et al.** Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*, **1991**; 29:2240-2244.

91. **Predari SC, Ligozzi M, Fontana R.** Genotypic identification of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci by polymerase chain reaction. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35:2568-2573.
92. **Shresta NK, Tuohy MJ, Hall GS et al.** Rapid identification of *Staphylococcus aureus* and the *mecA* gene from BacT/ALERT blood culture bottles by using the LightCycler system. *J Clin Microbiol*, **2002**; 40:2559-256.
93. **Goffinet P, Louahabi A, Hougardy N.** Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from clinical specimen by real-time polymerase chain reaction. *ESCMID*, **2005**: 1134.
94. **Ruiz-Perez de Pipaon M, Torres-Sanchez MJ, Arroyo-Pedrero LA et al.** Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* spp. from positive blood culture bottles using the *mecA* and *nucA* genes with the LightCycler system. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, **2005**; 23:208-212.
95. **Swenson JM, Williams PP, Killgore G et al.** Performance of eight methods, including two new rapid methods, for detection of oxacillin resistance in a challenge set of *Staphylococcus aureus* organism. *J Clin Microbiol*, **2001**; 39:3785-3788.
96. **Sünbül M, Furtun F, Esen Ş ve ark.** Hastane enfeksiyonlarında izole edilen stafilocok suşlarında oksasilin direncinin dört ayrı yöntem ile araştırılması. *Mikrobiyol Bült*, **2000**; 34:215-221.
97. **Kuzucu Ç, Dalgalar M, Durmaz R ve ark.** Stafilocoklarda metisilin direncinin saptanmasında kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bült*, **2002**; 36:253-257.
98. **Sancak B, Ercis S, Haşçelik G.** Stafilocoklarda metisilin direncinin saptanmasında disk difüzyon yönteminin değeri ve polimeraz zincir reaksiyonu ile karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bült*, **2003**; 37:109-115.
99. **Razlighi RA, Derbentli Ş.** *Staphylococcus aureus* suşlarındaki metisilin direncinin belirlenmesinde mikrodilüsyon, disk difüzyon ve agar tarama yöntemlerinin karşılaştırılması. *Ankem Derg*, **1994**; 8:62-68.
100. **York MK, Gibbs L, Chehab F et al.** Comparison of polymerase chain reaction detection of *mecA* with standard susceptibility testing methods to determine methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol*, **1996**; 34:249-253.
101. **Oğuz VA, Dodanlı S, Yıldırım İ ve ark.** Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) pevalansının farklı yöntemlerle araştırılması. *Flora Derg*, **2001**; 6(3): 178-183.
102. **Kolbert CP, Arruda J, Varda-Delmore P et al.** Branched-DNA assay for detection of the *mecA* gene in oxacillin-resistant and oxacillin-sensitive staphylococci. *J Clin Microbiol*, **1998**; 36:2640-2644.

103. **Felten A, Grandy B, Lagrange PH et al.** Evaluation of three techniques for detection of low level methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. *J Clin Microbiol*, **2002**; 40:2766-2771.
104. **Swenson JA, Spargon J, Tenover FC et al.** Optimal inoculation methods and quality control for the NCCLS oxacillin agar screen test for detection of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, **2001**; 39:3781-3784.
105. **Swenson JM.** New tests for the detection of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol News*, **2002**; 24:159-163.
106. **Kohner P, Uhl J, Kolbert C et al.** Comparison of susceptibility testing methods with *mecA* gene analysis for determining oxacillin (methicillin) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol*, **1999**; 37: 2952-2962.
107. **Sakoulas G, Gold HS, Venkataraman L et al.** Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: Comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA* positive susceptible strains. *J Clin Microbiol*, **2001**; 39:3946-3951.
108. **Atay T, Gülay Z, Kocagöz S, Yuluğ N.** *Staphylococcus aureus* izolatlarının metisilin direncinin saptanmasında rutin duyarlılık testleri ve *mecA* gen analizi sonuçlarının karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bült*, **2002**; 36:133-140.
109. **Yamazumi T, Marshall SA, Wilke WW et al.** Comparison of the Vitek Gram-positive susceptibility 106 card and the MRSA-screen latex agglutination test for determining oxacillin resistance in clinical bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, **2001**; 39:53-56.
110. **Atay T, Gülay Z.** Comparison of PBP2a latex agglutination test with disk diffusion, *mecA* PCR and Vitek for the detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Ankem Derg*, **2004**; 18:205-208.
111. **Horstkotte MA, Knobloch JKM, Rodhe H et al.** Rapid detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci with the Vitek 2 system. *J Clin Microbiol*, **2002**; 40:3291-3295.
112. **Ferreira RBR, Iorio NLP, Malvar KL et al.** Coagulase-negative staphylococci: Comparison of phenotypic and genotypic oxacillin susceptibility tests and evaluation of the agar screening test by using different concentrations of oxacillin. *Clin Microbiol*, **2003**; 41:3609-3614.
113. **Tveten Y, Jenkins A, Digranes A et al.** Comparison of PCR detection of *mecA* with agar dilution and E-test for clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Infect*, **2004**; 10:459-470.
114. **Swenson JM, Tenover FC.** Result of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol*, **2005**; 43:3818-3823.

115. **Boutiba-Ben Boubaker I, Abes RB, Abdallah HB et al.** Evaluation of cefoxitin disk diffusion test for the routine detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect*, **2004**; 10:762-765.
116. **Cauwelier B, Gordts B, Descheemaeker P et al.** Evaluation of disk diffusion method with cefoxitin (30 microg) for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **2004**; 23:867-868.
117. **NCCLS (CLSI).** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI Document M100-S15 Pennsylvania: CLSI, **2005**.
118. **Telli M, Sümerkan B, Eşel D.** *Staphylococcus aureus*'ta metisilin direncinin belirlenmesinde sefoksitin disk, oksasilin disk, oksasilin agar tarama ve PBP2a lateks testlerinin karşılaştırılması. *İnfekDerg*, **2006**; 20:93-96.
119. **Sharp SE, Warren JA, Thomson RB Jr.** Cefoxitin disk diffusion screen for confirmation of oxacillin-resistant in *Staphylococcus aureus* isolates and utility in the clinical laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **2005**; 51:69-71.
120. **Frigatto EAM, Machado AMO, Pignatari ACC et al.** Is the cefoxitin disk test reliable enough to detect oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci? *J Clin Microbiol*, **2005**; 43:2028-2029.
121. **Swenson JM, Lonsway D, McAllister S et al.** Detection of mecA-mediated resistance using reference and commercial testing methods in a collection of *Staphylococcus aureus* expressing borderline oxacillin MICs. *Diagn Microbiol and Infect Dis*, **2007**; 58:33-39.
122. **Roisin S, Nonhoff C, Denis O et al.** Evaluation of new Vitek 2 card and disk diffusion method for determining susceptibility of *Staphylococcus aureus* to oxacillin. *J Clin Microbiol*, **2008**; 46: 2525-2028.
123. **Boubaker IBB, Abes RB, Abdallah HB et al.** Evaluation of cefoxitin disk diffusion test for the routine detecting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect*, **2004**; 10:762-765.
124. **Sharp SE, Warren JA, Thomson RB Jr.** Cefoxitin disk diffusion screen for confirmation of oxacillin-resistant in *Staphylococcus aureus* isolates and utility in the clinical laboratory. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **2005**; 51:69-71.
125. **Palazzo ICV, Rehder A, Darini ALC.** Quantitative disk diffusion as a convenient method for determining minimum inhibitory concentrations of oxacillin for staphylococci strains. *J Microbiol Methods*, **2007**; 71:186-190.
126. **Arıdoğan A, Atasever L, Bal Ç.** Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotiklere dirençleri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, **2004**; 34:20-23.

127. **Baysal B, Tuncer İ, Erayman B ve ark.** Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının fusidik asit ve bazı antibiyotiklere duyarlılıkları. *İnfeksiyon Derg*, **2003**; 17:27-30.
128. **Şengöz G, Yıldırım F, Yaşar KK ve ark.** Stafilokok suşlarının fusidik asit ve çeşitli antibiyotiklere direnci. *Ankem Derg*, **2004**; 18:105-108.
129. **Oğuz VA, Yapar N, Sezak N ve ark.** The rate of inducible clindamycin resistance and susceptibilities to other antimicrobial agents in staphylococci. *Mikrobiyol Bul*, **2009**; 43:37-44.
130. **Cuevas O, Cercenado E, Goyanes MJ et al.** *Staphylococcus* spp. in Spain: present situation and evolution of antimicrobial resistance (1986-2006). *Enferm Infec Microbiol Clin*, **2008**; 26:269-77.
131. **Schito GC, Auckenthaler R, Marchese A et al.** European survey of glycopeptide susceptibility in *Staphylococcus* spp. *Clin Microbiol Infect*, **1999**; 5:547-553.
132. **Hua CZ, Li JP, Yu HM et al.** Drug-resistance of *Staphylococcus aureus* and detection of *mecA* gene in all strains isolated from children in Hangzhou. *Zhonghua Er Ke Za Zhi*, **2006**; 44:360-363.

## ÖZGEÇMİŞ

- Adı Soyadı** : Aygöl TURAÇ BİÇER
- Doğum Tarihi ve Yeri** : 15.10.1971- Malatya
- Medeni Durumu** : Evli
- Adres** : Mahfesiğmaz M. 20 S. N. Karlıdağ Apt. 6/17  
Çukurova / Adana
- Telefon** : 05423764878
- E-posta** : [aygulbicer@yahoo.com](mailto:aygulbicer@yahoo.com).
- Mezun Olduğu Tıp Fakültesi ve Yılı** : Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi-1994
- Görev Yerleri** : Malatya Battalgazi S.O.  
: Silifke Merkez II Nolu S.O.  
: Adana Yenibey S.O.
- Dernek Üyelikleri** : Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Derneği  
Türk İmmünoloji Derneği
- Yabancı Dil** : İngilizce