

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**SANTRAL VENÖZ KATETERLERDEN İZOLE EDİLEN
KOAGÜLAZ NEGATİF STAFİLOKOKLARIN ANTİMİKROBİYAL
DİRENÇ PROFİLLERİ VE BİYOFİLM OLUŞTURMA
ÖZELLİKLERİNİN KONVANSİYONEL VE MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Dr. Duygu ÖCAL

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. İştar DOLAPÇI

ANKARA

2015

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**SANTRAL VENÖZ KATETERLERDEN İZOLE EDİLEN
KOAGÜLAZ NEGATİF STAFİLOKOKLARIN ANTİMİKROBİYAL
DİRENÇ PROFİLLERİ VE BİYOFİLM OLUŞTURMA
ÖZELLİKLERİNİN KONVANSİYONEL VE MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Dr.Duygu ÖCAL

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. İştar DOLAPÇI

Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından
13L3330001 proje numarası ile desteklenmiştir

ANKARA- 2015

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN		
Adı, Soyadı	: Dr. Duygu ÖCAL	Sınav tarihi: 26 / 06 / 2015
Anabilim/Bilim Dalı	: Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	
Tez Danışmanı	: Prof. Dr. G. İftar DOLAPÇI	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Tezin Başlığı: <i>Santral venöz kateterlerden izole edilen koagülaz negatif stafilokokların antimikrobiyal direnç profilleri ve biyofilm oluşturma özelliklerinin konvansiyonel ve moleküler yöntemlerle araştırılması başlıklı, Dr. Duygu Öcal'a ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.</i>	
Tezin Niteliği:	☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi ☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi
Kaçıncı tez sınavı olduğu:	☐ 1 ☒ 2 ☐ 3

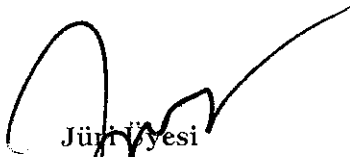
III. KARAR	
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak	
☒ Kabulüne	
☐ Reddine	
☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine	
☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

IV. AÇIKLAMALAR	
Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız	


Jüri Başkanı

Prof. Dr. Mehmet KIYAN
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı


/Jüri Üyesi
Prof. Dr. G. İftar DOLAPÇI
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Tez Danışmanı


Jüri Üyesi
Prof. Dr. J. Sedef GÖÇMEN
Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Üye

ÖNSÖZ

Klinik olarak kateter ilişkili enfeksiyonlar saptandığı durumlarda, hayatı tehdit edici boyutlara ulaşabilmesi nedeniyle, acil müdahale gerekmekte ve derhal ampirik tedaviye başlanmaktadır. Çalışmamızda birinci aşamada katetere bağlı kan dolaşım enfeksiyonu etkeni olan ya da kolonizan olarak saptanan koagülaz negatif stafilokokların antimikrobiyal direnç profilleri ve biyofilm oluşturma özellikleri araştırılmıştır. İkinci aşama olarak, vankomisin biyofilm üzerine etki eden konsantrasyonları saptanarak, ampirik tedavide seçilecek ilaçlar ve doz ayarları için yol gösterici bulgulara ulaşılması hedeflenmiştir.

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tez çalışmamın her aşamasında tüm bilgi ve desteğini veren, yardımları ile her zaman desteğini hissettiğim, çağdaş dünya görüşü, etik çalışma anlayışı ve bilimsel kimliği ile hekimlik hayatımın akışında belirleyici olan değerli hocam Prof. Dr. İştar Dolapçı'ya,

Tıbbi Mikrobiyoloji Uzmanlık eğitimim boyunca bilgisini, desteğini ve anlayışını esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Mehmet Kıyan'a,

Tez çalışmalarına önemli katkıları olan, bilimsel desteğine her zaman ulaşmama olanak sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Alper Tekeli'ye,

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgisini ve anlayışını benden esirgemeyen Prof. Dr. Murat Özsan, Prof. Dr. Murat Aksoy, Prof. Dr. Aydın Karaarslan, Prof. Dr. Devran Gerçeker, Prof. Dr. Zeynep Ceren Karahan, Prof. Dr. Fikret Şahin, Doç. Dr. Ebru Us ve Doç. Dr. Gülay Akarsu'ya,

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalışmaktan zevk aldığım, benden desteklerini esirgemeyen Dr. Büşra Betül Özmen Çapın, Dr. Buse Türegün Atasoy ve Anabilim Dalı'nda görevli asistan arkadaşlarım ve personeline,

Yaşamım süresince her zaman destek ve sevgilerini hep yanımda hissettiğim, büyük özverilerle beni yetiştiren, bu günümü borçlu olduğum saygıdeğer anneme ve babama, bu zorlu yolda daima yanımda olan eşim Anıl Öcal ve minik kızıma,

Dr. Duygu ÖCAL

Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 13L3330001 proje numarası ile desteklenmiştir

ANKARA- 2015

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kateterler ve Kateter İlişkili Enfeksiyonlar	4
2.1.1. Kateter İle İlişkili Enfeksiyonların Tanımları	6
2.1.2. Kateter Tipleri ve Özellikleri	8
2.1.4. Kateter İlişkili Enfeksiyonlarda Etiyoloji	10
2.1.5. Koagülaz Negatif Stafilokokların Etken Olduğu Kateter İlişkili Enfeksiyonların Tedavisi	13
2.2. Biyofilm	14
2.2.1. Biyofilm Tarihçesi	14
2.2.2. Biyofilm Oluşumu	14
2.2.3. Biyofilmin Yapısı ve Önemi	16
2.2.4. Bakteriler Neden Biyofilm Oluşturur?	18
2.2.5. Biyofilm Oluşumunun Gösterilmesi	19
2.2.5.1. Boyama Yöntemleri	19
2.2.5.2. Metabolik Yöntemler	20
2.2.5.3. Moleküler Yöntemler	21
2.2.5.4. Fiziksel Yöntemler	22
2.2.6. Slime Faktör Oluşumunun Gösterilmesi	24
2.2.6.1. Christensen Yöntemi (Kalitatif Tüp Testi)	24
2.2.6.2. Kongo Red Agar Yöntemi	24
2.2.7. Biyofilm Oluşturma Modelleri	24
2.2.8. Biyofilm Oluşumu ile <i>icaADBC</i> Operonu ve IS256 Arasındaki İlişki	25
2.2.9. Biyofilmin Antimikrobiyal Dirence Etkisi ve Tedavisi	26
2.3. Stafilokoklarda Metisilin Direnç Mekanizmaları	27

2.3.1. Metisilin Direncinin Tespiti	32
2.4. Epidemiyolojik Tiplendirme Yöntemleri.....	34
2.4.1. Moleküler Yöntemler	35
2.4.1.1. Değişken Alanlı Jel Elektroforezi (Pulsed Field Gel Electrophoresis- PFGE).....	35
3. GEREÇ ve YÖNTEM	39
3.1. Bakteri İzolatlarının Elde Edilmesi.....	39
3.1.1. Santral Venöz Kateter Örneklerinden Bakteri İzolasyonu	40
3.1.1.1. Semikantitatif (Maki) Kültür Yöntemi	40
3.1.1.2. Tam Kantitatif Kültür Yöntemi	40
3.1.2. Kan Kültürlerinden Bakteri İzolasyonu	41
3.1.3. Sağlıklı Kontrollerin Cilt Floralarından Bakteri İzolasyonu.....	41
3.1.4. Sağlıklı Kontrollerin Burun Boşluklarından Bakteri İzolasyonu.....	42
3.1.5. Kateter İlişkili Kan Dolaşım Enfeksiyonları Etkenlerinin Belirlenmesi.....	42
3.2. İzolatların Tiplendirimi	42
3.3. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri	44
3.3.1. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi	44
3.3.1.1. Gereçler	44
3.3.1.2. Yöntem	45
3.3.2. Çift Disk Testi (D test).....	46
3.3.2.1. Gereç.....	46
3.3.2.1.1. Besiyerleri ve Besiyerlerinin Hazırlanması	46
3.3.2.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler	47
3.3.2.1.3. Araçlar	47
3.3.2.2. Yöntem	47
3.3.3. Vankomisin için Mikrodilüsyon Yöntemi İle Minimum İnhibitör Konsantrasyonun Tespit Edilmesi.....	48
3.3.3.1. Gereç.....	48
3.3.3.2. Yöntem	49
3.4. Koagülaz Negatif Stafilokok Suşlarından DNA Eldesi	51
3.4.1. Gereç	51
3.4.1.1. Besiyerleri.....	51
3.4.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler	52

3.4.1.3. Kullanılan Solüsyonlar	52
3.4.1.4. Araçlar	52
3.4.2. Yöntem	52
3.5. PZR Yöntemi ile <i>mecA</i> Geni Varlığının Araştırılması	53
3.5.1. Gereç	53
3.5.1.1. Sarf Malzemeleri	53
3.5.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler	53
3.5.1.3 Araçlar	53
3.5.2. Yöntem	54
3.5.2.1. PZR yöntemi	54
3.5.2.2. Agaroz Jel Hazırlanması ve PZR Ürününün Agaroz Jel Elektroforezinde Saptanması	55
3. 6. <i>mecA</i> Pozitif Olan Suşlara Stafilokokkal Kaset Kromozom (Staphylococcal Casette Chromosome-SCC) <i>mec</i> Tiplendiriminin Yapılması	56
3.6.1. Gereç	56
3.6.1.1. Sarf Malzemeleri	56
3.6.1.2. Kimyasal Malzemeler	56
3.6.1.3. Araçlar	56
3.6.2. Yöntem	57
3.6.2.1. PZR Yöntemi	57
3.6.2.2. Agaroz Jel Hazırlanması ve PZR Ürününün Agaroz Jel Elektroforezinde Saptanması	59
3.7. Biyofilm Deneyleri	59
3.7.1. Mikroplak Yöntemi ile Biyofilm Oluşumunun Kantitatif Olarak Değerlendirilmesi	59
3.7.1.1. Gereç	59
3.7.1.2. Yöntem	60
3.7.2. Kongo Red Agar Metodu ile Slime Faktörü Oluşumunun Fenotipik Olarak Gösterilmesi	61
3.7.2.1. Gereç	61
3.7.2.2. Yöntem	62
3.7.3. Biyofilm Genlerinin Varlığına Bakılması	63
3.7.3.1. Gereç	63
3.7.3.2. Yöntem	65

3.8. Minimum Biyofilm Eradike Edici Konsantrasyon Değerinin Belirlenmesi Deneyi	67
3.8.1. Gereç	67
3.8.1.1. Kimyasal Madde ve Malzemeler	67
3.8.1.2. Araçlar	68
3.8.2. Yöntem	68
3.9. Değişken Alanlı Jel Elektroforezi (Pulsed Field Gel Electrophoresis-PFGE)	69
3.9.1. Gereç	69
3.9.1.1. Sarf Malzemeleri ve Kimyasal Malzemeler	69
3.9.1.2. Kullanılacak Solüsyonlar	70
3.9.1.3. Araçlar	71
3.9.2. Yöntem	72
3.9.2.1. PFGE Yönteminde Kullanılacak İzolatların Hazırlanması	72
3.9.2.2. İzolatların Agaroza Gömülmesi	72
3.9.2.3. Agar İçerisindeki Hücrelerin Parçalanması	73
3.9.2.4. Agaroz Kalıpların Yıkanması	73
3.9.2.5. DNA'nın Restriksiyon Enzimiyle Kesilmesi	74
3.9.2.6. Elektroforez Jelinin Hazırlanması	74
3.9.2.7. Elektroforez Sistemi	75
3.9.2.8. Jelin Boyanması	76
3.9.2.9. Sonuçların Değerlendirilmesi	76
3.10. Verilerin Analizi ve İstatistiksel Değerlendirme	76
4. BULGULAR	78
4.1. Koagülaz Negatif Stafilokok Suşları ve Sayıları	78
4.2. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri	82
4.2.1. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi Sonuçları	82
4.2.2. Vankomisin için Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun Değerlendirilmesi	86
4.3. <i>mecA</i> Geni Varlığına Bakılması	89
4.4. <i>mecA</i> Pozitif Olan Suşlara SCC <i>mec</i> Tiplendiriminin Yapılması	93
4.5. Biyofilm Deneylerinin Sonuçları	98
4.5.1. Mikroplak Yöntemi ile Biyofilm Oluşumunun Kantitatif Olarak Değerlendirilmesi	98
4.5.2. Kongo Red Agar Yöntemi ile Slime Faktörü Oluşumunun Fenotipik Olarak Gösterilmesi	101

4.5.3. Biyofilm Genlerinin Saptanması ve Değerlendirilmesi	105
4.6. Minimum Biyofilm Eradike Edici Konsantrasyon Değerleri	112
4.7. Değişken Alanlı Jel Elektroforezi (Pulsed Field Gel Electrophoresis-PFGE) Sonuçları	116
5. TARTIŞMA.....	120
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	136
ÖZET	143
SUMMARY	147
KAYNAKLAR.....	151

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMC	Amoksisilin klavulonat
bç	Baz çifti
CDC	Centers for Disease Control (Hastalık Kontrol Merkezi)
CIP	Siprofloksasin
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü)
CZ	Sefazolin
DA	Klindamisin
DDT	Disk Difüzyon Testi
dk	Dakika
E	Eritromisin
EDTA	Etilendiamintetraasetat
EMB	Eosin Metilen Blue
FOX	Sefoksitin
g	Gram
GN	Gentamisin
IS256	İnseriyon Sekansı 256
ica	İntersellüler Adezin
kb	Kilobaz
KDE	Kan Dolaşım Enfeksiyonu
KİKDE	Kateter İlişkili Kan Dolaşım Enfeksiyonu
KKA	Koyun Kanlı Agar
KNS	Koagülaz Negatif Stafilokok
kob	Koloni Oluşturan Birim
kob/ml	Koloni Oluşturan Birim/mililitre
KRA	Kongo Red Agar
LİN	Linezolid
LMPA	Low Melting Point Agarose (Düşük erime ısılı agaroz)
M	Molar
MBEK	Minimum Biyofilm Eradike Edici Konsantrasyon
MHA	Mueller Hinton Agar

MHB II	Mueller Hinton Broth II
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
ml	Mililitre
MLST	Çoklu Lokus Dizilim Tiplendirmesi (Multi-Locus Sequence Typing)
mm	Milimetre
mM	Milimolar
MRKNS	Metisilin Dirençli Koagülaz Negatif Stafilokok
MRSA	Metisilin Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MSKNS	Metisilin Duyarlı Koagülaz Negatif Stafilokok
MSSA	Metisilin Duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
nm	Nanometre
NNIS	National Nosocomial Infections Surveillance
PBP	Penisilin Bağlayıcı protein (PBP)
PBP2a	Penisilin Bağlayıcı protein (PBP)2a
PBS	Tamponlu Tuz Çözeltisi (Phosphate Buffered Saline - PBS)
PFGE	Değişken Alanlı Jel Elektroforezi (Pulsed Field Gel Electrophoresis-PFGE)
PiA	Polysccharide Intercellular Adhesion (Polisakkarit İntersellüler Adezin)
PiA-PNSG	Polysccharide Intercellular Adhesion (Polisakkarit İntersellüler Adezin) Poli-N-süksinil-β-1–6 glikozamin
pmol	Pikomol
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpm	Rotation Per Minute (dakikadaki devir sayısı)
SDA	Saboraud Dekstroz Agar
sn	Saniye
SVK	Santral Venöz Kateter
SXT	Trimetoprim-sülfametoksazol
TBE	Tris-borik asit-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEC	Teikoplanin
TET	Tetrasiklin

Tris	Tris (hidroksimetil) aminometan
TSB	Triptik Soy Buyyon
UPGMA	Aritmetik ortalamalı ağırlıksız çift grup yöntemi (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean)
UV	Ultraviyole
V	Volt
V/cm	Volt/santimetre
VA	Vankomisin
YBÜ	Yoğun Bakım Ünitesi
µl	Mikrolitre
µm	Mikrometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Biyofilm oluşumunun gösterilmesi (Watnick ve Kolter, 2000).....	16
Şekil 3. 1. Çalışmaya alınan KNS sayılarının yüzde olarak örneklerle dağılımı.....	40
Şekil 3. 2. Periferik kan kültürlerinden izole edilen KNS'lerin bölümlere göre dağılımı ...	41
Şekil 3. 3. U tabanlı mikropalak kuyucuklarındaki ilaç miktarları, üreme kontrol ve sterilite kontrol kuyucuklarının şematik olarak gösterilmesi.....	50
Şekil 4. 1. KNS izolatlarının türlere göre dağılımı.....	78
Şekil 4. 2. KİKDE etkenlerinin izole edildikleri kliniklere göre dağılımları.....	80
Şekil 4. 3. SVK'sı olmayan hastaların periferik kan kültürlerinden izole edilen KNS suşlarının bölümlere göre dağılımı	81
Şekil 4. 4. SVK'sı olmayan hastaların periferik kan kültürlerinden izole edilen KNS suşlarının türlere göre dağılımı.....	81
Şekil 4. 5. Kateter kolonizasyonu etkeni olan KNS suşlarının izole edildikleri kliniklere göre dağılımları.....	82
Şekil 4. 6. <i>S. epidermidis</i> 'in antimikrobiyallere karşı direnç oranları.....	84
Şekil 4. 7. <i>S. haemolyticus</i> 'un antimikrobiyallere karşı direnç oranları.....	84
Şekil 4. 8. <i>S. hominis</i> 'in antimikrobiyallere karşı direnç oranları.....	85
Şekil 4. 9. <i>S. capitis</i> 'in antimikrobiyallere karşı direnç oranları.....	85
Şekil 4. 10. <i>S. warnerii</i> 'nin antimikrobiyallere karşı direnç oranları.....	86
Şekil 4. 11. Diğer KNS'lerin antimikrobiyallere karşı direnç oranları.....	86
Şekil 4. 12. Vankomisin MİK değerlerinin suşlara göre dağılım aralıkları (µg/ml).....	87
Şekil 4. 13. Sıvı Mikrodilüsyon yöntemi ile suşların vankomisin MİK değerlerinin belirlenmesi.....	88
Şekil 4. 14. Suşların <i>mecA</i> direnç geni varlığı ve Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle saptanan metisilin direnç durumlarının karşılaştırılması.....	90
Şekil 4. 15. Suşlarda <i>mecA</i> geni varlığının PZR yöntemiyle gösterilmesi.....	90
Şekil 4. 16. M-PZR 1 ve M-PZR 2 uygulanan suş sayıları.....	94
Şekil 4. 17. SCC <i>mec</i> M-PZR 1 ile tiplendirim sonucunda saptanan SCC <i>mec</i> tip I, tip II, tip V ve tip VI KNS örnekleri.....	95
Şekil 4. 18. SCC <i>mec</i> M-PZR 1 ile tiplendirim sonucunda saptanan SCC <i>mec</i> tip V, tip III, tip III + tip VI KNS örnekleri.....	96
Şekil 4. 19. SCC <i>mec</i> M-PZR 2 ile tiplendirim sonucunda saptanan SCC <i>mec</i> tip I, tip II ve tip V KNS örnekleri.....	97

Şekil 4. 20. Mikroplak yöntemi ile biyofilm oluşumunun kantitatif olarak hesaplanması..	98
Şekil 4. 21. Düz tabanlı 96 kuyucuklu mikroplaklarda oluşturulan 24 saatlik biyofilmlerin spektrofotometrede değerlendirme aşamasından önce makroskobik görünümü	100
Şekil 4. 22. Slime faktörünün fenotipik olarak KRA'da gösterilmesi	102
Şekil 4. 23. KRA'da slime faktörü oluşturan suşların türlere göre dağılımı.....	103
Şekil 4. 24. <i>icaA</i> lokusuna ait PZR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüleri	108
Şekil 4. 25. <i>icaD</i> lokusuna ait PZR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ...	109
Şekil 4. 26. IS256'ya ait PZR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi.....	110
Şekil 4. 27. Biyofilm oluşturan suşların vankomisin için MBEK/MİK oranları	116
Şekil 4. 28. <i>S.epidermidis</i> suşlarının PFGE dendogramları.....	118
Şekil 4. 29. <i>S.haemolyticus</i> suşlarının PFGE dendogramları.....	118
Şekil 4. 30. <i>S.hominis</i> suşlarının PFGE dendogramları.....	119

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3. 1. Çalışmaya alınan suşların örneklerle göre dağılımı.....	39
Tablo 3. 2. Kirby-Bauer Disk Difüzyon yönteminde kullanılan antibiyotiklerin KNS'ler için duyarlılık zon çapları (CLSI, 2014).....	46
Tablo 3. 3. KNS'lerde vankomisin için MİK Değerleri (CLSI, 2014).....	51
Tablo 3. 4. <i>mecA</i> geninin saptanması amacıyla kullanılan primer dizileri	54
Tablo 3. 5. SCC <i>mec</i> moleküler tiplendiriminde kullanılan primerler	58
Tablo 3. 6. SCC <i>mec</i> tiplendirilmesi için kullanılan PZR döngüleri	59
Tablo 3. 7. Biyofilm genlerinin saptanmasında kullanılan primer listesi	67
Tablo 4. 1. KNS türlerinin invaziv olan ve olmayan örneklerle göre dağılımı.....	79
Tablo 4. 2. KİKDE etkenlerinin izole edildikleri kliniklere göre dağılımı.....	79
Tablo 4. 3. SVK'sı olmayan hastaların periferik kan kültürlerinden izole edilen KNS türlerinin bölümlere göre dağılımı.....	80
Tablo 4. 4. KDE etkeni olan KNS'lerin izole edildikleri bölümlere göre dağılımı.....	81
Tablo 4. 5. Kateter kolonizasyonu etkenlerinin izole edildikleri kliniklere göre dağılımı..	82
Tablo 4. 6. Suşların Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak elde edilen antimikrobiyal direnç ve indüklenabilir klindamisin direnç oranları.....	83
Tablo 4. 7. Vankomisin için MİK değerleri (tüm suşlar).....	87
Tablo 4. 8. Klinik örneklerle göre vankomisin MİK dağılımı.....	88
Tablo 4. 9. İnvaziv olan ve olmayan örneklerde fenotipik ve genotipik yöntemler ile saptanan metisilin direncinin karşılaştırılması.....	91
Tablo 4. 10. İnvaziv olan ve olmayan örneklerde <i>mecA</i> geni negatif olarak bulunan suşların Kirby- Bauer disk difüzyon yöntemiyle saptanan sefoksitin direnç oranlarının karşılaştırılması.....	92
Tablo 4. 11. KNS'lerde fenotipik ve genotipik yöntemler ile saptanan metisilin direncinin karşılaştırılması.....	93
Tablo 4. 12. KNS suşlarının SCC <i>mec</i> tiplerine göre dağılımları.....	94
Tablo 4. 13. İnvaziv olan ve olmayan KNS suşlarının mikropalak yöntemiyle biyofilm oluşturma oranları.....	99
Tablo 4. 14. KDE etkeni KNS'lerin özellikleri.....	100
Tablo 4. 15. KNS suşlarının mikropalakta biyofilm oluşturma oranları.....	101

Tablo 4. 16. İnvaziv olan ve olmayan KNS suşlarının KRA yöntemiyle slime faktörü oluşturma oranları	102
Tablo 4. 17. KNS suşlarının türlere göre KRA’da slime faktörü oluşturma oranları.....	103
Tablo 4. 18. Mikroplakta biyofilm oluşturan suşlar ile KRA’da 24 saatte slime faktörü pozitif olarak değerlendirilen invaziv olan ve olmayan suşların karşılaştırmalı analizi ...	104
Tablo 4. 19. Mikroplakta biyofilm oluşturan suşlar ile KRA’da 24 saatte slime faktörü oluşturan invaziv olan ve olmayan suşların türlere göre karşılaştırmalı analizi	105
Tablo 4. 20. Mikroplakta biyofilm oluşturmeyan suşların taşıdığı biyofilm genlerinin analizi.....	107
Tablo 4. 21. KNS türlerinin; mikroplakta, biyofilm oluşturmeyan ve zayıf, orta ya da kuvvetli biyofilm oluşturma derecelerine göre taşıdıkları biyofilm genlerinin dağılımı...	111
Tablo 4. 22. Biyofilm oluşturan suşların vankomisin için MBEK değerleri.....	113
Tablo 4. 23. KNS suşlarının izole edildikleri bölgelere göre MBEK değerleri	113
Tablo 4. 24. KNS türlerinin MBEK/MİK ortanca değerleri.....	114
Tablo 4. 25. KNS suşlarının izole edildikleri bölgelere göre MBEK/MİK ortanca değerleri.....	115
Tablo 4. 26. Biyofilm oluşturan suşların vankomisin için MBEK/MİK oranları.....	115
Tablo 4. 27. Periferik kan kültürlerinden izole edilen KNS’lerin vankomisin için MBEK/MİK değerleri.....	116
Tablo 4. 28. KİKDE etkeni olan suşların özellikleri.....	117

1.GİRİŞ

Damar içi kateterler modern tıbbın önemli araçlarından olup, büyük yararlar sağlamakla birlikte, oluşturdıkları komplikasyonlar nedeniyle önemli bir morbidite ve mortalite nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Lokalize sellülit, septik tromboflebit, abse oluşumu, kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonları (KİKDE), metastatik enfeksiyonlar (osteomyelit, endoftalmit, artritis, akciğer absesi, beyin absesi) ile endokarditler damar içi kateterlerin önemli enfeksiyöz komplikasyonları arasındadır (Polderman ve Girbes, 2002; Henderson 2005).

Santral venöz kateter (SVK)'ler, başta yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalar olmak üzere, birçok hastanın gerek tedavisinde, gerekse takibinde gittikçe artan sıklıkta kullanılan tıbbi araçlardır. Hastaneye yatış sürecinde tanı ve tedavi amaçlı çok sıklıkla kullanılan SVK'ların, en önemli komplikasyonları arasında lokal ve sistemik enfeksiyon riski yer almaktadır. Enfeksiyon meydana geldiğinde acil müdahale amacıyla ampirik tedavi uygulanmaya başlandığı için, katetere bağlı enfeksiyonlarda bu enfeksiyona sebep olan etken mikroorganizmalar ve bunların virülans özellikleriyle direnç profilleri önem kazanmaktadır. Bu durum hem ülkemizde hem de dünyada kateterlere bağlı enfeksiyonların etkenleri ve bu enfeksiyonları önlemeye yönelik alınacak tedbirler üzerine çalışmalar yapılmasına neden olmuştur. Ülkemizde de kateterlere bağlı enfeksiyon oranları ve kateter enfeksiyonlarından izole edilen bakterilerin antimikrobiyal direnç oranlarını veren çalışmalar bulunmaktadır (Can ve ark., 2005; Bayraktar ve ark., 2007; Hatipoğlu ve ark., 2011). Stafilokoklar, kateter ile ilişkili bakteriyemilerin en sık nedenidir ve %50-75'ine neden olur (*Staphylococcus epidermidis* %35–50, *Staphylococcus aureus* %15–25) (Dündar ve Dündar, 2008). Bu enfeksiyonlarda, bakterilerin biyofilm oluşturabilme potansiyelleri kateter üzerindeki kolonizasyonlarını sağlayarak önemli bir virülans faktörü olarak karşımıza çıkmakta ve tedaviyi güçleştirmektedir (Cargill ve ark., 2009).

Kateterlerin yol açtığı kan dolaşım enfeksiyonu etkenleri arasında koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) ilk sıralarda izole edilmektedir. KNS'ler deri, burun boşluk ve ağız endojen florasında yer almakta ve özellikle kateterler gibi çeşitli tıbbi araçlar yoluyla kan dolaşımına geçmektedirler (Kitao ve ark., 2010). Kan dolaşım enfeksiyon (KDE)'lerine en sık yol açan kateter tipi, SVK'lar olduğu için, günümüzde genellikle bu kateterlerin

kullanım oranları ve KİKDE hızları belirlenmektedir (Freeman ve ark., 1989). Ülkemizde de kateterlere bağlı enfeksiyon oranları ve kateter enfeksiyonlarından izole edilen bakterilerin antimikrobiyal direnç oranlarını veren çalışmalar bulunmaktadır (Can ve ark., 2005; Bayraktar ve ark., 2007, , Pişkin ve ark., 2008; Aktaş ve ark., 2011; Hatipoğlu ve ark., 2011).

KİKDE’lerde, bakterilerin biyofilm oluşturabilme potansiyelleri kateter üzerindeki kolonizasyonlarını sağlayarak önemli bir virülans faktörü olarak karşımıza çıkmaktadır. Biyofilm bakterilerin konak savunma mekanizmalarından kaçmasına aracılık ettiği gibi, biyofilm oluşturan bakterilerin antibiyotik dirençlerinin planktonik hücrelere göre yaklaşık 1000 kat daha fazla olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bu tür bakterilerle oluşan enfeksiyonların tedavilerinde güçlükler izlenmektedir (Cargill ve ark. 2009). Biyofilm oluşturan stafilokoklar çoğunlukla kateter ilişkili enfeksiyon gibi ciddi hastalıklara neden olan fırsatçı ve invaziv patojenler olarak bilinmektedirler. Bu mikroorganizmaların erken saptanması ve bakteriler arasında yüksek oranda geçiş gösterebilen antimikrobiyal direnç genlerini taşıyan patojenik suşların ayırt edilmesi, enfeksiyon yayılımının kontrolünde temel oluşturmaktadır (Reiter ve ark., 2011).

Çalışmamızda, SVK ucu kültürlerinde üreyen ve bunlara bağlı gelişen kan dolaşım enfeksiyonu etkeni olan koagülaz negatif stafilokok (KNS)’ lar ile kan kültürlerinden, gönüllü sağlıklı, hastane çalışanlarının burun boşluklarından ve sağlıklı, gönüllü hastane çalışanı olmayan bireylerin ellerinden izole edilen KNS’ler kullanılarak, izolatların biyofilm oluşturma potansiyelleri; hem konvansiyonel hem de moleküler yöntemlerle ortaya konulmuştur. Değişken Alanlı Jel Elektroforezi (Pulsed Field Gel Electrophoresis-PFGE) yöntemi ile hem kateter ucunda üreyen hem de eş zamanlı alınmış olan periferik kanda üreyen suşlarda klonal özellikler belirlenmiştir. Suşların antimikrobiyal direnç profilleri çalışılmış, metisilin direnci moleküler yöntemlerle de doğrulanarak, dirençli bulunanlarda stafilokokkal kaset kromozomu (Staphylococcal Cassette Chromosome-SCC) *mec* tiplendirimi yapılarak, moleküler epidemiyolojik veriler elde edilmiştir. Elde edilen verilerin çalışılan grupta hastanemizdeki KİKDE etkenlerinin epidemiyolojik özellikleri ve antimikrobiyal direnç profilleri hakkında bilgi edinilmesi sağlanarak, tedavi protokollerine ışık tutulması hedeflenmiştir.

KİKDE tedavisinde en çok uygulanan antimikrobiyallerden biri vankomisindir. Ancak vankomisin biyofilm oluşturan bakteriler üzerine etkisi sınırlıdır (Cargill ve ark., 2009; Reiter ve ark., 2011). Çalışmamızın bir diğer basamağında, vankomisine karşı önce planktonik hücrelerde duyarlılık araştırılmış, böylece minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) belirlenmiştir. Daha sonra biyofilm oluşturan suşlara vankomisinin farklı dozları uygulanmış ve biyofilm içindeki bakterilerde (sesil) vankomisine karşı minimum biyofilm eradike edici konsantrasyon (MBEK) değeri belirlenmiştir. Bu verilerin in vivo vankomisin dozunu ayarlama da yardımcı olacağı düşünülmüştür.

Çalışma, rutin mikrobiyolojik inceleme için gönderilen hasta kültürlerinden elde edilen izolatlar üzerinden yürütülmüştür. Sağlıklı kontrollerden örnek alınması için “bilgilendirilmiş gönüllü olur formu” hazırlanmış ve çalışma etik kurul onayı alınmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kateterler ve Kateter İlişkili Enfeksiyonlar

Tıp uygulamalarında kateterler ilk defa 1945 yılında Meyer tarafından kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde de tedavi amaçlı çok değişik kateter kullanılmaya devam edilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'ndeki sağlık merkezlerinde her yıl 150 milyondan fazla damar içi kateter kullanılmaktadır ve bunların 5 milyondan fazlasının SVK olduğu rapor edilmiştir (Henderson, 2005; Maki ve ark., 2006). Hastaneye yatan hastaların % 6'sında SVK kullanım gereksinimi olmaktadır (Maki ve ark., 2006). Hastalık Kontrol Merkezi (Centers for Disease Control - CDC)'nin 2011 yılındaki kılavuzunda yılda 250000'den fazla kateter ilişkili enfeksiyon görüldüğü bildirilmiştir (Henderson 2005; Ulusoy ve ark., 2005; O'Grady ve ark., 2011). 2011 yılında yayınlanan CDC'nin intravasküler kateter ilişkili enfeksiyonları önleme kılavuzuna göre ABD'de sadece yoğun bakımlarda bir yıl içinde SVK kullanım günü 15 milyonu bulmaktadır (O'Grady ve ark., 2011). Hastaneler arası karşılaştırma yapabilmek için 100 hastada gözlenen enfeksiyon yerine araç kullanım gününe göre belirlenmiş araç ilişkili hızların kullanılmasının gerekli olduğu belirtilmiştir (Ulusoy ve ark., 2005). İnvaziv alet kullanım oranları "invaziv alet kullanım günü/ hasta yatış günü", invaziv alet ilişkili enfeksiyon hızları ise "bir yıllık süre içinde saptanan alet ilişkili hastane enfeksiyonu sayısı/ invaziv alet kullanım gün sayısı x 1000" formülleriyle hesaplanmaktadır. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS)'da alet ilişkili enfeksiyonun saptanmasının, genel hastane enfeksiyon hızının saptanmasına göre daha değerli olduğunu belirtilmektedir. NNIS verilerine göre 1000 invaziv alet gününe göre SVK ilişkili bakteremi hızı 2.8–10 arasında değişmektedir (NNIS, 2000). Yapılan başka bir çalışmada da oranlar 1.12-4.2 KİKDE/1000 kateter günü olarak verilmiştir (Tacconelli ve ark., 2009).

Avrupa'da yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) yapılan enfeksiyon prevelans çalışmalarında; KDE'ler %12'lik sıklıkla tüm hastane enfeksiyonları içinde en sık karşılaşılan dördüncü enfeksiyon olarak belirlenmiştir (Vincent ve ark., 1995). Hastane kökenli primer KDE'lerin %85'inin kateterlere, özellikle SVK'ya bağlı

olduğu NNIS sistemi tarafından bildirilmiştir (Ulusoy ve ark., 2005; O'Grady ve ark., 2011). 2004 yılında Wisplinghoff ve arkadaşlarının yaptığı, toplam 24.179 olgunun prospektif olarak izlendiği ulusal izlem çalışmasında (SCOPE: Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic Importance) yoğun bakım ünitelerinde %50.5 hastane kaynaklı KDE tespit edilmiştir. Aynı çalışmada KDE gelişiminde potansiyel risk faktörü olarak SVK kullanımının en üst sırayı aldığı belirtilmiştir (Wisplinghoff ve ark., 2004).

Kateter kullanımına bağlı olarak başta enfeksiyon olmak üzere bir takım komplikasyonlar oluşabilmektedir. Alınan tüm önlemlere karşın kateterlerin daha sık kullanımıyla doğru orantılı olarak, kateter enfeksiyonlarında bir artış söz konusudur. ABD'de YBÜ'lerde her yıl 80000 santral KİKDE görülmektedir ve bunun enfeksiyon başı maliyeti 6000–40000 \$ arasında değişmektedir. Hastanelerin diğer bölümleri de değerlendirmeye alındığında kateter ilişkili enfeksiyon sayısı yılda 250000'i geçmektedir (O'Grady ve ark., 2011). Yapılan başka çalışmalar da KİKDE'lerin 35.9-163.9 milyon Euro maliyet yükü olduğu vurgulanmıştır (Tacconelli ve ark., 2009).

Yoğun bakımlar içerdikleri hasta popülasyonu nedeniyle (özellikle travma hastaları, cerrahi girişim sonrası izlem, yanık hastaları) damar içi kateter uygulamalarının en sık yapıldığı ünitelerdir. Bu hastalarda yaşamın idamesi ve hastalığın tedavisi için SVK'lar yaşam desteği ve tedavi anlamında büyük öneme sahip araçlardır (Seifert, 2005). SVK enfeksiyon hızı ve risk faktörlerinin belirlenmesi, kateter ilişkili enfeksiyonların önlenmesi ve buna bağlı olarak sıklıklarının azaltılması açısından oldukça önemlidir.

Damar içi kateterlere bağlı gelişen lokal ve kan dolaşımı enfeksiyonları hastane enfeksiyonları arasında ciddi ve giderek artan bir sorun oluşturmaktadır. Hastanede edinilen bakteriyemilerin en sık nedeni damar içi kateterlerdir. Kateter ile ilişkili her tür enfeksiyon; hastane masraflarını, hastanede kalış süresini, morbidite ve mortaliteyi arttırmaktadır (Damar içi kateter enfeksiyonlarının önlenmesi ve kontrolü, 2008; O'Grady ve ark.,2011).

KİKDE patogeneğinde; bakterilerin biyofilm oluşturabilme potansiyelleri kateter üzerindeki kolonizasyonlarını sağlayarak önemli bir virlans faktörü olarak karşımıza çıkmaktadır. Biyofilm bakterilerin konak savunma mekanizmalarından kaçmasına aracılık ettiği gibi, biyofilm oluşturan bakterilerin antibiyotik dirençlerinin planktonik hücrelere göre yaklaşık 1000 kat daha fazla olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bu tür bakterilerle meydana gelen enfeksiyonların tedavilerinde güçlükler izlenmektedir (Cargill ve ark., 2009). Biyofilm oluşturan stafilokoklar çoğunlukla kateter ilişkili enfeksiyonlar gibi ciddi hastalıklara neden olan fırsatçı ve invaziv patojenler olarak bilinmektedirler. Bu mikroorganizmaların erken saptanması ve bakteriler arasında yüksek oranda geçiş gösterebilen antimikrobiyal direnç genlerini taşıyan patojenik suşların ayırt edilmesi, enfeksiyon yayılımının kontrolünde temel oluşturmaktadır (Reiter ve ark., 2011).

SVK'lar sıvı takviyesi, kan ürünlerinin, medikal nutrisyonel solüsyonların hastaya verilmesinde ya da hemodinamik monitörizasyonda kullanılmaktadır (Flowers ve ark., 1989). Maki SVK'ların neden olduğu enfeksiyon riskinin (%3–5) diğer tıbbi cihaz ilişkili enfeksiyonlara oranla daha yüksek olduğunu belirtmiştir (Maki, 1994).

2.1.1. Kateter İle İlişkili Enfeksiyonların Tanımları

- **Kateter Kolonizasyonu:** Eşlik eden klinik semptomlar yokken, semikantitatif veya kantitatif yöntemle kateter ucu veya kateter hubundan (kanül ile infüzyon setinin birleşim yeri) nemli miktarda [semikantitatif kültürde ≥ 15 fazla koloni oluşturan birim (kob), kantitatif kültürde ise $\geq 10^3$ kob] bakteri üremesi durumudur (Mermel ve ark., 2001).
- **Filebit:** Kateter takılı venin enflamasyonu olup, kateter çıkış yeri etrafında endürasyon, eritem, sıcaklık ve hassasiyet gelişmesi durumudur (Mermel ve ark., 2001).
- **ıkış yeri enfeksiyonu:** Kateter ıkış yerindeki derinin < 2 cm bölümünde kızarıklık, hassasiyet, şişkinlik, pürülan akıntı, ateş gibi bulguların olması veya

kateter çıkış yeri eksüdasında mikroorganizma üremesini ifade etmektedir (Mermel ve ark., 2001).

- **Cep (port) enfeksiyonu:** Tamamen implant edilebilen kateterin rezervuarı üzerindeki deride hassasiyet, eritem, endürasyon veya rezervuarı içeren deri altı cepte pürülan eksüdanın varlığıdır (Mermel ve ark., 2001).
- **Tünel enfeksiyonu:** Tünelli bir kateterin (Hickman-Broviac) giriş yerinden >2 cm bölgede; deri altı tünel boyunca kızarıklık, ağrı, şişkinlik belirtileri yani sellülit olması durumudur (KDE olmaması gerekir) (Mermel ve ark., 2001).
- **Septik trombofilebit:** Ven içi kateter yerinde enfekte pıhtı varlığı durumudur (Mermel ve ark., 2001).
- **Kateter ilişkili kan dolaşım enfeksiyonu:** Ateş, üşüme, titreme, hipotansiyon, taşikardi, lökositoz gibi bulguları olan ve başka enfeksiyon odağı saptanamayan hastada, kateter parçasından alınan örnek, SVK ve periferik ven kanından benzer biyotip ve direnç paternine sahip bakteri veya mantar üremesidir. Tanıda aşağıdaki durumlardan biri olmalıdır (Mermel ve ark., 2001; O'Grady ve ark., 2011):
 - Kateter ucunda yarı kantitatif kültürle ≥ 15 kob, kantitatif kültürde $\geq 10^3$ kob üreme olması
 - Kantitatif kültürlerde, kateterden alınan kanda görülen koloni sayısının, periferik venöz kana göre 5–10 kat fazla olması
 - SVK'dan alınan kan kültüründeki üremenin, periferik venden alınan kan kültüründeki üremeden en az 2 saat önce olması

CDC'ye göre KİKDE tanısı, semikantitatif kültür sonucunda ≥ 15 kob veya kantitatif kültür sonucunda $\geq 10^3$ kob bakteri üremesi durumu ile birlikte alınan

periferik kan kültüründe aynı bakterinin izole edilmesi ve klinik olarak sepsis belirtilerinin bulunması olarak tanımlanmaktadır (O'Grady ve ark., 2011).

- **Klinik sepsis:** Bu tanım; CDC tarafından hastane enfeksiyonları surveyansı için önerilen standart tanımlardan biridir ve klinikte yaygın olarak kullanılan 'American College of Chest Physicians/ Society of Critical Care Medicine' tarafından belirlenmiş olan sepsis tanımları ile karıştırılmamalıdır. Başka bir nedene bağlanamayan ateş ($>38^{\circ}\text{C}$), hipotansiyon, (sistolik kan basıncı <90) veya oligüriden birinin bulunması ve kan kültürü alınmamış olması, kültürde üreme olmaması veya kanda patojen bakteriye ait antijen saptanmamış, başka bölgede enfeksiyon olmaması ve kateterin çıkarılmasını takiben uygulanan antimikrobiyal tedaviye klinik yanıtın olması durumunda klinik sepsisten bahsedilmektedir (Ulusoy ve ark., 2005).

2.1.2. Kateter Tipleri ve Özellikleri

Günümüzde çok çeşitli kateter türü bulunmaktadır ve hangi tip kateterin kullanılacağı hastanın durumuna göre belirlenmektedir (Henderson 2005; Mermel ve ark., 2009):

Periferik venöz kateter: İlaç uygulamaları için ön kol ve el venlerinde kısa süreyle kullanılır.

Periferik arteriyel kateter: Kısa süreli kullanım içindir; hemodinamik durumu ve kan gazları takip etmek için kullanılır.

Orta boy kateter: Periferik kateterdir, ön kol venlerinden uygulanır ama santral venlere ulaşmamaktadır.

Tünelsiz SVK: En sık kullanılan SVK'dır. KİKDE'nin %90'ının nedenidir; uygulamada subklavian, juguler veya femoral ven kullanılır.

Pulmoner arteriyel (Swan-Ganz) kateter: Hemodinamik incelemeler için kullanılır. Kullanım süresi ortalama üç gündür.

Basınç monitör sistemi: Sürekli kan basıncı izlemi için arteriyel kateter ile birlikte kullanılır. Epidemik ve endemik nozokomiyal KDE'ye neden olabildiği için dikkatli olunmalıdır.

Santral periferik kateter: Periferik venlerden uygulanan ve vena kava süperiora ulaştırılan alternatif santral kateterdir. Tünelsiz SVK'lere göre daha az mekanik komplikasyona yol açmaktadır.

Tünelli SVK (Hickman-Broviac): Cerrahi olarak yerleştirilen kateter çıkış yerine kadar subkütan tünellenir ve deri çıkış yerinde mevcut Dacron "cuff", katetere doğru fibroz doku oluşumuna imkan verir ve kateter yüzeyince mikroorganizmaların migrasyonu inhibe eder. İntravenöz kemoterapi, evde infüzyon tedavisi veya hemodiyaliz gibi uzun dönemde kateter ihtiyacı duyulduğunda kullanılır.

İmplant kateter: Tümüyle implant edilmiş kateterdir. Deri altına yerleştirilen kateter ceplerine (port) septumdan sokulan iğne ile gerekli maddeler verilir; enfeksiyon riski düşüktür.

2.1.3. Kateter İlişkili Enfeksiyonların Tanısında Kullanılan Mikrobiyolojik Yöntemler

2.1.3.1. Kültür Yöntemleri

2.1.3.1.1. Semikantitatif kültür (Maki) yöntemi: Kateter steril koşullarda çekilir, steril makas ile kateterin 5 cm'lik distal parçası kesilir ve kuru steril bir tüp içerisinde laboratuvara gönderilir. Kateterin kesilen parçası steril penset yardımı ile dört-beş kez çevrilerek koyun kanlı agara (KKA), eozin-metilen mavisi agara (EMB) ve Sabouraud-dekstroza agara (SDA) ekim yapılır. 37°C'de 24-48 saat inkübasyon sonunda 15 veya daha fazla bakteri kolonisi üremesi kateterin anlamlı derecede

kolonize olduğunu gösterir (Maki ve ark., 1977; O'Grady ve ark., 2011). Bu durum ya kateter yerinde lokal bir enflamasyonla ya da kateter ilişkili bakteriyemiyle kuvvetle ilişkilidir (duyarlılık %60) ve yerinde bir haftadan daha kısa kalan kateterlerde güvenilirdir (Mermel, 2011). Ayrıca; kolonize bakteri yoğunluğu dış yüzeyde iç yüzeye göre daha fazladır (O'Grady ve ark., 2011).

2.1.3.1.2. Tam kantitatif kültür yöntemi: Kateter lümenindeki bakterileri de değerlendirmek için, kesilen kateter parçasının içinden 1 ml triptik soy buyyon geçirilir ve sonrasında 1/100'lük dilüsyonu hazırlanır. Hazırlanan dilüsyondan steril mikropipet ile 100'er mikrolitrelik sıvı alınıp KKA, EMB ve SDA'ya ekim yapılır. 37°C'de 24-48 saat inkübe edilir. Bu ekimde $\geq 10^3$ kob bakteri üremesi pozitif üreme olarak kabul edilir (Cleri ve ark., 1980).

SVK kullanım endikasyonlarını bilip, düzgün bir şekilde uygulamak çok önemlidir. Bunlar TPN (total parenteral nütrisyon), hemodiyaliz, hemoferez, aferez, santral venöz basınç ölçümü, santral venöz oksijen ölçümü, özel ilaç uygulama yolu, basit venöz yol elde etmek şeklinde özetlenebilir (Ulusoy ve ark., 2005; O'Grady ve ark., 2011).

2.1.4. Kateter İlişkili Enfeksiyonlarda Etyoloji

Başta deri flora mikroorganizmaları olmak üzere, çeşitli bakteriler ve mantarlar kateter ilişkili enfeksiyonlara neden olmaktadır. Kateter tipi, kateter yeri, konağın durumu, hastanın bulunduğu üniteler gibi faktörlere göre etkenler farklılık gösterebilir. Sırasıyla KNS'ler, *S. aureus*, aerobik gram negatif çomaklar ve *Candida albicans* kateter enfeksiyonlarından en sık üretilen etkenlerdir (Ulusoy ve ark., 2005; O'Grady ve ark., 2011). Stafilokoklar, kateter enfeksiyonlarının en sık nedenidir ve tüm katetere bağlı bakteriyemilerin %50- 75'ine neden olur (*S. epidermidis* %35-50, *S. aureus* %15-25). Stafilokoklar içinde *S. epidermidis* kateter ilişkili enfeksiyonların en sık nedenidir ve çoğu zaman kateterin çıkarılması gerekmeden antibiyotiklerle tedavi edilebilmektedir (Dündar ve Dündar, 2008). *S. epidermidis* ABD ve Almanya'daki yoğun bakım ünitelerinde görülen nozokomiyal KİKDE

enfeksiyonlarının büyük bölümünden sorumludur (Wisplinghoff ve ark., 2003; Hidron ve ark., 2008; Geffers ve Gastmeier, 2011). Yapılan başka çok merkezli bir çalışma sonucunda yoğun bakım ünitelerinde 1000 kateter günü başına 6.8 kat KİKDE riski belirlenmiştir (Rosenthal ve ark., 2014). Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance verileri sonucunda nozokomiyal KDE'lerde en sık etken olarak KNS'ler bildirilmiştir (Wisplinghoff ve ark., 2004). Tür tanımlanması uygulandığında da KNS'lerin %80'ini *S. epidermidis*'in oluşturduğu belirtilmiştir (Jukes ve ark., 2010). KNS'ler ve bunlar içerisindeki hidrofobik suşlar, kateterlerin polimer yüzeylerine diğer etkenlere göre daha kolay yapışmaktadır. Bazı KNS'lerin pili benzeri adezin molekülleri mevcuttur. Bu yapılar sayesinde bu etkenlerin kateterlere yapışması kolaylaşmaktadır. Aynı zamanda ekstrasellüler polisakkarid yapısında madde salgılayıp biyofilm oluşturarak konak savunması ve antibiyotiklerden kendilerini koruyabilmektedirler. *S. aureus*'a bağlı KDE'lerin çoğu deriden köken almaktadır ve etkenin burunda taşınması ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Kitao ve ark., 2010). Venöz mural tromboz varlığında da *S. aureus*'a bağlı kateter ilişkili enfeksiyon oluşma riskinin diğer etkenlere göre daha sık olduğu gösterilmiştir. *Enterococcus* türleri, *Corynebacterium* türleri (özellikle *Corynebacterium jeikeium*), *Propionibacterium acnes*, *Bacillus* türleri, *Micrococcus* türleri etken olarak sık rastlanan diğer gram pozitif bakterilerdir (Raad ve ark., 1994).

Kateter ilişkili enfeksiyon etkenlerinden yaklaşık %15-30'unu; gram negatif bakterilerden *Enterobacteriaceae* üyeleri (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella* türleri, *Citrobacter* türleri), non-fermentatif gram negatif çomaklar (*Pseudomonas aeruginosa* ve diğer *Pseudomonas* türleri, *Acinetobacter* türleri, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas hydrophila*) oluşturmaktadır (Uncu ve ark., 2004). Gram negatif basiller (özellikle *Klebsiella pneumoniae* gibi geniş spektrumlu beta-laktamaz üreten *Enterobacteriaceae* üyeleri); YBÜ'lerde, yoğun bakım dışı ünitelere göre daha yüksek oranda kateter ilişkili enfeksiyon etkeni olarak görülmektedir. Bu mikroorganizmalar, özellikle invazif monitorizasyon cihazlarının kontaminasyonu, komplike uzak alan enfeksiyonları veya yüksek düzey oro-trakeal kolonizasyondan kaynaklanabilmektedir (Eggimann ve Pittet, 2002; Ulusoy, 2005). Mikobakteriler de (*Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*) kateter

enfeksiyonlarına neden olan bakteriler arasında yer almaktadır (Raad ve ark.,1994). Özellikle bağışıklığı baskılanmış hastalar ve yoğun olarak geniş spektrumlu antibiyotik kullananlarda *Candida* türleri (*C. albicans*, *Candida parapsilosis*) ve diğer mantarlara (*Fusarium* türleri, *Malassezia furfur*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* türleri) bağlı kateter ilişkili enfeksiyon sıklığı giderek artmaktadır (Wisplinghoff ve ark., 2004; Onurdağ ve ark., 2010). Farklı hastane ve birimlerde etken sıklığı değişkenlik göstermektedir. Deriden kaynaklanan *C. albicans*'a bağlı KDE'lerde kateter giriş yerindeki derinin bütünlüğü çoğunlukla bozulmuştur. Total parenteral beslenme alan hastalarda, verilen sıvı etkenin çoğalmasına katkıda bulunduğundan, *C. albicans*'a bağlı kateter ilişkili enfeksiyon riski artmaktadır (Ulusoy, 2005). *Candida* enfeksiyonları, en sık görülen hastane enfeksiyonları arasında dördüncü sırada yer almasına rağmen, morbidite ve mortalite oranı diğerlerine göre daha yüksektir. *Candida* türlerinin neden olduğu kateter ilişkili enfeksiyonlarda genellikle antifungal tedaviye yanıt alınmadığından kateterin çekilmesi gerekmektedir (Shuford ve ark., 2007). İnfüze edilen sıvılara bağlı kateter enfeksiyonları gelişebilmekte ve bazen bunlara bağlı salgınlar da görülebilmektedir. Kontamine infüzyon sıvısı, epidemik nozokomiyal bakteriyemilerin en sık nedenidir (O'Grady ve ark., 2011). Değişik parenteral sıvılarda mikroorganizmaların üreyebilme potansiyelleri de farklıdır; %5 dekstrozu solüsyonunda bazı *Enterobacteriaceae* üyeleri (*Klebsiella* türleri, *Enterobacter* türleri, *Citrobacter* türleri); distile suda *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* türleri, *Serratia* türleri; laktatlı ringer solüsyonunda *P. aeruginosa* ve *Enterobacter* türleri hızlı üreme gösterir. Serum fizyolojikte birçok bakteri türü üremesine rağmen *Candida* türleri genellikle zor üremektedir. Aminoasit ve hipertonic glikoz içeren solüsyonlarda *Candida* türleri iyi ürerken, bu sıvı çoğu bakterinin üremesini inhibe eder; %10 lipid solüsyonu da birçok mikroorganizmanın üremesi için uygundur. Kan ve kan ürünlerini; *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Achromobacter* spp., *Flavobacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp. ve *Yersinia* spp. cinsi bakteriler kontamine edebilmektedir. Kateter tipleri ve takılma yerine göre de etken mikroorganizma türü değişebilmektedir; KNS'ler bütün kateter tiplerinde en sık etkindir (%30–60), ancak femoral SVK'larda en sık etken gram negatif çomaklar (*Enterobacteriaceae* ve *Pseudomonas* türleri) ve enterokoklardır. Uzun süreli SVK'larda KNS'ler %40–60, *S. aureus* %20–30, gram

negatif bakteriler %15–25, *Candida* türleri %5–20 oranında etken olur. Tünelsiz kısa süreli SVK ve pulmoner kateterlerde KNS'lere %30–50, *S. aureus*'a %5–15, enterokoklara %5–10, gram negatif bakterilere %30–40, *Candida* türlerine %3–5 sıklığında rastlanılır. Uzun süreli tünelli SVK'larda KNS'ler %40–60, *S. aureus* %3–5, enterokoklar %5–10, gram negatif bakteriler %20–30, *Candida* türleri %10–20 ve küfler %0–5 oranlarında etken olmaktadır (Polderman ve Girbes, 2002).

2.1.5. Koagülaz Negatif Stafilokokların Etken Olduğu Kateter İlişkili Enfeksiyonların Tedavisi

KNS'ler kateter enfeksiyonlarının en sık nedeni olmalarına rağmen klinikte karşımıza daha çok cilt flora kontaminasyonu veya kateter ağzı kolonizasyonu olarak çıkmaktadır. Metisilin duyarlı KNS (MSKNS)'lerde nafsilin, sulbaktam – ampisilin, sefazolin veya kotrimoksazol kullanabilmektedir. Metisilin direnci gelişen vakalarda (günümüzde %50-80'lere ulaşmıştır ve giderek artmaktadır) ise glikopeptitler, linezolid ve streptograminler tercih edilmektedir (Öztürk, 2003; Raad ve ark 2007; Mermel ve ark., 2009).

SVK'sı çekilmiş ve komplike olmayan vakalarda 5–7 günlük sistemik antibiyotik tedavisi yeterliyken, kateteri korunan vakalarda, uygulanan tedaviye antibiyotik kilit tedavisi eklenerek tedavi süresi 10–14 güne tamamlanmaktadır. Kateter kilit tedavisi sırasında kateterdeki antibiyotik konsantrasyonu MİK değerinin 100-1000 kat üzerinde bulunmaktadır. Kilit tedavisi ile antibiyotik uygulamasından sonra, 24-48 saat boyunca antibiyotik kateterdeki konsantrasyonunu korumaktadır. Antibiyotik kilit tedavisinde heparin ile çökme oluşturma riski olmayan antibiyotikler, heparin ile kombine edilerek uygulanır. Heparin ile kombine kullanılabilecek antibiyotikler; vankomisin, seftazidim, sefazolin, siprofloksasin, gentamisin ve ampisilindir. Vankomisin heparin kombinasyonu 37°C'de 72 saat çökme oluşturmada durabilir. KNS'ler slime faktör oluşturmalarına rağmen tedavi için kateterin çekilmesi şart değildir fakat kateteri korunan hastalarda bakteriyeminin %20 oranında tekrarlama riski mevcuttur (Öztürk, 2003; Raad ve ark., 2007; Mermel ve ark., 2009; O'Grady ve ark 2009).

2.2. Biyofilm

2.2.1. Biyofilm Tarihçesi

Araştırmacılar, biyofilm kavramından önce, planktonik olarak da adlandırılan ve diğer bakterilerden bağımsız olarak, tek başlarına dolaşan mikrobiyal hücrelerin davranışlarını incelemişlerdir. Mikroorganizmaların bir yüzeye tutunarak bir tabaka oluşturmalarıyla ilgili kanıtların ortaya çıkmasıyla birlikte, çalışmalar da bu yöne kaymıştır (Rijnarts ve ark.,1993; Donlan ve Costerton, 2002).

17. yüzyılda Van Leeuwenhoek kendi dişlerindeki plaklarda, mikroskopla saptanabilen varlıkları tespit etmiş, 1978’de Bill Costerton yaptığı yayın ile "biyofilm teorisini" ortaya atmıştır (Costerton ve ark., 1978). Sonrasında da biyofilmin yapısı, özellikleri, bulunduğu ekosistemler ile ilgili çalışmalar artmıştır (Watnick, 2000).

Biyofilm teorisinin ortaya çıkışından sonra bilim dünyasında, birincisi, biyofilmin biyokimyasal özellikleri ve genetik yapısı; ikincisi ise, biyofilm ile ilişkili enfeksiyonların tanısı ve tedavisi olmak üzere iki önemli başlık gündeme gelmiştir. Biyofilm oluşumu, düzenlenmesi ve biyofilm oluşumunun altında yatan moleküler yapılar ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Donlan ve Costerton, 2002; Costerton ve ark., 2005, Arciola ve ark., 2012). Biyofilmin sebep olduğu enfeksiyonların tanısı, yol açan etkenler, kolaylaştıran faktörler, tedavisi ve antimikrobiyallere karşı gelişen direnç mekanizmalarını içeren konular halen güncelliğini korumakta ve bunlarla ilgili araştırmalar yapılmaya devam edilmektedir (Stoodley ve ark., 2002 ve 2011; Ehrlich ve ark., 2010; Wolcott ve ark., 2011; Costerton ve ark., 2011).

2.2.2. Biyofilm Oluşumu

KNS’ler üzerinde yapılan çalışmalarda, bu mikroorganizmaların bir kısmının “slime faktörü” adı verilen hücre dışına salgılanan %40 karbonhidrat ve %27 proteinden

oluşan viskoz, ekstraselüler bir madde oluşturdıkları saptanmıştır. Slime faktör, KNS'lerin düz yüzeylere ve kateterlere tutunarak kolonize olmalarını kolaylaştırmakta, KNS'leri fagositoz ve degranülasyondan korumakta, kemotaksisi ve opsonizasyonu önlemekte, nötrofil etkisini inhibe ederek, lenfosit aktivitesini azaltmakta ve bakteriye virülans kazandırmaktadır (Christensen ve ark., 1982, Davenport ve ark 1986; Noble ve ark., 1990).

Çalışmalar biyofilm oluşumunun dört farklı basamakta geliştiğini göstermiştir (Watnick, 2000; Altun ve Şener, 2008):

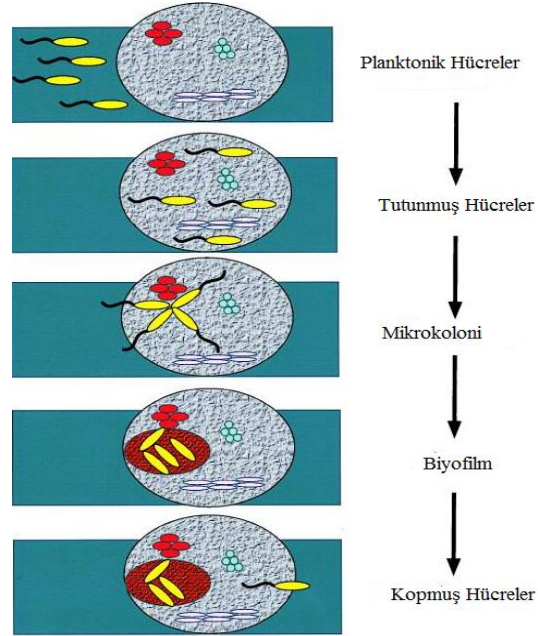
1.Mikroorganizmanın yüzeye tutunması: Yüzeye organik ve/veya inorganik maddelerin yapışmasını takiben mikroorganizmalar bu yüzeye geri dönüşür özellikle tutunmaktadır. Bu evrede bakterinin hareketi veya bakteri yüzeyi ile tutunulan yüzey arasındaki elektrostatik veya fiziksel etkileşimler rol oynamaktadır.

2.Geri dönüşümsüz tutunma: Bakteriler bu aşamada ekzopolisakkarid yapıda bir madde sentezlemeye başlamakta ve bu yapı da hücrelerin birbirine ve yüzeye tutunmasını sağlamaktadır. Ekzopolisakkarid madde aynı zamanda bakterinin olumsuz çevre koşullarından korunmasını işlevini de üstlenmektedir.

3.Kolonizasyon: Yüzeye tutunan bakteriler bölünüp çoğalarak biyofilmin temel birimi olan mikrokolonileri oluşturmaktadır. Mikrokolonilerin %10-25'i hücrelerden, %75-90'ı ise hücre dışı polimerik madde matriksinden oluşmaktadır (Donlan ve Costerton, 2002). Bu mikrokolonilerin üzerine ortamdaki planktonik bakteriler de yapışmaya devam etmekte ve böylece kolonizasyon sağlanmaktadır.

4.Kopma: Biyofilm oluştuktan sonra bakteride genetik düzenlenme sonrasında hareketi sağlayacak olan flajellalar sentezlenmekte, üst tabakadan kopmalar gerçekleşmekte ve kopan planktonik hücreler yeni biyofilm odaklarını oluşturmak üzere ayrılmaktadır. Bu süreç bir dengeye oturunca süreklilik göstermektedir.

Biyofilm oluşum basamakları Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2. 1. Biyofilm oluşumunun gösterilmesi (Watnick ve Kolter, 2000)

2.2.3. Biyofilmin Yapısı ve Önemi

Biyofilm için çeşitli tanımlamalar olmakla birlikte; genetik yapısı ve protein sentezi açısından tamamen değişik yapıda, hücre dışı polimerik madde içine gömülmüş şekilde, değişime uğramış yüzeye ya da birbirine tutunan mikroskobik canlıların oluşturduğu yapıya biyofilm denilmekte ve makroskobik olarak opak yapıda, bulunduğu ortam ve koşullara göre değişik boyutlarda olabilen (ortalama 100-500µm boyutlarında), kaygan, pürüzsüz, giderilmesi zor bir yapı olarak ifade edilmektedir (Rijnarts ve ark., 1993; Hood ve Zottola, 1997; Watnick ve Kolter, 2000; Sutherland, 2001).

Bir çalışmada biyofilm, geri dönüşümsüz olarak bir ara yüze veya birbirlerine tutunmuş, ekstrasellüler polimerik maddelerden oluşan ve kendi üretmiş oldukları matriks içerisinde gömülü, planktonik formları ile büyüme hızları ve gen transkripsiyonları farklı olan ve mikrobiyal hücrelerden oluşan hareketsiz bir topluluk olarak tanımlanmıştır (Donlan ve Costerton, 2002).

Biyofilmin %90'ından fazlasını oluşturan ekstrasellüler matriks; mikroorganizmayı fagositozdan ve oksidatif mekanizmalardan korur (Hoyle ve ark., 1990), ayrıca bakteri biyofilm tabakası sayesinde konağın bağışıklık sisteminden de kaçmış olur (Costerton, 1995).

Başka bir çalışmada biyofilm; bir yüzeye yapışan ama burada yaşama biçimlerini belirli bir yapısal bütünlük içerisinde sürdüren ve birbirleriyle haberleşerek ve varlıklarının devamı için gerekli işlevlerin yerine getirilmesini sağlayan bakterilerin oluşturduğu bir organizasyon olarak tanımlanmış ve haberleşmenin önemine dikkat çekilmiştir (Post ve ark., 2004).

Bazı gram pozitif bakterilerde; örneğin stafilokoklarda ekstrasellüler polimerik maddenin kimyasal yapısı katyoniktir. Yapılan bazı çalışmalarda KNS'lerin oluşturduğu slime takasının teikoik asit ve çok az miktarda protein karışımından oluştuğu görülmüştür (Hussain ve ark., 1993).

2.2.3.1. Biyofilimde Çoğunluğu Algılama (Quorum Sensing) Mekanizmaları

Biyofilm oluşumu; bakterilerin bir araya gelip belirli bir yüzeye tutunarak yapışmaları ve o yüzeydeki diğer türlerle birlikte yaşamaya devam ettikleri, rastgele gerçekleşen bir olay değildir. Bazı bakterilerde biyofilm oluşumu, hücreden hücreye iletişim dizgeleri ile kontrol edilmektedir. Ökaryot ve prokaryot hücrelerden salınan ve hücreler arası sinyal iletimini sağlayarak, bakterinin gen ekspresyonunu düzenleyen moleküllerle ("acylated homoserine lactonase" vb.), biyofilm yapımının düzenlenebileceği gösterilmiştir. Bu veriler; biyofilmin patojenite ve çevreye adaptasyonda önemini arttırmıştır. Çoğunluğu algılama (quorum sensing) olarak adlandırabileceğimiz bu dizgeler, geniş bir organizma topluluğunda virülans etkenlerinin düzenlenmesinde de yer almaktadır (Labbate ve ark., 2004; Raffa ve ark., 2005; Rasmussen ve Givskov, 2006).

Quorum sensing sistemi sayesinde bakteri davranışlarını koordine ederek, besin için diğer bakterilerle savaşır, kaynaklara karşı adaptasyon geliştirir. En önemlisi,

enfeksiyon sırasında virölans faktörlerini düzenleyerek konağın immün yanıtından kaçabilir. Quorum sensing sistemi içinde “autoinducer” adı verilen sinyal molekülleri vardır. Bu moleküller haberleşmede çok önemli rol oynamaktadırlar. Hücre dışı quorum sensing molekülleri, ya membrana bağlı sensör kinazlara bağlanır ve hücre içinde bir veya daha fazla sayıda genin ekspresyonunu kontrol eden düzenleyicilerin fosforilasyonu yoluyla hücrede transkripsiyonel değişikliklere neden olur, ya da bazı bakterilerde olduğu gibi oligopeptid permeazlar aracılığı ile doğrudan hücre içine girerek hücre içi reseptörler ile kendileri etkileşime geçer (Novick ve Muir, 1999; Raffa ve ark., 2005; Rasmussen ve Givskov 2006; Saraçlı, 2006).

2.2.4. Bakteriler Neden Biyofilm Oluşturur?

Biyofilm yapısı ekstrasellüler matriks ve mikrobiyal hücrelerden oluşmaktadır. Mikroorganizmaların biyofilm oluşturmalarının nedenleri arasında; biyofilm sayesinde çeşitli koşullara ve maddelere karşı dirençlilik geliştirebilmeleri ve bakterilerin çok tabakalı şekilde sıralanmaları sayesinde yüzeyde bulunan tabakanın kimyasallara karşı mekanik kalkan oluşturmaları gibi avantajlar elde etmeleri sayılabilir (Donlan ve Costerton, 2002).

Bakteriler tercihen olumsuz ortamlarda biyofilm yapmaktadırlar. Pürüzlü ve pürüzsüz yüzeylerde bakteriyel adezyon çalışmaları; birçok kez pasajlanmış ve adezyon yeteneğini yitirmiş laboratuvar suşlarıyla ve önceden pasajlanmamış ve bütünüyle aderan bakteriyel suşlarla yapılmıştır. Çalışmalar sonucunda; pasajlanan bakterilerde pürüzsüz yüzeylerde adezyon meydana gelmezken, söz konusu adezyon yeteneğini kaybetmemiş suşlar (wild type) olduğunda yüzeyin fiziksel farklılıklarının etkisi olmamış ve her iki yüzeyde de adezyon izlenmiştir (Costerton ve ark.,1995).

Birçok kez pasajlanmış ve adezyon yeteneğini yitirmiş laboratuvar suşlarıyla yapılmış bakteriyel adezyon çalışmalarında, pürüzsüz yüzeylerin bakteriyel adezyondan kaçabildiği saptanmıştır. Buna karşılık; pasajlanmamış ve bütünüyle aderan bakteriyel suşlarla yapılan çalışmalarda pürüzsüz yüzeylerin, pürüzlü

yüzeyler kadar kolay kolonize olduğu ve yüzeyin fiziksel özelliklerinin bakteriyel adezyona etkisinin minimal olduğu gösterilmiştir (Costerton ve ark., 1995).

Bakterilerin oluşturdıkları biyofilm yapısı ortam koşullarına göre de farklılık göstermektedir; uygun olmayan koşullarda üretilen biyofilmlerin viskozitelerinin arttığı ve mekanik kırılmalara dayanıklı oldukları gösterilmiştir (Donlan, 2002).

2.2.5. Biyofilm Oluşumunun Gösterilmesi

Biyofilm oluşumunu göstermek için çeşitli boyalar, metabolik, moleküler ve fiziksel yöntemler bulunmaktadır (Pantenella ve ark., 2013). Biyofilm kavramının tam olarak ortaya konmasından önce Christensen yöntemi ile slime faktör varlığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Günümüzde bu yöntem halen kullanılmaya devam etmektedir.

Biyofilm yapısı Konfokal Tarayıcı Lazer Mikroskopi ve Tarayıcı Elektron Mikroskopi gibi mikroskopik yöntemlerle gösterilirken, kuru ağırlık ölçümü, lösin inkorporasyon yöntemi ile radyoaktif madde alımı gibi kolorimetrik yöntemler ile biyofilmin yoğunluğu ve derecesi tespit edilebilmektedir (Christensen ve ark., 1982; Van Pett ve ark., 1990; Hawser ve Douglas, 1994; Chandra ve ark., 2001; Pantenella ve ark., 2008; Peeters ve ark., 2008;).

2.2.5.1. Boyama Yöntemleri

Boyama yöntemlerinde çok çeşitli boyalar kullanılarak biyofilm tabakasını göstermek, ölü/canlı hücrenin tespiti gibi çeşitli uygulamaları vardır.

- 1) Kristal viyole ile boyama: Kristal viyole ile boyayarak biyofilm tabakasının gösterilmesi ve ölçümünde kullanılan ilk yöntemlerdendir. Bu yöntemde biyofilm tabakasını oluşturan bakteri ve ekstrasellüler matriksin negatif yüklü molekülleri kristal viyole ile boyanmaktadır. Boyama işleminden sonra, bir

Çözücü (etanol, asetik asit gibi) eklenmekte ve spektrofotometrik olarak değerlendirilmektedir (Pantenella ve ark., 2013).

- 2) 1,9-dimetil metilen mavisi (1,9- dimethyl methylen blue): Bu kolorimetrik yöntem özellikle *S. aureus*'un oluşturduğu biyofilmlerde kullanılmaktadır. Katyonik bir boya olan 1,9-dimetil metilen mavisi; özellikle glikozaminoglikanları boyamaktadır. *S. aureus*'un oluşturduğu biyofilm tabakasındaki, ekstrasellüler matriksin yapısında bulunan poli-b-1,6 bağlarıyla bağlanmış N-asetilglukozamini boyamaktadır. Bu boya polisakaritler ile kompleks oluşturduktan sonra bir çözücü eklenmekte ve spektrofotometrik olarak değerlendirilmektedir (Pantenella ve ark., 2013).
- 3) Floresein diasetat (fluorescein-di-acetate): Floresein diasetat; hücre membranını boyayan renksiz bir boyadır. Bakterinin boyayı almasından sonra, boya hücresel esterazlar ile floreseine hidrolize edilmektedir. Oluşan sinyaller spektrofotometrik olarak değerlendirilmektedir. Ölü hücreler floresein diasetat boyasını metabolize edemedikleri için, sinyal oluşturmamaktadır (Pantenella ve ark., 2013).
- 4) Ölü/canlı bakteri boyama (LIVE/DEAD BacLight boyama kiti) Bu yöntemde iki çeşit nükleik asit boyası kullanılmaktadır. Birincisi; yeşil floresan veren ve canlı bakterilerin ayrımını sağlayan Syto9 boyası, ikincisi ise; kırmızı floresan veren ve ölü bakterilerin ayrımını sağlayan propidyum-iodid boyasıdır. Bakterilerin boyanması hücre membranları ile ilişkilidir. Hücre zarına gömülü ölü bakteriler kırmızı, canlı bakteriler ise yeşil renkte gözlenmektedir (Pantenella ve ark., 2013).

2.2.5.2. Metabolik Yöntemler

Biyofilm değerlendirilmesinde kullanılan metabolik yöntemler şöyle sıralanabilir:

- 1) Resazurin yöntemi: Resazurin canlı hücrelere zarar vermeyen bir biyolojik boyadır. Mavi- floresan olmayan resazurin boyası (Alamar Blue olarak da bilinir), hücresel metabolizma sonucunda floresan özelliği olan rezorufine dönüştürülür ve boyanın rengi pembe olarak değişmektedir. İşlem sonunda spektrofotometrik olarak değerlendirilmektedir. Resazurin canlı hücreleri değerlendirmek için kullanılmaktadır (Pantenella ve ark., 2013).
- 2) XTT yöntemi: Bu yöntemde redoks indikatör kullanılarak, spektrofotometrik yolla biyofilm tabakasındaki canlı hücrelerin görülmesini sağlanmaktadır. Canlı hücreler, mikrobiyal respiratuvar metabolizmaları sonucunda: 2,3-bis (2-metoksi-4-nitro-5-sülfonil 5-[(fenilamino) karbonil]-2H-tetrazolyum hidroksit tuzunu suda çözünebilen formazana indirgeyebilmektedir. XTT'nin metabolik indirgemeden sonra, süpernatanın absorbansının ölçülmesi ile biyofilm tabakasındaki canlı hücre sayısı tespit edilebilmektedir (Pantenella ve ark., 2013).
- 3) BioTimer assay (BTA): Biyofilmi oluşturan canlı bakterilerin sayısını belirlemede kullanılan kolorimetrik bir yöntemdir. BTA fenol kırmızısı içeren bir belirteç içermektedir. Bakterilerde fermentatif metabolizma sonucunda, belirtecin rengi kırmızıdan sarıya dönmektedir. Rengin değişimi sırasında geçen süre; bakteri konsantrasyonu ile ilişkilidir. Biyofilm tabakasının antimikrobiyal duyarlılık tespitinde kullanılabilen, ucuz, kolay bir yöntemdir (Pantenella ve ark., 2013).

2.2.5.3. Moleküler Yöntemler

Biyofilm değerlendirilmesinde kullanılan moleküler yöntemler şunlardır (Pantenella ve ark., 2013):

- 1) Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve kantitatif real time PZR yöntemleri: PZR biyofilm oluşumu ile ilişkili genlerin tespitinde kullanılmaktadır. Kantitasyon yapılamaması, canlı ve ölü hücreyi de ayıramaması dezavantajlarındandır. Ama

kantitatif real time PZR yöntemi ile bu dezavantajlar aşılmıştır ve şu an için çok güçlü ve duyarlı bir genetik analiz yöntemidir.

- 2) Floresans in situ hibridizasyon: Canlı hücredeki spesifik rRNA'ya ya da hedefe bağlanan floresan boyalı oligonükleotid problemleri kullanılmaktadır. Biyofilmi oluşturan birden fazla tür olması durumunda, bu yöntem uygulanabilir. Floresans in situ hibridizasyon tekniği; canlı hücreyi saptayabilmesine rağmen, düşük metabolizmaya sahip bakterileri tespit edememektedir.

2.2.5.4. Fiziksel Yöntemler

Biyofilm değerlendirilmesinde kullanılan fiziksel yöntemler aşağıdaki gibidir :

- 1) Kütle spektrofotometrisi (Mass spectrometry): Bu teknik sonucunda incelenen maddenin yapısı belirlenmekte, hem kalitatif hem de kantitatif sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu özellikleri sayesinde; çeşitli moleküllerin kimyasal özelliklerinin belirlenmesinde ve yapısı belirlenen materyalin kantitasyonunda kullanılan çok güçlü analitik bir tekniktir. Kütle spektrumu, örnekteki bileşiklerin kolaylıkla hareket edebilen iyonlara (çoğunlukla pozitif) dönüştürülmesi ve bu iyonların kütle/yük oranına göre sıralanmasıyla elde edilir. Elde edilen veriler maddenin kimyasal yapısıyla doğrudan ilişkilidir. (Pantenella ve ark., 2013).
- 2) Lazer taramalı konfokal mikroskop (Confocal laser scanning microscopy): Bu mikroskop araştırmacılara floresan veya yansıtıcı problemler ile işaretlenmiş biyofilm tabakası gibi oldukça kalın kesitler ile ya da çok küçük organizmalar ve bütün haldeki hücre örnekleri ile çalışma imkânı sağlamaktadır (Pantenella ve ark., 2013).
- 3) Konfokal Raman mikroskop (Confocal-Raman microscopy): Konfokal metotta aydınlatmanın ve bilgi toplamanın yapıldığı alan aynıdır ve 1 µm'den daha küçük çapa sahip yüzeyler analiz edilebilmektedir. Taramalı elektron

mikroskobu (scanning electron microscope) ve geçirimli elektron mikroskobu (transmission electron microscope) metodlarıyla karşılaştırdığında; daha basit, daha ucuz ve tahribatsız bir yöntemdir (Pantenella ve ark., 2013).

- 4) Elektron mikroskobisi (Electron microscopy): Elektron mikroskobu ile kısa dalga boyları ve yüksek enerjili radyasyon ile daha yüksek çözünürlükte görüntü sağlanabilmektedir. Taramalı elektron mikroskobu yüksek çözünürlüklü resim oluşturmak için vakum ortamında oluşturulan ve aynı ortamda elektromagnetik lenslerle inceltilen elektron demeti ile incelenecek malzemeyi analiz etme imkânı sunmaktadır. Geçirimli elektron mikroskobu ise çok ince bir örnek içinden geçirilen yüksek enerjili elektronların görüntülenmesi prensibine dayanmaktadır. Elektronların örnek ile etkileşimleri sonucu oluşan görüntü büyütülür ve floresans ekran, fotografik film katmanı gibi bir sensör üzerine odaklanır (Pantenella ve ark., 2013).
- 5) X-ray mikroskobisi: Çeşitli dalga boylarında X ışınlarının kullanıldığı teknikte çok yüksek çözünürlükte görüntü ve örneğin kompozisyonunun haritası elde edilebilmektedir. Çok pahalı ve kullanımının zor olması gibi özelliklerinin olması kullanımını sınırlamaktadır (Pantenella ve ark., 2013).
- 6) Tarayıcı uç mikroskobisi (Scanning probe microscopy) Numunenin yüzeyi nanometrik boyutlu bir prob ile taranmakta ve topografik olarak tanımlanmaktadır. Bu teknolojilerin arasında bakteri hücreleri ve biyofilm oluşumu gibi mikrobiyolojiyi ilgilendiren konularda en çok kullanılanı atomik kuvvet mikroskobudur (atomic force microscopy). Atomik kuvvet mikroskobu: yüksek çözünürlük (nanometre düzeyinde saptayabilme), incelenecek materyale zarar vermeden analiz edebilme, incelenecek numune hazırlığının kolay olması gibi özelliklere sahiptir (Dubrovin ve ark., 2012; Pantenella ve ark., 2013).

2.2.6. Slime Faktör Oluşumunun Gösterilmesi

2.2.6.1. Christensen Yöntemi (Kalitatif Tüp Testi)

Christensen ve arkadaşları tarafından bildirilmiştir. Tüpteki 5 ml soy buyyon besiyerine, incelenecek bakteriden öze ile birkaç koloni alınarak inoküle edilir ve 37°C’de 48 saat inkübasyona bırakılır. Inkübasyon süresi sonunda besiyeri boşaltılır ve boşaltılan her tüpe aynı miktarda boya maddesi (kristal viyole vb.) konur, yavaşça karıştırılır ve boya dökülür. Tüplerin kurumaları sağlandıktan sonra tüp çevresinde oluşan renk; koyuluk ve kalınlığına göre derecelendirilerek slime faktör oluşumu olarak değerlendirilir. Tüp testi değişken ve subjektif bir yöntemdir (Christensen ve ark., 1982).

2.2.6.2. Kongo Red Agar Yöntemi

Kongo red besiyeri; litrede 10 g agar, 50 g sukroz, 37 g beyin kalp infüzyon buyyonu ve 0.8 g Kongo kırmızısı boyası içerecek şekilde hazırlanır. KNS’lerin kongo red agara (KRA) tek koloni ekimleri yapılır. 37°C’de 24 saat inkübasyonun sonunda pembe ya da kırmızı koloni oluşturan suşlar slime faktör negatif, siyah koloni oluşturanlar ise slime faktör pozitif olarak değerlendirilir (Freeman ve ark., 1989).

2.2.7. Biyofilm Oluşturma Modelleri

Biyofilm oluşumunu araştırmak için hem in vitro hem in vivo modeller kullanılmaktadır. İn-vitro modeller de kendi içinde statik ve dinamik yöntemler olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Statik şartlarda biyofilm oluşturmak ve oluşumunu değerlendirmek için farklı yüzey özelliklerine sahip materyaller kullanılmıştır. Bu materyaller arasında 96 kuyucuklu mikropak (genellikle polistiren yapıdadır ve en sık kullanılan materyallerden birisidir), kateter disk, silikon elastomer, polivinilklorür ve cam boncuk bulunmaktadır (Pantanella ve ark., 2008; Coenye ve ark., 2011).

Biyofilm oluşturmak ve oluşumunu değerlendirmek için kullanılan dinamik sistemler arasında; silindirik selüloz filtre, perfüze biyofilm fermenter, Modifiye Robbins Gereci ve Calgary Biyofilm Gereci (Calgary Biofilm Device) gibi materyaller yer almaktadır (Ceri ve ark 1999; Pantanella ve ark., 2008; Coenye ve ark., 2011).

İn-vitro modellerde biyofilm ve konak immün sisteminin etkileşimi tam olarak yansıtılamaması, bu modellemenin en büyük dezavantajıdır ve bu aşamada in vivo deneylere ihtiyaç duyulmaktadır. İn vivo deneyler uygulaması zor ve zahmetli olmakla birlikte birçok uygulama alanı bulmuştur. Bu amaçla SVK enfeksiyonunu taklit etmek için deney hayvanlarında modeller geliştirilmiştir ve bu modellerde oluşturulan biyofilmlerin yapısal olarak in vitro biyofilmlere benzediği grlmştir (Andes ve ark., 2004; Coenye ve ark., 2011).

2.2.8. Biyofilm Oluşumu ile *icaADBC* Operonu ve IS256 Arasındaki İlişki

Polisakkarit yapıda olan polisakkarit intersellüler adezin (polysaccharide intercellular adhesion-PİA) sentezi gram pozitif ve gram negatif bakterilerde biyofilm oluşumundan sorumlu temel mekanizmayı oluşurmaktadır (Mack ve ark., 2009). PİA; zellikle *S. epidermidis*'in oluşturduğu biyofilmlerde hücreler arası adezyondan sorumlu en önemli bileşendir (Mack ve ark., 1992; 1994 ve 1996). Poli-N-süksinil-β-1–6 glikozamin (PİA-PNSG) yapıdaki polisakkarit tutunma matriksinin üretiminden intercellular adhesin (intersellüler adezin-*ica*)ADBC operonu ve hareketli insersiyon sekansı 256 (IS256) elemanı sorumludur (Heilmann ve ark., 1996; Gerke ve ark., 1998; Kozitskaya ve ark., 2004). *icaADBC* operonu; *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus caprae* suşlarında bulunmaktadır; ayrıca diğer KNS'lerde de operonun homolog sekansları saptanmıştır (Cramton ve ark., 1999; McKenney ve ark., 1999; Allignet ve ark., 2001; Moretro ve ark., 2003; Frank ve Patel, 2007).

icaADBC gen kümesinin; matriksin bakterilerin diğer bakterilere tutunarak çok tabakalı biyofilm oluşurma aşamasında, hücrelerin birbirine yapışmasını sağlamakta etkili olduğuna yönelik çalışmalar mevcuttur. Bu nedenle *icaADBC* gen kümesini

barındıran stafilokok suşlarının, potansiyel biyofilm üreticisi olduğu düşünülmektedir (Cramton ve ark., 1999; Mack ve ark., 2009; Szczuka ve ark., 2013). *icaADBC* gen ekspresyonunu etkileyen çok çeşitli faktör bulunmaktadır. Bunlardan birisi moleküler olarak nasıl düzenlendiği tam olarak bilinmemekle birlikte, IS256'nın operonun çeşitli bölgelerine insersiyonu ya da eksizyonudur (Ziebuhr ve ark., 1997; Diamond-Hernández ve ark., 2010).

icaAD; glikoziltransferaz aktivitesine sahiptir, *icaC*; polisakkaridin elongasyonu ve PİA sentezinin tamamlanması için gereklidir, *icaB*'nin ise deasetilaz aktivitesine sahip olduğu ve PİA'nın olgunlaşması için deasetilasyon yaptığı bilinmektedir (Gerke ve ark., 1998; Lappin-Scott ve Bass, 2001; Vuong ve ark., 2004).

icaA geninin UDP-N-asetilglukozaminden biyofilmin ana tabakasını oluşturan N-asetilglukozamin oligomerlerinin (PİA oluşumundan sorumludur) sentezinde yer alan N-asetilglukozamiltransferaz üretiminden sorumlu olduğu gösterilmiştir (Arciola ve ark., 2001; Gad ve ark., 2009; Costa ve ark., 2009). Kapsüler polisakkaritin fenotipik ifadesinde önemli olan N-asetilglukozamiltransferaz'ın maksimum ekspresyonunda ise *icaD* geninin rol oynadığı belirtilmektedir (Gad ve ark., 2009). Yapılan bazı çalışmalarda; *icaA* ve *icaD* genlerinin birlikte çalışarak şeker oligomerlerinin sentezine aracılık ettiği gösterilmiştir (Vasudevan ve ark., 2003).

2.2.9. Biyofilmin Antimikrobiyal Dirence Etkisi ve Tedavisi

Biyofilmin antimikrobiyallere karşı direnç geliştirmesinde konvansiyonel antibiyotik direncinden farklı mekanizmaların etkili olduğuna dair veriler bulunmaktadır. Biyofilm içine antibiyotiğin düşük orandaki penetrasyonu, yavaş üreme ve adaptif stres yanıtının oluşu, bakterinin çok aşamalı savunmasını oluşturmaktadır. Biyofilmi oluşturan mikroorganizmalar içerisinde farklı dirence sahip fenotipik varyantların ortaya çıkması, genel stres cevabının uyarılması, atım pompalarının devreye girmesi ve quorum sensing sistemlerinin etkin hale gelmesi gibi faktörler biyofilmin

antimikrobiyallere karşı geliştirdiği dirençten sorumlu olan mekanizmalardır (Stewart, 2002).

Biyofilm direncinde en önemli mekanizma; antibiyotiklerin biyofilme penetre olamamasıdır. Ekzopolisakkarit matriks antimikrobiyallerin biyofilm içindeki bakterilere difüzyonunu engellemektedir (Stewart ve ark., 1996). Biyofilm kalınlığı ile antibiyotiklere direnç gelişimi arasında lineer bir korelasyon olduğu da gözlenmiştir. Diğer bir mekanizma, biyofilmdeki mikroorganizmaların yavaş büyüme fazına girmeleridir. İhtiyaç duydukları besin maddelerinin ortamda azalmasıyla birlikte bakterilerin üremeleri yavaşlar ve aktif üreme fazının yavaşladığı forma geçerler (Costerton ve ark.,1995). Bu durumda da antibiyotiklerin bakterisidal etkilerini göstermeleri için ihtiyaç duydukları aktif üreme gösteren bakterilerin sayısının azalmasına bağlı olarak antimikrobiyal etkinlikte de azalma meydana gelmektedir (Stewart, 2002). En önemli üçüncü mekanizma da biyofilmin yapısında yer alan değişmiş kimyasal ortamdır. Bu kimyasal yapılar ya da ortamın pH'sında meydana gelen değişiklikler antimikrobiyal etkinliği üzerine olumsuz etki göstermektedir (Melchior ve ark., 2006).

Antibiyotiklerin subinhibitör konsantrasyonlarının KNS'lerde *icaADBC* operonuna olan etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, kinupristin/dalfopristin ve tetrasiklin sub-MİK konsantrasyonlarının bu genin etkisini artırdığı, dolayısıyla daha fazla adezin oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir (Götz, 2002). Başka bir çalışmada da vankomisin ve linezolidinin stafilokokların oluşturduğu biyofilmlerdeki bakteri miktarını azalttığı, ancak bu antibiyotiklerin yüksek konsantrasyonlarda uygulanmasına rağmen biyofilm oluşumunu tamamen öldüremedikleri saptanmıştır (Ceri ve ark., 1999; Wicox ve ark., 2001).

2.3. Stafilokoklarda Metisilin Direnç Mekanizmaları

Penisilinaza dirençli penisilinler stafilokokların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Yakın zamana kadar tedaviyi yönlendirmede rehberlerin öngördüğu yol, test edilen suşun disk difüzyon yöntemi ile oksasiline

dirençli olması halinde penisilinize dirençli penisilinlerin hepsine dirençli kabul edilmesi şeklinde olmakla birlikte, günümüzde sefoksitin duyarlılığı ve özgülüğünün daha iyi olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Ferreira ve ark., 2003; Swenson ve ark., 2005; Swenson ve ark., 2007; Marsik, 2011; Swenson ve ark., 2011) Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü'nün (Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI) 2014 yılı önerileri doğrultusunda KNS'lerde metisilin direncinin saptanmasında bugün için izlenen yol, sefoksitin diski kullanılarak Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile duyarlılık ölçümüdür. *S. lugdunensis*'in değerlendirimi *S. aureus* gibi yapılmakta ve Tablo 3.2'de belirtilen zon çaplarına göre duyarlılık belirlenmektedir. *S. lugdunensis* için ayrıca sefoksitin (4µg/ml konsantrasyonda) kullanarak sıvı mikrodilüsyon testi yapılması da önerilmektedir (CLSI 2014).

Metisiline dirençli stafilokok suşları metisilin klinik uygulamaya girmesinden kısa bir süre sonra tanımlanmıştır (Barber, 1961). Stafilokoklarda metisilin direnci; yeni bir penisilin bağlayıcı protein (PBP) olan PBP2a sentezi nedeniyle, aşırı beta laktamaz salgılanması sonucunda, mevcut PBP'lerde beta laktam antibiyotik afinitesinde azalma ile oluşabilir.

2.3.1.Yeni bir penisilin bağlayıcı protein; PBP2a sentezi ile metisilin direnci gelişmesi

Stafilokoklarda metisilin direnç mekanizmalarından en sık karşılaşılanı PBP2a adı verilen yeni bir PBP sentezlenmesidir. 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 aktarılabilir. *mecA* geni; regülasyonunu sağlayan *mecI* (represör gen) ve *mecRI* (sinyal dönüştürücü gen) genleriyle beraber SCC ismi verilen genetik yapının üzerinde taşınmaktadır (Hiramatsu ve ark., 2002; Ünal, 2004).

SCC; stafilokok türleri arasında genetik madde alışverişine aracılık eden hareketli bir elemandır. *mecA* geni SCC ailesinin metisilin direnci açısından özelleşmiş *SCCmec* olarak adlandırılan bir bölgesinde yer almaktadır (Chambers 1997; Hiramatsu ve ark., 2002; Hanssen ve ark., 2006).

2.3.1.1. *SCCmec* ve özellikleri

SCCmec, 21–67 kb büyüklüğünde bir DNA dizisi olup, kromozomda replikasyon başlangıcının (*oriC*) yakınındaki *orfX*'in 3' ucunda *attB_{SCC}* bölgesinde yer almaktadır. *SCCmec*'in replikasyon merkezine yakın bir bölgede yerleşmesi, antibiyotik direnç genlerini çabuk almasını sağlayarak bakteriye önemli bir avantaj kazandırmaktadır. *SCCmec*, *mec* gen kompleksi (*mecA* ve düzenleyici genler) ve *ccr* kompleksinden oluşmuştur. *mec* gen kompleksi metisilin direncinden sorumludur ve içerdikleri yapılara göre dört sınıfta incelenmektedir (Hiramatsu ve ark., 2002; Ito ve ark., 2003; Hanssen ve ark., 2006; Martins ve ark., 2007).

ccr gen kompleksi; *SCCmec* kasetininin mobilizasyonundan, bakteriyel genomu integrasyonundan ve eksizyonundan sorumludur. Ayrıca *ccrA*, *ccrB* ve *ccrC* olmak üzere üç farklı rekombinazı kodlamaktadır (Ito ve ark., 2003; Hanssen ve ark., 2006; Hiramatsu ve ark., 2002).

SCCmec elemanının diğer kısımlarında ise, *SCCmec* 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 ve farklı antibiyotiklere dirençten sorumlu transpozonlar yer almaktadır (Ito ve ark., 2001; Ma ve ark., 2002; Ito ve ark., 2001).

Günümüze kadar 11 farklı *SCCmec* tipi tanımlanmıştır. Tip I, tip II, tip III ve tip V Ito ve arkadaşları tarafından; tip IV Ma ve arkadaşları tarafından tarif edilmiştir (Ito ve ark., 2001, Ma ve ark., 2002, Ito ve ark., 2004). *SCCmec* tip VI, tip VII, tip VIII, tip IX, tip X ve tip XI International Working Group on the Classification of

Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC) tarafından tanımlanmıştır (IWG-SCC, 2009).

SCC*mec* tiplerinden, Tip I, II ve III genellikle hastane kökenli, Tip IV ve V ise toplum kökenli metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) suşlarında bulunmaktadır. Toplum kaynaklı suşlar; *mecA* dışında direnç geni taşımazlar. Eritromisine ve beta-laktamlara direnç tipik olarak sınırlıdır (François ve ark., 2004; Martins ve Cunha 2007).

SCC*mec* tiplerinin çeşitli özellikleri vardır:

SCC*mec* TipI; 34.364 bp büyüklüğünde olup, sınıf B *mec* gen kompleksi ve tipI *ccr* gen kompleksinden oluşmaktadır. Metisilin ve ağır metallerle karşı direnç geni taşımaktadır (Zhang ve ark., 2005; Martins ve Cunha, 2007).

SCC*mec* TipII; 53.017 bp büyüklüğünde olup, sınıf A *mec* gen kompleksi ve tipII *ccr* kompleksinden oluşmaktadır. Metisilin direnci oluşturan *mecA* ve *mecR1* genleri dışında, J bölgesinde pUB110 plazmidi (aminoglikozidlere karşı dirençten sorumlu) ve Tn554 transpozonu (makrolid, klindamisin ve streptogramin B'ye karşı dirençten sorumlu) taşımaktadır (Zhang ve ark., 2005; Martins ve Cunha, 2007).

SCC*mec* TipIII; 66.896 bp olup, sınıf A *mec* gen kompleksi ve tip III *ccr* gen kompleksinden oluşmaktadır. *mecA*, *mecR1* dışında pT181 plazmidi (tetrasiklin ve civaya karşı dirençten sorumlu), Tn554 transpozonu, pseudo Tn554 (kadmiyuma karşı dirençten sorumlu) taşımaktadır. Ayrıca diğer tiplerde bulunmayan *Yccr* geni içermektedir (Zhang ve ark., 2005; Martins ve Cunha, 2007).

SCC*mec* TipIV; *mecA* dışında direnç geni taşımayan bu SCC*mec* tipi; sınıf B *mec* gen kompleksi ve tip 2 *ccr* gen kompleksinden oluşmaktadır (Zhang ve ark., 2005; Martins ve Cunha, 2007).

SCC*mec* TipV; 27.624 bç olup, sınıf C *mec* gen kompleksi ile *ccrC* içermektedir ve sadece metisilin direnci kodlayan genlere sahiptir(Ito T ve ark., 2001; Zhang ve ark., 2005; Martins ve Cunha, 2007).

SCC*mec*Tip VI; sınıf B *mec* gen kompleksi ile tip4 *ccr* gen içermektedir (IWG-SCC, 2009).

SCC*mec* Tip VII; sınıf C1 *mec* gen kompleksi ile tip5 *ccr* gen (*ccrC*) içermektedir (IWGSCC, 2009).

SCC*mec*Tip VIII; sınıf A *mec* gen kompleksi ile tip4 *ccr* gen içermektedir (IWGSCC 2009).

SCC*mec*Tip IX; sınıf C *mec* gen kompleksi ile tip1 *ccr* gen içermektedir (IWGSCC 2009).

SCC*mec*Tip X; sınıf C *mec* gen kompleksi ile tip7 *ccr* gen içermektedir (IWGSCC 2009).

SCC*mec*Tip XI; sınıf E *mec* gen kompleksi ile tip8 *ccr* gen içermektedir (IWGSCC 2009).

Metisilin direncinin fenotipik olarak ortaya konması bakteriler arasında değişkenlik göstermektedir ve fenotipik olarak eksprese edilmesi, homojen ya da heterojen olmak üzere iki şekildedir. Homojen dirençte tüm bakteriler *mecA* genini taşırlar ve hepsinde *mecA* geni fonksiyoneldir. Homojen direnç çevresel faktörlerle ilişkili değildir. Heterojen dirençte ise; *mecA* geni taşımalarına rağmen, *mecA* dışındaki düzenleyici genetik elemanlarda mutasyon sonucu metisilin direncinin meydana gelebildiği düşünülmektedir. Heterojen direnç ortamın pH'sı, ısısı, tuz konsantrasyonu, inkübasyon süresi gibi çevresel faktörlerden etkilendiği için, bu tip direncin tespiti zor olmaktadır (Lencastre ve ark., 1991; Chambers, 1997; Ünal 2004; Gür, 2008).

2.3.1.2. Aşırı beta laktamaz salgılanması ile oluşan metisilin direnci

Bu tip dirençte, beta laktamazların aşırı salgılanması sonucunda metisilin kısmen parçalanmaktadır ve metisiline karşı duyarlılıkta azalma meydana gelmektedir. Bu direnç türünün görüldüğü suşun sebep olduğu enfeksiyonun tedavisinde; beta laktam antibiyotiklerin beta laktamaz inhibitörleriyle kombine edilerek kullanılması daha uygun olmaktadır (Rice ve ark., 2003).

2.3.1.3. Mevcut PBP’lerde beta laktam antibiyotik afinitesinde azalma ile oluşan metisilin direnci

mecA geni taşımadıkları halde metisiline dirençli stafilokoklar tespit edilmeye başlanmıştır. Bu suşların mevcut PBP’lerinin beta laktam antibiyotiklere düşük afinite gösterdikleri saptanmıştır (Rice ve ark., 2003; Ünal, 2004).

2.3.1. Metisilin Direncinin Tespiti

Metisilin direncinin tespitinde fenotipik (Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi, gradient test yöntemi, sıvı mikrodilüsyon yöntemi, agar tarama, lateks aglütinasyon otomatize sistemler) ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır.

2.3.2.1. Fenotipik Yöntemler

2.3.2.1.1. Kirby-Bauer Disk difüzyon Yöntemi:

Bakteri inokulum yoğunluğu 0.5 McFarland standardına eşdeğer olacak şekilde hazırlanır. Mueller Hinton agar (MHA) besiyerine eküvyon ile yoğun ekim yapılır ve sefoksitin diski yerleştirilir ve 35°C’de 16–18 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyon süresi bitiminde diskin etrafında oluşan zon çapı değerlendirilir (Tablo 3.2) (Turnidge ve ark., 2003; CLSI 2014).

2.3.2.1.2. Gradyent Test Yöntemi:

Bakteri süspansiyonu yine McFarland 0.5 standartında hazırlanır ve MHA'a eküvyon ile ekim yapılır. Oksasilin gradyent test şeridi yerleştirilip, 35°C'de 24 saat inkübe edilir. İnkübasyon süresi sonunda, elips şeklindeki inhibisyon alanının şeridi kestiği konsantrasyon MİK olarak belirlenir (Turnidge ve ark., 2003).

2.3.2.1.3. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi:

Bu yöntemde katyon eklenmiş Mueller-Hinton sıvı besiyeri kullanılmaktadır ve antibiyotik olarak sefoksitin tercih edilmektedir. CLSI önerileri doğrultusunda; bakterinin inokulum miktarı 5×10^5 kob/mL olarak ayarlanır ve 24 saat 35°C'de inkübasyona bırakılır. *S. aureus* ve *S. lugdunensis*'in oksasilin direnci tespitinde önerilmektedir. Değerlendirme aşamasında; MİK değeri ≤ 4 µg/mL olan suşlar duyarlı, ≥ 8 µg/mL olan suşlar ise dirençli olarak kabul edilmektedir (CLSI, 2014).

2.3.2.1.4. Agar Tarama Yöntemi:

Bu yöntemde, 6 mg/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. Herhangi bir koloni üremesi halinde; suş metisiline dirençli olarak kabul edilir. Testin duyarlılığı oldukça yüksektir ve *S. aureus* için önerilmektedir (Turnidge ve ark., 2003; CLSI 2014).

2.3.2.1.5. Kromojenik Yöntemler:

Kromojenik besiyerleri hedef mikroorganizmanın enzimlerinin kromojenik substratlarını içeren, mikroorganizmanın bu substratı kullanması ile renkli koloniler oluşturmasını sağlayan besiyerleridir. Son yıllarda MRSA'ların saptanmasında kromojenik enzimatik substratları içeren besiyerleri denenmektedir. Ancak yapılan çalışmalarda oldukça farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu konuda daha ileri çalışmalara

ihtiyaç duyulduğu belirtilmektedir (Stoakes ve ark., 2006; Loulergue ve ark., 2006; Özel ve ark., 2011).

2.3.2.1.6. Lateks Aglütinasyon Yöntemi:

Lateks aglütinasyon testi; PBP2a saptanmasını temel alan ve kısa sürede sonuç veren bir yöntemdir. Testin uygulanmasında; önce koloni süspansiyonlarından PBP2a ekstraksiyonu yapılmakta, daha sonra lateksle kaplanmış olan PBP2a monoklonal antikorlarla aglütinasyon saptanmaktadır (van Griethuysen ve ark.,1999; Udo ve ark., 2000; Velasco ve ark., 2005).

2.3.2.1.7. Otomatize Sistemler:

Otomatize sistemlerde antibiyotik duyarlılık test kartı, gram pozitif mikroorganizmaların otomatize kantitatif veya kalitatif duyarlılık testi için kullanılır. Antibiyotik duyarlılık sonuçları sistem tarafından 16–24 saat içinde verilmektedir. Otomatize sistemde *S. aureus* ve KNS'ler için oksasilin MİK değerleri genellikle CLSI önerileri doğrultusunda rapor edilmektedir.

2.3.2.1.8. Moleküler Yöntemler:

MRSA izolatlarının saptanmasında *mecA* geninin PZR temelli yöntemlerle araştırılması altın standart olarak kabul edilmektedir. Bununla birlikte, *mecA* geni bulunan, ancak bunu eksprese etmeyen duyarlı suşların bulunabileceği unutulmamalıdır (Bignardi ve ark., 1996; Swenson ve ark., 2005; Velasco ve ark., 2005).

2.4. Epidemiyolojik Tiplendirme Yöntemleri

Epidemiyolojik tiplendirme yöntemleri, epidemik izolatların yayılım kaynağını ve şeklini saptamada önemli olduklarından, özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonların engellenmesinde sürveyans çalışmalarının bir parçası olarak kullanılmaları

önerilmektedir. Tiplendirme yöntemleri; standardize edilmiş, duyarlı ve özgül olmalı ayrıca tekrar edilebilirliği ve ayırım gücü yüksek, uygulama ve değerlendirmesi kolay olmalıdır. Bu amaçla çeşitli fenotipik ve genotipik tiplendirme yöntemleri kullanılmaktadır (Andrei ve Zervos, 2006).

Çevresel seçici baskılardan etkilenme, antijen yapısının değişken olması, direnç modellerinin antibiyotik tedavisinden güçlü bir şekilde etkilenmesi, fenotipik özelliklerin her zaman eksprese olmayan genlerde kodlanabilmesi, bir tür içindeki her bir kökeni ayırt etmeye yeterli farklılıkların bulunmaması gibi nedenlerden dolayı fenotipik yöntemlerin duyarlılığı moleküler yöntemlere göre daha azdır (Derbentli ve ark., 2002). Moleküler yöntemlerin ayırım gücü daha yüksektir ve bu yöntemler birçok türe uygulanabilme avantajı sağlamaktadır (Andrei ve Zervos, 2006; Singh ve ark., 2006).

2.4.1. Moleküler Yöntemler

Çoklu lokus dizilim tiplendirmesi (multi-locus sequence typing–MLST), ribotipleme, kromozomal DNA'nın PFGE ile analizi ve daha geniş kapsamlı uygulanabilen moleküler biyolojik çoğaltma temelli yöntemler epidemiyolojik tiplendirme amacıyla kullanılmaktadır. Bugün için kullanılan altın standart yöntem PFGE' dir.

2.4.1.1. Değişken Alanlı Jel Elektroforezi (Pulsed Field Gel Electrophoresis-PFGE)

PFGE ilk kez 1983 yılında tarif edilmiş ve kısa bir sürede moleküler epidemiyolojik analizler arasında "altın standart" haline gelmiştir (Tenover ve ark., 1995). Geleneksel elektroforez teknikleri 50 kb üzerindeki DNA moleküllerinin jel içerisindeki elektroforetik göçüne izin vermemektedir (Gardiner, 1991). Kromozomal DNA'yı az sıklıkla kesen, dolayısıyla geleneksel agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilemeyecek kadar büyük DNA parçaları oluşturan restriksiyon enzimlerinin tanımlanması, alternatif metodlara gereksinim doğurmuştur

(Goering ve ark., 1997; Goering ve ark., 2006). Bu nedenle çeşitli elektroforetik teknikler tanımlanmıştır.

PFGE yönteminde geleneksel DNA izolasyon yöntemlerinden farklı olarak bütün DNA gereklidir. Bütün DNA elde etmek amacıyla; bakteriler düşük erime sıcaklığına sahip agaroz ile karıştırılır. DNA miktarının gözlenemeyecek kadar az veya "smearing" ve distorsiyona neden olacak kadar fazla olmaması için hücre konsantrasyonu belli değerler arasında [1×10^9 - 5×10^9 kob/ml (610 nm'de yaklaşık 0.5-1 absorbans aralığında)] hazırlanır (Goering ve ark., 2006). Agaroz kalıbı hazırlandıktan sonra bakteri hücre duvarları, enzim ve deterjanların yardımıyla parçalanır. Bu amaçla gram pozitif bakteriler için lizozim, lizostafin ve mutanolizin enzimleri; gram negatif bakteriler için ise proteinaz-K/deterjan karışımı kullanılmaktadır (Goering ve ark., 2006). Protein ve karbonhidrat gibi kontaminantları uzaklaştırmak için; agaroz kalıbı 50-55°C'de distile su ve TE [10mM Tris, 1mM EDTA (pH:7,5)] solüsyonu ile yıkanır. Agaroz içerisinde saf ve bir bütün halinde kalan kromozomal DNA, bir restriksiyon enzimi kullanılarak kesilir. Bakteriler arasındaki epidemiyolojik ilişkinin değerlendirilebilmesi için DNA kabul edilebilir bir sayı (10'dan az 25-30'dan fazla olmamalı) ve büyüklükte kesilmelidir (Tenover ve ark., 1995). Bakteri kromozomunun G+C içeriği, kromozom üzerindeki restriksiyon enzim kesim noktalarının dağılımını etkileyerek, oluşacak DNA bantlarının sayısı ve büyüklüğünü belirler. Kesme işleminden sonra agaroz dilimleri tarak dişine yerleştirilir ve çevresine jel dökülür. Böylece daha sıkı bir ilişki sağlanarak, agaroz dilimlerinin kırılma riski en aza indirilir, dolayısıyla daha keskin bant paternleri elde edilebilir. Hazırlanan elektroforez jeli, belirli aralıklarla yönü değiştirilen elektrik akımı sağlayan elektroforez düzeneğine konularak 10–2000 kb uzunluğundaki DNA parçalarının ayrımı sağlanır. Elektroforez işleminden sonra jel etidyum bromidle boyanarak, bant profilleri görünür hale getirilmektedir (Goering ve ark., 2006).

Restriksiyon profillerinin analizinde ilk yapılması gereken PFGE'deki ortak bant paternlerinin belirlenmesidir. Salgın izolatının profili diğer izolatların bantlarının sayısı ve büyüklükleri ile karşılaştırılır. Bakteri kromozomunda nokta mutasyon,

insersiyon ve delesyon gibi genetik olaylarla ortaya çıkan tek bir genetik değişiklik çok anlamlı bir epidemiyolojik değişim yaratmamaktadır. Tenover ve arkadaşlarının (1995) çalışmalarına göre, PFGE sonuçları, elde edilen paternlerdeki bant sayısı farkına bakılarak yorumlanmakta ve izolatların epidemiyolojik ilişkileri değerlendirilmektedir. Buna göre izolatlar; aynı izolat, yakın ilişkili izolat, muhtemelen yakın ilişkili izolat ve ilişkisiz izolat olarak sınıflandırmaktadır (Tenover ve ark., 1995).

2.4.1.1.1. Aynı İzolat

PFGE’de sayı ve büyüklükleri aynı bant paterni sergileyen bakterilerin genetik olarak aynı ve epidemiyolojik olarak ilişkili oldukları kabul edilmektedir. Tek bant farklılığı gösteren izolatların da klonal olarak ilişkili oldukları gösterilmiştir (Tenover ve ark., 1995).

2.4.1.1.2. Yakın İlişkili İzolat

Tek bir nokta mutasyon, insersiyon veya delesyon oluşması nedeniyle aralarında 2-3 bant farkı oluşan izolatlar yakın ilişkili olarak değerlendirilmekte ve epidemiyolojik olarak salgının bir parçası oldukları kabul edilmektedir (Tenover ve ark., 1995).

2.4.1.1.3. Muhtemel İlişkili İzolat

İnsersiyon veya delesyon ile restriksiyon bölgelerinin kazanımı veya kaybı gibi iki bağımsız genetik değişiklik meydana geldiğinde aralarında 4–6 bant farkı olan izolatlar oluşmaktadır. Çok sayıda hastanın kullanıldığı ve 3-6 aydan uzun bir süreyi kapsayan çalışmalarda bu gibi izolatlar sıklıkla gözlenebilmektedir (Tenover ve ark., 1995). Bu tür izolatlar muhtemel ilişkili izolatlar olarak değerlendirilmektedir. Ancak genetik olarak yakın ilişkili kabul edilmediklerinden, epidemiyolojik olarak ilişkili olma olasılıkları daha düşüktür (Tenover ve ark., 1995).

2.4.1.1.4. İlişkısız İzolat

DNA'sında meydana gelen üç ya da daha fazla genetik değışiklikten dolayı 7 ya da daha fazla bant farkı sergileyen bakteriler epidemiyolojik olarak ilişkısız izolatlar olarak kabul edilmektedir (Tenover ve ark., 1995).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Bakteri İzolatlarının Elde Edilmesi

Çalışmaya; Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Hastanesi Merkez Bakteriyoloji Laboratuvarı ve T.C. Sağlık Bakanlığı Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen SVK örnekleri ve bu örneklerin alındığı hastalara ait periferik kan örneklerinden izole edilen KNS suşları ile Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Hastanesi Merkez Bakteriyoloji Laboratuvarı'na gönderilen kateter takılı olmayan hastaların periferik kan kültürü örneklerinden izole edilen KNS suşları dâhil edilmiştir.

Çalışmanın kontrol grubunu oluşturmak amacıyla gönüllü sağlıklı hastane dışı bireylerin cilt floralarından alınan örneklerden izole edilen KNS suşları ile SVK ucu örnekleri ve kan örneklerinin gönderildikleri hastane kliniklerinde çalışan, sağlıklı, sağlık çalışanlarının burunlarından izole edilen KNS suşları kullanılmıştır.

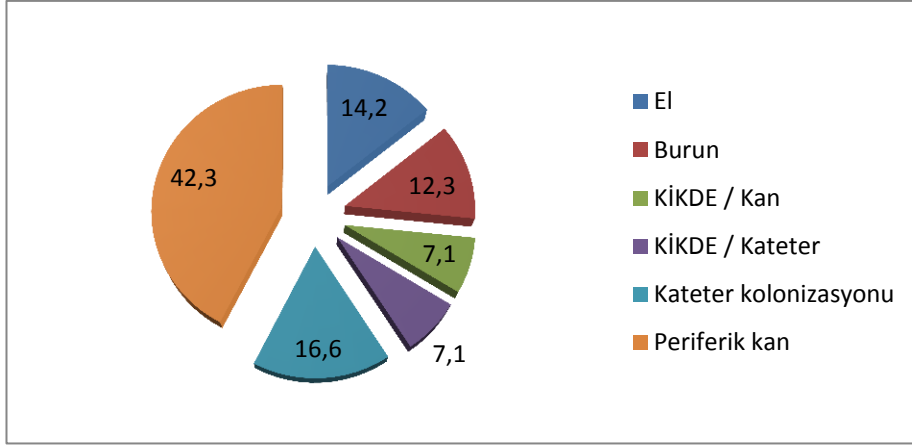
Çalışma etik kurul onayı almış ve sağlıklı gönüllülerden “bilgilendirilmiş gönüllü onam formu” alınmıştır.

Çalışmaya alınan suşların sayısı ve örneklere göre dağılımı Tablo 3.1 ve Şekil 3.1’de belirtilmiştir.

Tablo 3. 1. Çalışmaya alınan suşların örneklere göre dağılımı

Örnek		KNS n (%)
El (sağlıklı, hastane çalışanı olmayan gönüllüler)		30 (14.29)
Burun (sağlıklı, hastane çalışanı gönüllüler)		26 (12.38)
Kateter kolonizasyonu		35 (16.67)
KİKDE* etkeni	Kan	15 (7.14)
	Kateter	15 (7.14)
Periferik kan kültürü (kateteri olmayan hastalar)		89 (42.38)
Toplam		210 (100)

*Kateter İlişkili Kan Dolaşımı Enfeksiyonu



Şekil 3. 1. Çalışmaya alınan KNS sayılarının yüzde olarak örneklere dağılımı

3.1.1. Santral Venöz Kateter Örneklerinden Bakteri İzolasyonu

3.1.1.1. Semikantitatif (Maki) Kültür Yöntemi

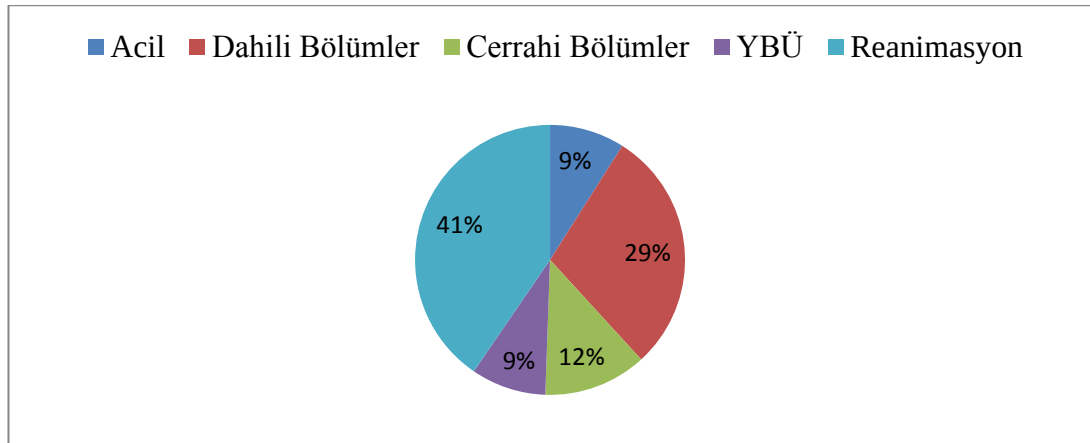
Steril koşullarda çekilen kateterin steril makas ile 5 cm'lik distal parçası kesilip, kuru steril bir tüp içerisinde laboratuvara gönderilmiştir. Kesilen kateter parçası steril penset yardımı ile dört-beş kez çevrilerek %5 KKA'ya ekim yapılmıştır. 37°C'de 24–48 saat inkübasyon sonunda 15 veya daha fazla bakteri koloni üremesi durumunda, üreyen bakterilere tiplendirim ve antibiyogram işlemleri uygulanmıştır (Maki ve ark., 1977; Bradley, 1996; Pearson, 1996; Mermel ve ark., 2001; Henderson 2000).

3.1.1.2. Tam Kantitatif Kültür Yöntemi

Kateter lümenindeki bakterileri değerlendirmek için, kesilen kateter parçasının içinden 1 ml beyin kalp infüzyon buyyonu geçirilmiş ve sonrasında bu besiyerinin 1/100'lük dilüsyonu hazırlanmıştır. Daha sonra dilüsyondan steril mikropipet ile 100'er mikrolitre alınıp KKA besiyerine ekim yapılmış ve 37°C'de 24–48 saat inkübe edilmiştir. Kültür plaklarında $\geq 10^3$ kob bakteri üremesi pozitif üreme olarak kabul edilmiş ve üreyen bakterilere tiplendirim ve antibiyogram işlemleri uygulanmıştır (Sherertz ve ark., 1990; Jordan ve ark., 1992; Reimer ve ark., 1994; Mermel ve ark., 2001; Afif ve ark., 2001).

3.1.2. Kan Kùltürlerinden Bakteri İzolasyonu

Hastalardan alınan periferik kan örneklerinin koyulduğu kan kùltürü şişeleri laboratuvarı BACTEC 9340 kan kùltür sistemine konulmuştur. İnkübasyon sırasında pozitif üreme sinyali veren örnekler cihazdan çıkarılmış; örneklerin Gram boyalı preparatları hazırlanarak, mikroskopik incelemeleri yapılmış ve KKA besiyerine pasajlanmıştır. Üreyen bakterilere tiplendirim ve antibiyogram işlemleri uygulanmıştır. Reanimasyon ünitesinden 36 (%40.45), dahili bölümlerden 26 (%29.21), cerrahi bölümlerden 11 (%12.36), YBÜ'lerden 8 (%8.99) ve acil servisten 8 (%8.99) adet olmak üzere toplam 89 KNS suşu elde edilmiştir. Periferik kan kùltürlerinden izole edilen KNS türlerinin bölümlere göre dağılımı Şekil 3.2'de izlenmektedir.



Şekil 3. 2. Periferik kan kùltürlerinden izole edilen KNS'lerin bölümlere göre dağılımı

3.1.3. Sağlıklı Kontrollerin Cilt Floralarından Bakteri İzolasyonu

“Bilgilendirilmiş gönüllü olur formu” imzalayan sağlıklı kontrollerin el floralarından eldiven yöntemi ile KNS izolasyonu yapılmıştır. Bu amaçla 10 ml steril fizyolojik tuzlu su konulan steril pudrasız cerrahi eldivenler bireylere giydirilmiştir. Eldiven üzerinden yapılan 1 dakikalık masajı takiben, eldiven çıkarılmış ve içindeki solüsyon steril bir tüpe aktarılmıştır. Bu solüsyonun 50 µl'si alınarak KKA'ya tek koloni ekimi yapılmıştır. 37°C'de 24 saatlik inkübasyonu takiben plaklar

değerlendirilmiştir. Üreyen bakterilere tiplendirim ve antibiyogram işlemleri uygulanmıştır (Kitao ve ark., 2010).

3.1.4. Sağlıklı Kontrollerin Burun Boşluklarından Bakteri İzolasyonu

“Bilgilendirilmiş gönüllü olur formu” imzalayan hastane çalışanı sağlıklı kontrol bireylerinin burun boşluklarından steril eküvyon ile sürüntü örneği alındıktan sonra, KKA’a tek koloni ekimi yapılmıştır. Plakların 37°C’de 24 saatlik inkübasyonunu takiben, oluşan koloniler değerlendirilmiş ve üreyen bakterilere tiplendirim ve antibiyogram işlemleri uygulanmıştır.

3.1.5. Kateter İlişkili Kan Dolaşım Enfeksiyonları Etkenlerinin Belirlenmesi

KİKDE bulguları ateş, üşüme, titreme, hipotansiyon, taşikardi ve lökositoz olarak tanımlanmaktadır. Bu bulguları gösteren ve başka enfeksiyon odağı saptanamayan hastalarda, kateter parçasından alınan örneğin ve periferik kan ile birlikte kateterden alınan kan örneğinin mikrobiyolojik incelenmesi sonucunda benzer biyotip ve direnç paternine sahip mikroorganizma ürediğinde; aşağıdaki kriterlerden birisi sağlandığı takdirde KİKDE olarak tanımlanmaktadır (Ulusoy ve ark., 2005):

1. Kateter ucunda yarı kantitatif kültürle ≥ 15 kob, kantitatif kültürle $\geq 10^3$ kob üreme olması
2. Kantitatif kültürlerde, kateterden alınan kanda olan üremenin, periferik venöz kana göre koloni sayısının 5–10 kat fazla olması
3. SVK’dan alınan kan kültüründeki üremenin, periferik venden alınan kan kültüründeki üremeden en az 2 saat önce olması

3.2. İzolatların Tiplendirimi

Üreyen mikroorganizmaların tür tayinleri konvansiyonel mikrobiyolojik yöntemler ve suşların toplandığı Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Hastanesi Merkez Bakteriyoloji Laboratuvarı’nda var olan Phoenix (Becton Dickinson, ABD) ve T.C.

Sağlık Bakanlığı Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda bulunan Vitek 2 (bioMerieux, Fransa) ve Bruker Microflex MS (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) otomatize tiplendirim sistemleri ile yapılmıştır.

KNS'lerin konvansiyonel yöntemle tiplendirmesi için öncelikle üreme olan plaklardaki kolonilerin görünüşleri incelenmiştir. KKA'da yuvarlak, düzgün, kabarık, mat, alfa ya da non-hemolitik, S tipi koloniler seçilmiştir. Bu kolonilerden hazırlanan Gram boyalı preparatların ışık mikroskobu ile incelenmesi sonucunda Gram pozitif, kümeler yapmış, üzüm salkımı görünümünde izlenen mikroorganizmalar stafilokok olarak kabul edilmiş ve ileri tiplendirmeye alınmıştır. Bu amaçla adi agar besiyerine pasaj yapılmış ve burada üreyen kolonilere katalaz testi uygulanmıştır. Katalaz olumlu olarak değerlendirilen kolonilerin *S. aureus*'dan ayrımını sağlamak için lam koagülaz testi yapılmıştır. Lam koagülaz testi negatif olarak değerlendirilen suşlar KNS olarak kabul edilip, bu suşlara tür tanımlanması ve antibiyogram işlemleri uygulanmıştır.

Katalaz Testi: Eritrositlerde var olan katalaz aktivitesi nedeniyle, adi agar besiyerinden lam üzerine alınmış koloniye %3'lük hidrojen peroksitten (H_2O_2) birkaç damla damlatılmış ve hava kabarcığının oluşması durumunda katalaz testi pozitif olarak kabul edilmiştir. Kontrol suşu olarak *S. aureus* ATCC 29213 kullanılmıştır.

Koagülaz testi: Gram pozitif kok olarak boyanan ve katalaz testi pozitif olan tüm izolatlar uygulanmıştır. KNS'lerin *S. aureus*'dan ayrımını sağlamak için koagülaz testi yapılmıştır. Bu test için temiz bir lam üzerinde FTS ile süspanse edilen bakteri kolonileri üzerine bir damla 1/5 oranında sulandırılmış tavşan plazması damlatılmış ve 10-30 saniye elde çevirme hareketi uygulanarak, bakteri kümeleşmesinin oluşmaması koagülaz negatif olarak değerlendirilmiştir. Lam koagülaz testinde pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 29213 suşu kullanılmıştır.

3.3. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Antibiyotik duyarlılık testleri için suşların toplandığı laboratuvarlarda bulunan Phoenix (Becton Dickinson, ABD) ve Vitek2 (bioMerieux, Fransa) otomatize tiplendirim sistemlerinden alınan sonuçlar, kontrol suşları için Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir. Vankomisin MİK değerini belirlemek için sıvı mikrodilüsyon yöntemi uygulanmıştır. Tüm sonuçlar CLSI 2014 kriterlerine göre yorumlanmıştır (CLSI, 2014).

3.3.1. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi

3.3.1.1. Gereçler

3.3.1.1.1. Besiyerleri ve Besiyerlerinin Hazırlanması

KKA besiyeri,

MHA besiyeri

Koyun Kanlı Agar Hazırlanması

Dehidrate besiyeri (Merck, Almanya), 40 g/L konsantrasyonda olacak şekilde distile su içinde ısıtılarak eritilip, otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. 50–55°C'ye soğutulup, %5 oranında defibrine koyun kanı ilave edilmiş, karıştırılıp petri plaklarına dökülmüştür.

Mueller Hinton Agar Hazırlanması

MHA (Merck, Almanya) 22 g tartılmış ve 1000 ml dH₂O ile tamamlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiş, soğuduktan sonra petri plaklarına dökülmüştür.

3.3.1.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler

Amoksisilin-klavulanik asit (AMC; 20/10 µg) (Oxoid, İngiltere),
Eritromisin (15 µg) (Oxoid, İngiltere),
Klindamisin (2 µg) (Oxoid, İngiltere),
Rifampisin (5 µg) (Oxoid, İngiltere),
Tetrasiklin (30 µg) (Oxoid, İngiltere),
Gentamisin (10 µg) (Oxoid, İngiltere),
Siprofloksasin (5 µg) (Oxoid, İngiltere),
Trimetoprim-sülfametoksazol (1.25 / 23.75 µg) (Oxoid, İngiltere),
Sefazolin (30 µg) (Oxoid, İngiltere),
Teikoplanin (30 µg) (Oxoid, İngiltere),
Sefoksitin (30 µg) (Oxoid, İngiltere)

3.3.1.1.3. Araçlar

Etüv (Heraus, Almanya)
Otoklav (Nüve, Türkiye)
Phoenix Spec Nephelometer (BD, Fransa)

3.3.1.2. Yöntem

Toplanan suşların süspansiyonu 0.5 McFarland standardına uygun olarak, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Hastanesi Merkez Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda bulunan PhoenixSpec Nephelometer (BD, Fransa) nefelometre cihazı kullanılarak hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyondan MHA besiyerine eküvyonla yoğun ekim yapılmıştır. Besiyeri plağına amoksisilin-klavulanik asit (AMC; 20/10 µg), eritromisin (15 µg), klindamisin (2 µg), rifampisin (5 µg), tetrasiklin (30 µg), gentamisin (10 µg), trimetoprim- sülfametoksazol (1.25 / 23.75 µg), sefazolin (30 µg), teikoplanin (30 µg) ve linezolid (30 µg) yerleştirilmiştir. Hazırlanan plaklar 35–37°C'de 18–24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyondan sonra zon çapları CLSI önerileri doğrultusunda değerlendirilmiştir. Zon çapları Tablo 3.2’de verilmiştir (CLSI, 2014).

Metisilin direncinin fenotipik olarak tespiti için plaklara sefoksitin (30 µg) diskleri yerleştirilmiş, direnç gösteren suşlar metisilin dirençli olarak kabul edilmiştir. Ayrıca sefoksitin dirençli suşlar CLSI 2014 önerileri doğrultusunda beta laktam ajanlarına, beta laktam-laktamaz inhibitör kombinasyonlarına da dirençli olarak kabul edilmiştir.

Tablo 3. 2. Kirby-Bauer Disk Difüzyon yönteminde kullanılan antibiyotiklerin KNS’ler için duyarlılık zon çapları (CLSI, 2014)

Antibiyotik	Duyarlı (mm)	Orta duyarlı (mm)	Dirençli (mm)
Sefoksitin (<i>S.lugdunensis</i>)	≥22		≤21
Sefoksitin (<i>S.lugdunensis</i> hariç)	>25	-	≤24
Gentamisin	≥15	13–14	≤12
Eritromisin	≥23	14–22	≤13
Klindamisin	≥21	15–20	≤14
Rifampisin	≥20	17–19	≤16
Tetrasiklin	≥19	15–18	≤14
Trimetoprim- sülfametoksazol	≥16	11–15	≤10
Siprofloksasin	≥21	16–20	<15
Teikoplanin	≥14	11–13	≤10
Linezolid	≥21	-	≤20

3.3.2. Çift Disk Testi (D test)

3.3.2.1. Gereç

3.3.2.1.1. Besiyerleri ve Besiyerlerinin Hazırlanması

Mueller Hinton Agar ve Hazırlanması

MHA (Merck, Almanya) 22 g tartılmış ve 1000 ml dH₂O ile tamamlanmıştır. Otoklavda 121°C’de 15 dakika sterilize edilmiş, soğuduktan sonra petri plaklarına dökülmüştür.

3.3.2.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler

Eritromisin (15 µg) (Oxoid, İngiltere),
Klindamisin (2 µg) (Oxoid, İngiltere)

3.3.2.1.3. Araçlar

Etüv (Heraus, Almanya)
Otoklav (Nüve, Türkiye)
Phoenix Spec Nephelometer (BD, Fransa)

3.3.2.2. Yöntem

Antibiyotik duyarlılık sonuçlarına göre eritromisine dirençli ve klindamisine duyarlı olarak değerlendirilen KNS suşlarının indüklenabilir klindamisin direnç fenotipi (iMLSB) eritromisin (15 µg) ve klindamisin (2 µg) disklerinin kullanıldığı D testi ile CLSI'da belirtilen kriterlere göre saptanmıştır (CLSI, 2014). PhoenixSpec Nephelometer (BD, Fransa) nefelometre cihazı kullanılarak 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonundan yoğun ekim yapılan MHA üzerine 15–26 mm arayla diskler yerleştirilmiştir. Plaklar 35°C'de 18–24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda diskler etrafındaki inhibisyon zonu ölçülmüş ve klindamisin inhibisyon zonunda iki disk arasında eritromisin diskine yakın olan kısımda düzleşme görülürse, iMLSB fenotipi direnç; indüklenmiş klindamisin dirençli, eritromisine dirençli klindamisine duyarlı olarak saptandığında ise MS fenotipi direnç olarak değerlendirilmiştir.

3.3.3. Vankomisin için Mikrodilüsyon Yöntemi İle Minimum İnhibitör Konsantrasyonun Tespit Edilmesi

3.3.3.1. Gereç

3.3.3.1.1. Besiyerleri

%2 oranında NaCl içeren katyon ayarlı Mueller Hinton Broth (BBL, Fransa)

3.3.3.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler

Otoklavlanmış ultra saf su (ddH₂O)

Vankomisin hidroklorid V-2002-100mg (Sigma-Aldrich, ABD)

3.3.3.1.3. Araçlar

Spektrofotometre (BioTek, ABD)

Phoenix Spec Nephelometer (BD, Fransa)

Çok kanallı pipet (Thermo, Almanya)

Ayarlı, hacimli otomatik pipetler (Thermo, Almanya)

Steril filtreli pipet uçları 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl (Ratiolab, Almanya)

Manyetik karıştırıcı (WTW Inolab, ABD)

Hassas terazi (Mettler- Toledo, İsviçre)

Mikrosantrifüj tüpleri 1.5 ml (Greiner Bio-One, Almanya)

96 kuyucuklu U tabanlı mikropalak (Santa Cruz Biotechnology Inc, ABD)

50 ml'lik enjektör (Greiner Bio-One, Almanya)

15 ml'lik falcon tüp (Greiner Bio-One, Almanya)

Etüv (Heraeus, Almanya)

Derin dondurucu (-20°C) (Regal, Türkiye)

Otoklav (Nüve, Türkiye)

3.3.3.2. Yöntem

Mikrodilüsyon ile MİK belirlenmesi CLSI M27-A3 standartlarına göre yapılmıştır. Kontrol suşu olarak *S. aureus* ATCC 29213 kullanılmıştır.

Başlangıç konsantrasyonunu 128µg/mL olacak şekilde ayarlayabilmek için toz vankomisin stok solüsyonu 512 µg/mL olacak şekilde hazırlanmıştır. Bunun için; 0,0512g vankomisin tartılıp, 1 mL distile su ile dilüe edilmiş ve bu ana stok 100'er mikrolitrelik hacimlere bölünerek, -20°C' de saklanmıştır.

3.3.3.2.1. Vankomisin Stok Solüsyonunun Hazırlanması

0,0512g vankomisin tartılıp, 1 ml distile suya konulmuştur (51200 µg/ml'lik süspansiyon elde edilmiştir)

↓
Distile su ile 1/10 oranında sulandırılmıştır

5120µg/ml $\Longrightarrow$ Stok olarak -20°C'de saklanmıştır

3.3.3.2.2. Vankomisinin Mikroplak Kuyucuklarına Dağıtılması

1. Stok solüsyondan 100 µL alınıp, 900 µL distile su ile karıştırılmış ve 1/10 oranında seyreltilmiştir. Böylece toplam 1 ml hacimde 512 µg/ml ilaç konsantrasyonuna ulaşılmıştır.
2. Mikroplağın bütün kuyucuklarına 100'er µL katyon ilaveli Mueller Hinton Broth II (MHBII) konulduktan sonra, hazırlanan konsantrasyondaki vankomisin solüsyonu, mikroplağın her sırasındaki ilk kuyucuklara 100'er µL olarak dağıtılmıştır. Böylece bu sıradaki kuyucuklardaki 256 µg/ml ilaç konsantrasyonuna ulaşılmıştır.
3. Daha sonra 1. kuyucuktan 2. kuyucuğa, 2. kuyucuktan 3. kuyucuğa 100'er µl'lik aktarımlarla seri sulandırım yapılarak, kuyucuklarda 256 µg/ml;

128 µg/ml; 64 µg/ml; 32 µg/ml; 16 µg/ml; 8 µg/ml; 4 µg/ml; 2 µg/ml; 1 µg/ml; 0.5 µg/ml; 0.25 µg/ml; 0.125 µg/ml konsantrasyonlarına ulaşılmıştır. Her sıranın son kuyucuğu mikroorganizma üreme kontrolüne ayrılacağından, ilaç konulmamıştır (Şekil 3.3).

4. Üzerlerine aşağıda anlatıldığı şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonundan 100'er µl eklenmiştir (birinci kuyucuklardaki konsantrasyon 128µg/ml olmuştur).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	Üreme Kontrolü
B	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	Üreme Kontrolü
C	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	Üreme Kontrolü
D	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	Üreme Kontrolü
E	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	Üreme Kontrolü
F	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	Üreme Kontrolü
G	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	0,5 µg/ml	0,25 µg/ml	0,125 µg/ml	Üreme Kontrolü
H	Sterilite Kontrol	Sterilite Kontrol	Sterilite Kontrol	Sterilite Kontrol	Sterilite Kontrol	Sterilite Kontrol	Sterilite Kontrol	Sterilite Kontrol	Sterilite Kontrol	Sterilite Kontrol	Sterilite Kontrol	Sterilite Kontrol

Şekil 3. 3. U tabanlı mikropalak kuyucuklarındaki ilaç miktarları, üreme kontrol ve sterilite kontrol kuyucuklarının şematik olarak gösterilmesi

*A,B,C,D,E test edilecek KNS suşları; F: pozitif kontrol; G: negatif kontrol

3.3.3.2.3. Mikropalak Kuyucuklarına Konulacak Bakteri İnokulum

Süspansiyonunun Hazırlanması

Besiyeri olarak katyon ayarlı MHB II besiyeri kullanılmıştır. MİK değeri hesaplanacak suşların MHA pasajları yapılmış ve 37°C'de 24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır.

MHA'da üretilen izolatlar 4 ml steril fizyolojik tuzlu su içerisinde McFarland standart bulanıklığı Phoenix Spec Nephelometer (BD, Fransa) cihazı ile 0.5

McFarland olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu süspansiyondan 50 µl alınarak, 4950 µl MHB II içerisine konulmuştur. Böylece 1/100 oranında sulandırım yapılarak, son inokülüm konsantrasyonu 5×10^5 kob/ml olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan bu süspansiyondan 100'er µl, mikroplağın sterilite kucukları hariç diğer tüm kuyucuklarına konulmuştur.

Hazırlanan mikropalaklar 37°C'de 24 saat inkübe edilmiş ve ertesi gün sonuçları hem gözle hem de spektrofotometrede (BioTek, ABD) 570 nm dalga boyunda değerlendirilmiştir. Her iki sonuç birlikte yorumlanarak, her sırada üremenin olmadığı ilk kuyucuk MİK olarak saptanmıştır. Her suş üç kere çalışılmıştır ve her plağa pozitif kontrol suşu konulmuştur.

Tablo 3. 3. KNS'lerde vankomisin için MİK Değerleri (CLSI, 2014)

	Duyarlı	Orta Duyarlı	Dirençli
Vankomisin	≤ 4 µg/ml	8–16 µg/ml	≥ 32 µg/ml

3.4. Koagülaz Negatif Stafilokok Suşlarından DNA Eldesi

3.4.1. Gereç

3.4.1.1. Besiyerleri

Koyun Kanlı Agar Hazırlanması

Dehidrate besiyeri (Merck, Almanya), 40,0 g/L konsantrasyonda olacak şekilde distile su içinde ısıtılarak eritilip, otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. 50–55°C'ye soğutulup, %5 oranında defibrine koyun kanı ilave edilmiş, karıştırılıp petri plaklarına dökülmüştür.

3.4.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler

ddH₂O

Tris HCl (Applchem, Almanya)

NaCl (Merck, Almanya)

EDTA [pH: 8,0](Applchem, Almanya)

Lizostafin (Applchem, Almanya)

Qiagen DNA mini kit (Qiagen, Almanya)

3.4.1.3. Kullanılan Solüsyonlar

Lizis Solüsyonu (pH 8.0)

20 mM Tris HCl (Applchem, Almanya)

140 mM NaCl (Merck, Almanya)

5 mM EDTA (Applchem, Almanya)

3.4.1.4. Araçlar

Çok kanallı pipet (Thermo, Almanya)

Ayarlı, hacimli otomatik pipetler (Thermo, Almanya)

Steril filtreli pipet uçları 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl (Ratiolab, Almanya)

Manyetik karıştırıcı (WTWInolab, ABD)

Hassas Terazî (WTWInolab, ABD)

Etüv (Heraeus, Almanya)

Öze (1µl'lik)

3.4.2.Yöntem

PZR kullanılacak bakteri DNA'sının elde edilmesi için; her bir suşun KKA besiyerinde bir gecelik kültürünü takiben bir öze (1µl'lik) dolusu koloni 100 µl lizis solüsyonu içerisine toplanmıştır. Solüsyona 3 U lizostafin eklenerek 37°C'de 4 saat

bekletildikten sonra ekstraksiyon işlemine Qiagen DNA mini kit (Qiagen, Almanya) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda devam edilmiştir.

3.5. PZR Yöntemi ile *mecA* Geni Varlığının Araştırılması

3.5.1. Gereç

3.5.1.1. Sarf Malzemeleri

Steril 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri (Orange Scientific, Belçika)

Steril PZR tüpü 0.2 ml (Orange Scientific, Belçika)

Ayarlı, hacimli otomatik pipetler (Thermo, Almanya)

Steril filtreli pipet uçları 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl (Ratiolab, Almanya)

Lateks muayene eldiveni (Dolphin, Türkiye)

3.5.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler

Taq DNA Polimeraz (Fermentas, Lituanya)

10x PZR Buffer (Fermentas, Lituanya)

10 mM MgCl₂ (Fermentas, Lituanya)

dNTP Karışımı (Fermentas, Lituanya)

mecA primerleri (Thermo, Almanya)

Moleküler grade agaroz (Vivantis, Malezya)

Etidyum bromid (Applichem, Almanya)

Loading dye solution – yükleme solüsyonu (Fermentas, Lituanya)

Gene Ruler 50bp DNA Ladder, ready-to-use, 50-1000 bp, (Fermentas, Lituanya)

3.5.1.3 Araçlar

Santrifüj (Eppendorf, Almanya)

Vorteks (HVD, Avusturya)

Termal döngü cihazı (Techne, İngiltere)

Hassas terazi (Mettler- Toledo, İsviçre)

Mikrodalga fırın (Vestel, Türkiye)

Elektroforez tankı (Thermo, Almanya)

Elektroforez güç kaynağı (Bio-Rad, ABD)

UV transillüminatör (Vilber –Lourmat TFX–20.M [ETX–20 M], Fransa)

Fotoğraf makinesi (Canon Power Shot G5, Kanada)

3.5.2. Yöntem

3.5.2.1. PZR yöntemi

mecA geninin saptanması amacıyla Tablo 3.4'te gösterilen *mecA* primer dizileri ve PZR programı kullanılmıştır (Geha ve ark., 1994). PZR karışımı ve döngü koşulları için Geha ve arkadaşlarının (Geha ve ark., 1994) çalışmalarındaki yöntemler modifiye edilerek uygulanmış ve aşağıda gösterilmiştir.

Tablo 3. 4. *mecA* geninin saptanması amacıyla kullanılan primer dizileri

Gen	Primer Dizisi	PZR ürününün büyüklüğü (bp)	Kaynak
<i>mecA</i>	5'-GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATA A-3' 5' -CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA A -3'	310	Geha ve ark., 1994

<i>mecA</i> PZR Protokolü için Reaksiyon Karışımı	N
dH ₂ O	×N
10x Taq tamponu +KCl	2.5 µl×N
dNTP	2.5 mM×N
MgCl ₂	2 mM×N
<i>mecA</i> F primer	10pmol×N
<i>mecA</i> R primer	10 pmol×N
Taq polimeraz	2.5 U×N
DNA	3 µL×N
TV	50 µl×N

mecA geninin çoğaltılması için PZR Programı

Başlangıç denatürasyonu.....	94 °C' de 5dakika	
Denatürasyon aşaması	94 °C' de 30 saniye	} 30 döngü
Primer yapışması (annealing).....	55°C' de 30 saniye	
Sentez (uzama) aşaması.....	72 °C' de 30 saniye	
Son uzama.....	72 °C' de 10 dakika	

3.5.2.2. Agaroz Jel Hazırlanması ve PZR Ürününün Agaroz Jel Elektrofrezinde Saptanması

mecA geni için PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde değerlendirilmiştir. Agaroz jel için 1,6 g moleküler grade agaroz (Vivantis, Malezya) 0.5 x TBE (Tris-borik asit-EDTA) ile 80 ml'ye tamamlanmıştır. TBE 0.5 x solüsyonu; TBE 5 x solüsyonunun 1/10 oranında ddH₂O ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. TBE içerisine alınan agaroz mikrodalga fırında (Beko, Türkiye) kaynatılmıştır. Soğuduktan sonra üzerine etidyum bromidin (Applichem, Almanya) %5'lik stok solüsyonundan 3µl ilave edildikten sonra iyice karıştırılmış ve uygun taraklar konulmuş jel tabağına (Thermo, Almanya) dökülmüştür. Agarozun donması için yaklaşık 45 dk bekleme süresinde sonra, jel tabağıyla birlikte elektroforez tankına (Thermo, Almanya) yerleştirilmiştir. Elektroforez tankı 0.5 x TBE solüsyonu ile jelin üstünü kapatacak şekilde doldurulmuştur. PZR ürünlerinden 6µl alınarak temiz bir parafilm (Parafilm, Chicago, ABD) üzerinde 3µl yükleme solüsyonu (Fermentas, Lituanya) ile karıştırılmış ve jel üzerinde tarağın çıkarılmasıyla açılan kuyucuklara yüklenmiştir. 1 saat 100 V elektrik akımına tabi tutulup, elektroforez işiemi uygulandıktan sonra, 312 nm'de UV transillüminatör (Vilber-Lourmat TFX-20.M [ETX-20 M], Fransa) ile değerlendirilmiştir. Elde edilen bantlar fotoğraf makinesi (Canon Power Shot G5, Kanada) ile görüntülenmiştir. Amplifikasyon ürünlerinin büyüklüklerinin değerlendirilmesinde belirteç olarak Gene Ruler DNA Ladder 50bç, ready-to-use, 50-1000 bç, (Fermentas, Lituanya) kullanılmıştır.

3. 6. *mecA* Pozitif Olan Suşlara Stafilocokkal Kaset Kromozom (Staphylococcal Casette Chromosome-SCC)*mec* Tiplendiriminin Yapılması

3.6.1. Gereç

3.6.1.1. Sarf Malzemeleri

Steril 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri (Orange Scientific, Belçika)

Steril PZR tüpü 0.2 ml (Orange Scientific, Belçika)

Ayarlı, hacimli otomatik pipetler (Thermo, Almanya)

Steril filtreli pipet uçları 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl (Ratiolab, Almanya)

Lateks muayene eldiveni (Dolphin, Türkiye)

3.6.1.2. Kimyasal Malzemeler

Taq DNA Polimeraz (Fermentas, Lituanya)

PZR Master Mix 2x (Fermentas, Lituanya)

mecA primerleri (Thermo, Almanya)

Moleküler grade agaroz (Vivantis, Malezya)

Etidyum bromid (Applchem, Almanya)

Loading dye solution-yükleme solüsyonu 1x (Fermentas, Lituanya)

Gene Ruler 100 bp plus DNA Ladder, ready-to-use, 100-3000 bp, (Fermentas, Lituanya)

3.6.1.3. Araçlar

Santrifüj (Eppendorf, Almanya)

Vorteks (HVD, Avusturya)

Termal döngü cihazı (Techne, İngiltere)

Hassas terazi (Mettler- Toledo, İsviçre)

Mikrodalga fırın (Vestel, Türkiye)

Elektroforez tankı (Thermo, Almanya)

Elektroforez güç kaynağı (Bio-Rad, ABD)

UV transillüminatör (Vilber-Lourmat TFX-20.M [ETX-20 M], Fransa)

Fotoğraf makinesi (Canon Power Shot G5, Kanada)

Güvenlik Kabini Class II (Teknomar, Türkiye)

3.6.2. Yöntem

3.6.2.1. PZR Yöntemi

İzolatların SCCmec tiplendirimleri (Kondo ve ark., 2007) yöntemi esas alınarak yapılmıştır. mA1, mA2, α1, α2, α3, βc, α4.2, β4.2, γR ve γF genlerine ait primerler son hacimleri 10 pmol olacak şekilde sulandırılarak M-PZR 1’de kullanılmıştır. m16, IS7, IS2 ve mA7 genlerine ait primerler son hacimleri 10pmol olacak şekilde sulandırılmış ve M-PZR 2’de kullanılmıştır.

SCCmec tiplendirmesinde kullanılan primerlerin listesi Tablo 3.5’de verilmiştir (Kondo ve ark., 2007).

3.6.2.1.1. Multipleks PZR İçin Amplifikasyon Karışımlarının Hazırlanması

PZR reaksiyonu için karışım ve PZR döngüleri aşağıda gösterilmiştir:

M-PZR 1 PZR Protokolü için Reaksiyon Karışımı	N
dH ₂ O.....	10µl × N
PZR Master Mix 2x	12.5 µl × N
M-PZR 1 primer karışımı.....	4 µl × N
Taq polimeraz.....	0.5µl × N
DNA.....	3 µL × N
Toplam Hacim	25µl

M-PZR 2 PZR Protokolü için Reaksiyon Karışımı**N**

dH ₂ O	10 µl × N
PZR Master Mıx 2x	12.5 µl × N
M-PZR 2 primer karışımı	4 µl × N
Taq polimeraz	0.5µl × N
DNA	3 µL × N
ToplamHacim	25µl

SCC*mec* tiplendirilmesi için kullanılan PZR döngüleri Tablo 3.6’da verilmiştir.

Tablo 3. 5. SCC*mec* moleküler tiplendiriminde kullanılan primerler

	Gen	Oligonükleotid sekansı (5’-3’)	Amplikon büyüklüğü (bp)	SCC <i>mec</i> tipleri	Hedeflenen gen bölgesi
ccr gen kompleksi için düzenlenen M-PZR 1	mA1	TGCTATCCACCCTCAAACAGG	286	Tip II	<i>mecA</i> (mA1-mA2)
	mA2	AACGTTGTAACCAACCAAGA			
	α1	AACCTATATCATCAATCAGTACGT	695	Tip I	<i>ccrA1-ccrB</i> (α1- βc)
	α2	TAAAGGCATCAATGCACAAACACT	937	Tip II	<i>ccrA2-ccrB</i> (α2- βc)
	α3	AGCTCAAAAGCAAGCAATAGAAT	1791	Tip III	<i>ccrA3-ccrB</i> (α3- βc)
	βc	ATTGCCTTGATAATAGCCITCT		Tip I, Tip II TipIII	
	α4.2	GTATCAATGCACCAGAACTT	1287	TipIV	<i>ccrA4-ccrB4</i> (α4.2-β4.2)
	β4.2	TTGCGACTCTCTTGCGGTTT		TipIV	
	γR	CCTTTATAGACTGGATTATTCAAAATAT	518	Tip V SCC mercury	<i>ccrC</i> (γR-γF)
	γF	CGTCTATTACAAGATGTTAAGGATAAT		Tip V SCC mercury	
<i>mec</i> gen kompleksi için düzenlenen M-PZR 2	m16	CATAACTTCCCATTCTGCAGATG	1963	Tip II	<i>mecA-mecI</i> (mA7-m16)
	IS7	ATGCTTAATGATAGCATCCGAATG	2827	Tip I	<i>mecA-IS1272</i> <i>mecA</i> (mA7-IS7)
	IS2 (iS-2)	TGAGGTTATTGAGATATTTGATGT	804	Tip V	<i>mecA-IS431</i> upstream of <i>mecA</i> (mA7-IS2{iS-2})
	mA7	ATATACCAAACCCGACAACTACA			

Tablo 3. 6. SCCmec tiplendirilmesi için kullanılan PZR döngüleri

<u>PZR döngüleri</u>	<u>M-PZR 1</u>	<u>M-PZR 2</u>
Başlangıç denatürasyonu	94 °C' de 2dakika	94 °C' de 2dakika
Denatürasyon aşaması	94 °C' de 2 dakika	94 °C' de 2 dakika
Primer yapışması (annealing)	57 °C' de 1 dakika döngü	60°C' de 1 dakika döngü
Sentez (uzama) aşaması	72 °C' de 2 dakika	72 °C' de 2 dakika
Son uzama	72 °C' de 2 dakika	72 °C' de 2 dakika

3.6.2.2. Agaroz Jel Hazırlanması ve PZR Ürününün Agaroz Jel Elektrofrezinde Saptanması

PZR ürünleri elektroforez ile 0.5x TBE tamponu içinde 0.5µl etidyum bromid içeren %2'lik agaroz jelde yürütüldükten sonra UV transillüminatör (Vilber–Lourmat TFX–20.M [ETX–20 M], Fransa) ile görüntülenmiştir. Amplifikasyon ürünlerinin büyüklüklerinin değerlendirilmesinde 100 bç'lik DNA büyüklük belirteci [Gene Ruler 100 bç plus DNA Ladder, 100-3000 bç, (Fermentas, Lituanya)] kullanılmıştır.

3.7. Biyofilm Deneyleri

Suşların biyofilm oluşturma yetenekleri mikropalak yöntemi ile kantitatif olarak gösterilirken, slime faktör oluşumlarına da KRA yöntemi ile fenotipik olarak bakılmıştır. İki yöntem ile elde edilen veriler karşılaştırılmıştır.

3.7.1. Mikropalak Yöntemi ile Biyofilm Oluşumunun Kantitatif Olarak Değerlendirilmesi

3.7.1.1.Gereç

3.7.1.1.1.Kimyasal Madde ve Malzemeler

Glukoz (Sigma- Aldrich, ABD)

Triptik soy broth (Merck Almanya)

Etanol (Sigma- Aldrich, ABD)

Metanol (Sigma- Aldrich, ABD)

Tamponlu tuz çözeltisi (Phosphate Buffered Saline - PBS) (Sigma- Aldrich, ABD)

Kristal viyole (Sigma- Aldrich, ABD)

3.7.1.1.2. Araçlar

Phoenix Spec Nephelometer (BD, Fransa)

96 kuyucuklu düz tabanlı mikroplak (Piove di Sacco, İtalya)

Çok kanallı pipet (Thermo, Almanya)

Ayarlı, hacimli otomatik pipetler (Thermo, Almanya)

Steril filtreli pipet uçları 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl (Ratiolab, Almanya)

Steril 15ml'lik falkon tüp (Isolab, Almanya)

Spektrofotometre (BioTek, ABD)

Vorteks (HVD, Avusturya)

3.7.1.2. Yöntem

Suşların stok kültürlerinden KKA besiyerine ekim yapılarak, 24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. İzolatların saf kültür halinde oldukları doğrulandıktan sonra, aynı morfolojik özellikleri gösteren birkaç koloni seçilerek, steril fizyolojik tuzlu su içerisinde süspanse edilmiştir. Süspansiyonun bulanıklığı PhoenixSpec Nephelometer (BD, Fransa) nefelometre cihazında 0.5 McFarland (10^8 kob/ml) standardına ayarlanmıştır. Elde edilen süspansiyon 1 dakika süre ile vortekslenmiştir (Vorteks cihazı, HVD, Avusturya). Hazırlanan bu bakteri süspansiyonunun 20 µl'si steril 96 kuyucuklu düz tabanlı mikroplak (Piove di Sacco, İtalya) kuyucuklarına aktarılmıştır. Üzerlerine %1 glukoz ilave edilmiş 180 µl triptik soy buyyon (TSB) eklenerek 24 saat süre ile 37°C'de inkübe edilmiştir. Ertesi gün mikroplak boşaltılıp, 3 kez 200 µl fosfat tamponlu tuz çözeltisi (phosphate buffered saline - PBS) ile yıkanarak tutunmayan bakteriler uzaklaştırılmıştır. Plaklar ters çevrilerek havada kurumaya bırakılmış, sonrasında kuyucukların içine 200 µl metanol konularak 20 dakika süre ile biyofilm oluşturan bakterilerin fiksasyonu sağlanmıştır. Fiksasyonu takiben metanol boşaltılmış ve plaklar oda ısısında bir gece süre ile ters çevrilerek

havada kurumaya bırakılmıştır. Ertesi gün tutunan bakteriler 150µl %0.5'lik kristal viyole ile 15 dakika süre boyunca boyanmış, sonrasında pipetle üzerlerindeki boya çekilerek, steril fizyolojik tuzlu su ile 3 kez yıkanmıştır. Havada kurutulan plakların üzerine %95'lik etanol konularak, oda ısısında 30 dakika, çalkalama olmaksızın inkübe edilmiştir. Bu işlem sırasında etanolün buharlaşmasını önlemek için plakların üzeri parafilm ile kapatılmıştır. Son olarak kuyucukların absorbansı spektrofotometrede (BioTek, ABD) 570 nm'de okutulmuştur (Stepanovic ve ark., 2007; Zmantar ve ark., 2010).

Pozitif kontrol olarak biyofilm oluşturduğu bilinen *S. aureus* ATCC 25923 ve *S.epidermidis* ATCC 35984, negatif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 29213, sterilit kontrolü için sadece besiyeri içeren, mikroorganizma ilave edilmemiş kuyucuklar kullanılmıştır. Her mikroorganizma üç farklı kuyucukta çalışılmış ve sonuçlar üç deneyin ortalaması alınarak hesaplanmıştır. Sadece besiyeri içeren kuyucukların optik dansitometrelerinin ortalaması alınmış ve üç standart derivasyonu hesaplanarak OD_C değeri belirlenmiştir. Elde edilen cut off değerine göre biyofilm pozitiflikleri yorumlanmıştır (Zmantar T ve ark., 2010).

$OD \leq OD_c$	: negatif
$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$	: +
$2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$	: ++
$4 \times OD_c < OD$	: +++

3.7.2. Kongo Red Agar Metodu ile Slime Faktörü Oluşumunun Fenotipik Olarak Gösterilmesi

3.7.2.1. Gereç

3.7.2.1.1. Kimyasal Madde ve Malzemeler

Beyin kalp infüzyon buyyonu (Merck, Almanya)

Sukroz (Sigma- Aldrich, ABD)

Agar (Merck, Almanya)

Serum fizyolojik (Merck, Almanya)

3.7.2.1.2. Araçlar

Petri kutusu küçük 90x17mm (Isolab, Almanya)

Çok kanallı pipet (Thermo, Almanya)

Ayarlı, hacimli, otomatik pipetler (Thermo, Almanya)

Steril filtreli pipet uçları 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl (Ratiolab, Almanya)

Öze (Isolab, Almanya)

Steril 15ml'lik falkon tüp (Isolab, Almanya)

Kongo red boyası (Sigma- Aldrich, ABD)

Otoklav (Nüve, Türkiye)

Vorteks (HVD, Avusturya)

Etüv (Heraeus, Almanya)

3.7.2.2. Yöntem

Çalışmada izolatların mikroplak yöntemi ile biyofilm oluşumunun araştırılmasının yanı sıra KRA besiyerinde oluşturdukları kolonilerin görünüm farklılıklarına dayanan 'Kongo Red Agar' yöntemi olarak bilinen yöntem ile slime faktör oluşumları araştırılmıştır. Bu amaçla; beyin kalp infüzyon buyyonu (37 g/l), süktroz (50 g/l), agar (10 g/l) ve Kongo Red boyası (0.8 g/l) içeren besiyeri hazırlanmıştır. Besiyerine konulacak Kongo Red boyası, konsantre sıvı solüsyon şeklinde ayrı olarak hazırlanmış ve 121°C'de 15 dakika süre ile otoklavlanmıştır. Sterilizasyonu yapılmış agar içeren besiyeri 55°C'ye kadar soğuduktan sonra besiyerine Kongo red boyası solüsyonu eklenmiştir. Hazırlanan besiyeri 9 cm çapındaki petri plaklarına 20 ml olarak dağıtılmış, katılaşp soğuması beklenmiş, plaklar bir gece oda ısısında bekletildikten sonra ertesi gün taze olarak kullanılmıştır. Pozitif kontrol olarak biyofilm oluşturduğu bilinen *S. aureus* ATCC 25923 ve *S. epidermidis* ATCC 35984, negatif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 29213 suşları kullanılmıştır. Her agara en az bir pozitif kontrol bir negatif kontrol ekimi yapılmıştır. KRA besiyerine ekim için iki

yöntem kullanılmıştır. Birinci yöntemde suşların besiyerine tek koloni ekimleri yapılmış, ikinci yöntemde seçilen koloniler 5ml fizyolojik tuzlu su içinde süspanse edilmiş ve 20 µl'si damlatma yöntemi ile plak üzerine aktarılmıştır. Ekim işlemini takiben plaklar 37°C'de 24 saat süre ile inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda etüvden çıkarılan plaklar değerlendirildikten sonra, oda sıcaklığında 24 saat daha bekletilmiş ve 48. saatte yeniden değerlendirilmiştir. Değerlendirme işlemleri iki ayrı araştırmacı tarafından, birbirinden bağımsız olarak yapılmıştır. Kuru kristal kıvamında koyu kırmızı-siyah renkli koloni oluşturan suşlar slime faktörü pozitif; açık pembe-kırmızı ya da bordo renkte koloni oluşturanlar slime faktörü negatif olarak yorumlanmıştır. Slime faktörü oluşturmayan suşların nadiren gösterdiği boğa gözü görünümü denilen ortalarında siyahlaşma gösteren pembe renkli koloniler de negatif olarak kabul edilmiştir (Freeman ve ark., 1989).

3.7.3. Biyofilm Genlerinin Varlığına Bakılması

Genomik DNA'nın ekstraksiyonunu takiben (suşlardan DNA eldesi bölümünde detayları verilmiştir), Tablo 3.7'de verilen primerler kullanılarak *icaA*, *icaD* ve IS256 gen bölgeleri çoğaltılmıştır. *icaA* ve *icaD* gen bölgeleri KNS'lerde biyofilm oluşumundan sorumlu PİA sentezini gerçekleştirirken, biyofilm oluşumunu etkileme kapasitesine sahip mobil bir eleman olan IS256 gen bölgesi *ica* operonuna geri dönüşümlü olarak eklenmek suretiyle *ica* operonu ekspresyonunu etkilemekte ve dolayısıyla slime faktörü üretiminin ve biyofilm oluşumunun düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Ziebuhr ve ark., 1999; Silva ve ark., 2002). PZR yöntemi için kullanılan protokol ve programlar aşağıda izlenmektedir.

3.7.3.1. Gereç

3.7.3.1.1. Sarf Malzemeleri

Steril 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri (Orange Scientific, Belçika)

Steril PZR tüpü 0.2 ml (Orange Scientific, Belçika)

Ayarlı hacimli otomatik pipetler (Thermo, Almanya)

Steril filtreli pipet uçları 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl (Ratiolab, Almanya)
Lateks muayene eldiveni (Dolphin, Türkiye)

3.7.3.1.2. Kimyasal Malzemeler

Taq DNA Polimeraz (Fermentas, Lituanya)
10X PZR Buffer (Fermentas, Lituanya)
10 mM MgCl₂ (Fermentas, Lituanya)
dNTP Karışımı (Fermentas, Lituanya)
icaA ve *icaD* primerleri (Thermo, Almanya)
IS256 primerleri (Thermo, Almanya)
Moleküler grade agaroz (Vivantis, Malezya)
Etidyum bromid (Applichem, Almanya)
Loading dye solution –yükleme solüsyonu 1x (Fermentas, Lituanya)
Mass Ruler DNA ladder mix, ready-to-use, 80-10.000 bp, (Thermo, Almanya)

3.7.3.1.3. Araçlar

Santrifüj (Eppendorf, Almanya)
Vorteks (HVD, Avusturya)
Termal döngü cihazı (Techne, İngiltere)
Hassas terazi (Mettler- Toledo, İsviçre)
Mikrodalga fırın (Vestel, Türkiye)
Elektroforez tankı (Thermo, Almanya)
Elektroforez güç kaynağı (Bio-Rad, ABD)
UV transillüminatör (Vilber-Lourmat TFX–20.M [ETX–20 M], Fransa)
Fotoğraf makinesi (Canon Power Shot G5, Kanada)
Güvenlik Kabini Class II (Teknomar, Türkiye)

3.7.3.2. Yöntem

3.7.3.2.1. PZR Yöntemi

Genomik DNA'nın ekstraksiyonunu takiben (suşlardan DNA eldesi bölümünde detayları verilmiştir), Tablo 3.7'de verilen primerler kullanılarak KNS'lerde biyofilm oluşumundan sorumlu *icaA*, *icaD* ve IS256 gen bölgeleri aşağıda verilen protokol ve programlar kullanılarak PZR yöntemiyle araştırılmıştır (Vasudevan ve ark., 2003; Montanero ve ark., 2007).

***icaA* ve *icaD* PZR Protokolü İçin Kullanılan Reaksiyon Karışımı N**

ddH ₂ O		×N
Tampon		10X (NH ₄) ₂ SO ₄ ×N
dNTP		200 µM×N
MgCl ₂		3 mM ×N
<i>icaA</i> veya <i>icaD</i> forward primer		50 pmol×N
<i>icaA</i> veya <i>icaD</i> reverse primer		50 pmol×N
Taq polimeraz		1.5 U×N
DNA		5 µL×N
TV (total volüm)		50 µl×N

***icaA* ve *icaD* genlerinin çoğaltılması için PZR Programı**

Başlangıç denatürasyonu		94 °C' de 3 dakika	
Denatürasyon aşaması		94 °C' de 45 saniye	} 30 döngü
Primer yapışması (annealing)		55°C' de 45 saniye	
Sentez (uzama) aşaması		72 °C' de 1 dakika	
Son uzama		72 °C' de 7 dakika	

IS256 için Protokolü İçin Kullanılan Reaksiyon Karışımı **N**

dH ₂ O		×N
Tampon		10X (NH ₄) ₂ SO ₄ ×N
dNTP		200 µM×N
MgCl ₂		3 mM ×N
IS256 forward primer .		50 pmol×N
IS256 reverse primer		50 pmol×N
Taq polimeraz		1.5 U×N
DNA		5 µL×N
TV (total volüm)		50 µl×N

IS256 geninin çoğaltılması için için PZR Programı

Başlangıç denatürasyonu		94 °C' de 12 dakika
Denatürasyon aşaması		94 °C' de 30 saniye
Primer yapışması (annealing)		55°C' de 30 saniye
Sentez (uzama) aşaması		72 °C' de 2 dakika
Son uzama		72 °C' de 7 dakika

3.7.3.2.2. Agaroz Jel Hazırlanması ve PZR Ürününün Agaroz Jel**Elektroforezinde Saptanması**

icaA, *icaD* ve IS256 genleri için PCR ürünlerini %2'lik agaroz jelde değerlendirilmiştir. %2'lik agaroz jel için 1.6g agaroz (Vivantis, Malezya) 0.5x TBE ile 80ml'ye tamamlanmıştır. TBE 0.5x solüsyonu; TBE 10x solüsyonunun 1/20 oranında ddH₂O ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. Agaroz istenilen yüzdelerde hazırlandıktan sonra mikrodalga fırında (Beko, Türkiye) kaynatılmıştır. Üzerine etidyum bromidin (Applichem, Almanya) %5'lik stok solüsyonundan 3µl ilave edildikten sonra iyice karıştırılmış ve jel tabağına (Thermo, Almanya) dökülmüştür. Jel dökülmeden önce jel tabağı uygun taraklar kullanılarak hazırlanmıştır. Agarozun donması için yaklaşık 45 dk bekleme süresinde sonra, jel tabağıyla birlikte elektroforez tankına (Thermo, Almanya) yerleştirilmiştir. Elektroforez tankı 0.5x

TBE solüsyonu ile jelin üstünü kapatacak şekilde doldurulmuştur. PCR ürünlerinden 6µl alınarak temiz bir parafilm (Parafilm, Chicago, ABD) üzerinde 3µl loading dye (Fermentas, Lituanya) ile karıştırılmıştır. 1 saat 100 V elektrik akımına tabi tutulup jel elektroforezi uygulandıktan sonra, 312 nm’de UV transillüminatör (Vilber–Lourmat TFX–20.M [ETX–20 M], Fransa) ile değerlendirilmiştir. Fotoğraf makinesi (Canon Power Shot G5, Kanada) ile görüntülenmiştir. Amplifikasyon ürünlerinin büyüklüklerinin değerlendirilmesinde 100 bç’lik DNA büyüklük belirteci [Mass ruler DNA ladder mix, ready-to-use, 80-10.000 bç, (Thermo, Almanya)].

Tablo 3. 7. Biyofilm genlerinin saptanmasında kullanılan primer listesi

Hedef Gen	Primer Dizisi	Amplikon büyüklüğü (bç)	Referans
<i>icaA</i>	F: 5'-GAC CTC GAA GTC AAT AGA GGT-3' R: 5'-CCC AGT ATA ACG TTG GAT ACC-3'	1315	Vasudevan ve ark., 2003
<i>icaD</i>	F: 52-AGG CAA TAT CCA ACG GTA A-3' R: 52-GTC ACG ACC TTT CTT ATA TT-3'	381	Vasudevan ve ark., 2003
IS256	5'-TGA AAA GCGAAG AGA TTC AAA GC-3' 5'-ATG TAG GTC CAT AAG AAC GGC-3'	1102	Montanero ve ark., 2007

3.8. Minimum Biyofilm Eradike Edici Konsantrasyon Değerinin Belirlenmesi Deneyi

3.8.1. Gereç

3.8.1.1. Kimyasal Madde ve Malzemeler

Glukoz (Sigma - Aldrich, ABD)

Triptik soy broth (Merck, Almanya)

Etanol (Sigma - Aldrich, ABD)

Metanol (Sigma - Aldrich, ABD)

Tamponlu tuz çözeltisi (Phosphate Buffered Saline - PBS) (Sigma - Aldrich, ABD)

Kristal viyole (Sigma - Aldrich, ABD)

3.8.1.2. Araçlar

Phoenix Spec Nephelometer (BD, Fransa)

96 kuyucuklu düz tabanlı mikropalak (Piove di Sacco, İtalya)

Çok kanallı pipet (Thermo, Almanya)

Ayarlı hacimli otomatik pipetler (Thermo, Almanya)

Steril filtreli pipet uçları 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl (Ratiolab, Almanya)

Steril 15ml'lik falkon tüp (Isolab, Almanya)

Nanofotometre (Implen, Almanya)

Vorteks (HVD, Avusturya)

Etüv (Heraeus, Almanya)

3.8.2. Yöntem

Suşların stok kültürlerinden KKA besiyerine ekim yapılarak, 24 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Sonrasında 0.5 McFarland değerinde süspanse edilen bakterilerin 20 µL'si 96 kuyucuklu düztabanlı plaklara aktarılmıştır. Kuyucuklar 180 µL %0.25 glukoz eklenmiş TSB ile doldurulmuştur. Plaklar 24 saat boyunca 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası yapışmayan hücrelerin dökülmesi için plaklar 200 µL steril FTS ile üç kez yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrasında kuyucuklara tutunan bakteri hücreleri üzerine katyonu ayarlanmış 100 µL MHB II resüspanse edilmiş ve kuyucuklara 100 µL vankomisin farklı konsantrasyonları (2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 32.0, 64.0, 128 ve 256 µL/ml) eklenmiştir. Plaklar 24 saat süre ile 37°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında aspirasyon işlemi ile vankomisin uzaklaştırılmış ve kuyucuklar 200 µL steril FTS ile üç kere yıkanmıştır. Plaklar ters çevrilerek 3 saat süre ile havada kurumaya bırakılmış, sonrasında tutunan bakteriler üzerine 200 µl metanol konularak 20 dakika süre ile bakterilerin fiksasyonu sağlanmıştır. Fiksasyonu takiben metanol boşaltılmış ve oda ısısında bir gece süre ile ters çevrilerek havada kurumaya bırakılmıştır. Ertesi gün tutunan bakteriler 150 µl %0.5'lik kristal viyole ile 15 dakika süre ile boyanmış, sonrasında pipetle üzerlerindeki boya çekilerek, 200 µL steril FTS ile 3 kez yıkanmıştır. Havada kurutulan plakların üzerine %95'lik etanol konularak, oda ısısında 30 dakika, çalkalama olmaksızın

inkübe edilmiştir. Bu işlem sırasında etanolün buharlaşmasını önlemek için plakların üzeri parafilm ile çevrilerek kapatılmıştır. Son olarak kuyucukların absorbansı spektrofotometrede (BioTek, ABD) 570 nm’de okutulmuştur. Pozitif kontrol olarak biyofilm oluşturduğu bilinen *S. aureus* ATCC 25923 ve *S. epidermidis* ATCC 35984, negatif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 29213 suşları kullanılmıştır. Sterilite kontrolü olarak ve aynı zamanda spektrofotometreyi körlemek amacıyla mikroorganizma içermeyen %0.25 glukoz eklenmiş TSB kullanılmıştır. Bütün biyofilm deneyleri, optik dansite ölçümlerindeki değişkenlikleri en aza indirmek için üç kere tekrarlanmıştır.

3.9. Değişken Alanlı Jel Elektroforezi (Pulsed Field Gel Electrophoresis-PFGE)

SVK kültür örneklerinden ve kateteri olan hastaların periferik kan kültürü örneklerinden aynı tür KNS üremesi durumunda, örneklerin epidemiyolojik ilişkilerinin belirlenmesi açısından PFGE yöntemi uygulanmıştır. Bu amaçla Tenover ve ark., (Tenover ve ark., 1995) yöntemi Tekeli ve ark., (Tekeli ve ark., 2009) modifiye ettiği şekliyle yapılmıştır.

3.9.1. Gereç

3.9.1.1. Sarf Malzemeleri ve Kimyasal Malzemeler

Ayarlı, hacimli otomatik pipetler (Thermo, Almanya)
Beyin kalp infüzyon buyyonu (Merck, Almanya)
Blood base agar (Merck, Almanya)
Etidyum bromid (Applichem, Almanya)
Gel Compar II (AppliedMaths, Belçika)
Gliserol solüsyon (Sigma-Aldrich, ABD)
Lambda PFGE marker (New England Biolabs, İngiltere)
Lateks muayene eldiveni (Dolphin, Türkiye)
Lizostafin (Applichem, Almanya)
Öze (Isolab, Almanya)

Petri kutusu küçük 90x17mm (Isolab Almanya)
Proteinaz K (20 mg/ml) (Fermentas, Lituanya)
SmaI (Fermentas, Lituanya)
Steril 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri (Orange Scientific, Belçika)
Steril 15 ml'lik tüpler (Orange Scientific, Belçika)
Steril 15 ml'lik falkon tüp (Isolab, Almanya)
Steril filtreli pipet uçları 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl (Ratiolab, Almanya)
Tango buffer (Fermentas, Lituanya)

3.9.1.2. Kullanılacak Solüsyonlar

Proteinaz K Tamponu (pH=8-9):

250 mM EDTA (Applchem, Almanya)
%1 sarkosyl (Applchem, Almanya)
1000 ml ddH₂O ile tamamlanır

Lizis Tamponu

6 mM Tris HCl (Applchem, Almanya)
1 M NaCl (Merck, Almanya)
100 mM EDTA (Applchem, Almanya)
%0.2 Na deoksikolat (Applchem, Almanya)
%0.5 Na lauroylsarcosine (Applchem, Almanya)
1000 ml ddH₂O ile tamamlanır

Tris-EDTA (TE) Tamponu (pH=8):

10 mM Tris (Thermo, Almanya)
1 mM EDTA (Applchem, Almanya)

5x TBE (pH 7-9):

54 g Tris (Thermo, Almanya)
27.5 g Borik asit (Applchem, Almanya)
20 ml 0.5 M EDTA (Applchem, Almanya) (pH :8)

0.5x TBE (pH 7-9):

5x TBE 1/10 oranında ddH₂O ile sulandırılmasıyla hazırlanmıştır

%2 düşük erime sıcaklığına sahip agaroz hazırlanması

0.2 mg 'low melt point' agaroz (Bio Basic, Kanada)

10 ml TE

Mikrodalga fırında (Vestel, Türkiye) eritildi

%1'lik pulsed-field elektroforez agaroz jelinin hazırlanması

1 gr 'pulsed field' agaroz (Bio-Rad, ABD)

100 ml 0.5 x TBE

Mikrodalga fırında (Vestel, Türkiye) eritildi

3.9.1.3. Araçlar

Vorteks (HVD, Avusturya)

Santrifüj (Eppendorf, Almanya)

Etüv (Heraeus, Almanya)

Otoklav (Nüve, Türkiye)

Nanofotometre (Implen, Almanya)

Derin dondurucu (Regal, Türkiye)

UV transillüminatör (Vilber-Lourmat TFX-20.M (ETX-20 M), Fransa)

Kuru ısıtıcı blok (HVD, Avusturya)

Çalkalayıcı (HVD, Avusturya)

Çalkalayıcılı su banyosu (GFL, Almanya)

Mikrodalga fırın (Vestel, Türkiye)

Hassas terazi (Mettler- Toledo, İsviçre)

Fotoğraf makinesi (Canon Power Shot G5, Kanada)

CHEF-DR II sistemi (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, ABD)

Gel Compar II (Applied Maths, Belçika)

3.9.2. Yöntem

3.9.2.1. PFGE Yönteminde Kullanılacak İzolatların Hazırlanması

1. Otomatize sistemler ile tür düzeyinde tanımlanan ve -20°C’de %4 gliserollü buyyonda saklanan bakteri izolatları, %5 KKA besiyerine ekildi ve 37°C’de 20-24 saat aerobik koşullarda inkübe edilmiştir.
2. Üreyen kolonilerden birer öze dolusu (0.1 µl’lik özeler ile) alınıp, 5ml beyin kalp infüzyon buyyonu içerisine koyulmuş ve 18–24 saat 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır.
3. İnkübasyonu takiben etüvden çıkarılan beyin kalp infüzyon buyyonları vorteks (HVD, Avusturya) uygulanmış ve nanofotometrede (Implen, Almanya) optik dansiteleri 0.9–1.1 olacak şekilde ayarlanmıştır.
4. Bu süspansiyondan 400 µl alınıp mikrosantrifüj tüplerine konulmuştur ve 13000 rpm’de 4 dakika santrifügasyon (Eppendorf, Almanya) işlemi uygulanmıştır.
5. Santrifügasyon işleminden sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve pelletin üzerine 150 µl TE tamponu koyulmuştur.
6. Ayrıca 5 µl (10 U) lizostafin (Applchem, Almanya) eklenerek nazıkçe pipetaj işlemi uygulanmış ve 37°C’de 10 dakika süreyle bekletilmiştir.

3.9.2.2. İzolatların Agaroza Gömülmesi

1. %2’lik düşük erime sıcaklığına sahip agaroz (low melt, LMP (Bio Basic, Kanada) mikrodalga fırında (Vestel, Türkiye) birkaç defa kaynamasına izin verilerek iyice eritilip, 55°C’lik su banyosuna konulmuştur. Bu arada agaroz kalıbı hazırlanmıştır.

2. Yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonu ile %2'lik LMP agaroz eşit oranlarda (her ikisinden 100'er µl) pipetaj yaparak (baloncuk oluşmamasına özen gösterilerek) karıştırılmıştır.
3. Bu karışımdan pipet yardımıyla 100 µl alınıp agoroz kalıbının kuyucuklarına hava kabarcığı olmamasına özen göstererek dağıtılmıştır.
4. Kalıplar +4°C'de 10 dakika bekletilerek agarın katılaşması sağlanmıştır.

3.9.2.3. Agar İçerisindeki Hücrelerin Parçalanması

1. Hazırlanan kalıplar öze yardımıyla jel tutucudan çıkartılmış ve 4 ml lysis tamponu içeren tüplerin içine konulmuştur.
2. Tüpler çalkalayıcı su banyosuna (GFL, Almanya) yerleştirilmiş ve bir gece 37°C'de inkübe edilmiştir.
3. Ertesi gün EC lysis tamponu uzaklaştırılıp, tüplerin içine 10 µl proteinaz K (20 mg/ml Fermentas, Litvanya) ve 1000 µl proteinaz K tamponu eklenmiştir.
4. Tüpler çalkalayıcı su banyosuna (GFL, Almanya) yerleştirilmiş ve 54°C'de 2 saat tutulmuştur.

3.9.2.4. Agoroz Kalıpların Yıkama

1. Proteinaz K tamponu dökülüp, 5-10 ml TE tamponu ile 5 kez 30 dakika boyunca çalkalayıcıda (HVD, Avusturya) yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.
2. Kesim enzimi ile muamele edilinceye kadar 4 ml TE içinde 4°C'de saklanmıştır.

3.9.2.5. DNA'nın Restriksiyon Enzimiyle Kesilmesi

1. Kesim işlemi için kalıplar TE içeren tampondan çıkarılıp ortadan ikiye kesilmiş ve 1 ml distile su içeren mikrosantrifüj tüplerine konulmuştur.
2. Kalıplar 30 dakika boyunca çalkalayıcıda (HVD, Avusturya) yıkanmıştır.
3. Distile su uzaklaştırılmış ve her bir mikrosantrifüj tüpüne tampon-su karışımı (180 µl su + 20 µl Tango buffer) eklenmiştir ve 30 dakika boyunca çalkalayıcıda bekletilmiştir.
4. Tampon su karışımı da uzaklaştırılmış ve mikrosantrifüj tüplerine enzim-tampon-su karışımı (3 µl *SmaI* (Fermentas, Lituanya) (10 U) +180 µl su + 17 µl tampon) konularak, 30°C'de ısıtıcı blokta (HVD, Avusturya) 4 saat süre ile bırakılmıştır.
5. Süre sonunda tampon-su-enzim karışımı uzaklaştırılmış ve 1000 µl 0.5x TBE tamponu eklenmiştir. 37°C'de 30 dakika bekletilmiş ve süre bitiminde TBE tamponu uzaklaştırılmıştır.

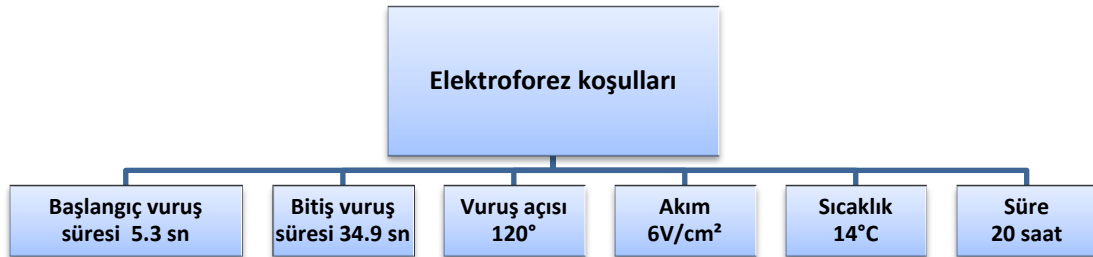
3.9.2.6. Elektroforez Jelinin Hazırlanması

1. %1' lik 'pulsed-field certified' agaroz (Bio-Rad, ABD) kullanılarak jel hazırlanmıştır.
2. Bu amaçla agaroz dökülecek kaset bir zemine yerleştirilerek su terazisi ile tamamen düzgün olduğu kontrol edilmiştir.
3. Sonrasında 15 dişli tarağın 13 tanesinin dişlerinin uç kısmına yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanan ve TBE tampondan çıkarılan agaroz kalıpları yerleştirilmiştir.
4. Agaroz kalıplarının etrafında kalan *SmaI* enzim karışımı kurutma kâğıdı veya kâğıt havlu kullanılarak uzaklaştırılmıştır.

5. Tarak bu haliyle 5 dakika oda sıcaklığında tutularak agaroz kalıpların tarağın ucuna yapışması beklenildikten sonra, jel dökülecek kasete yerleştirilmiştir.
6. 45-50°C sıcaklığında olan agaroz hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek kasete dökülmüştür.
7. Katılaşması için oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir.
8. Tarak dişlerinden kalan boşluklar ayrılan 3-5 ml PFGE jeli ile pipet yardımıyla doldurulmuştur.
9. Polimerize olmuş agaroz jel içerisine ticari olarak satın alınan Lambda Ladder PFGE Marker' dan (New England Biolabs, İngiltere) bistüri yardımıyla yaklaşık 1'er mm kalınlığında parçalar halinde kesilerek, boş bırakılan iki kuyucuğa konulmuştur.
10. Tabla üzerindeki agaroz jel, altındaki siyah destek ve siyah dikdörtgen çerçeve ile içerisinde 1700 ml 0.5x TBE tamponu PFGE tankına yerleştirilmiştir.

3.9.2.7. Elektroforez Sistemi

PFGE için CHEFF-DR II cihazında (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium) elektroforez uygulanmıştır. Elektroforez şartları aşağıda belirtildiği gibidir:



3.9.2.8. Jelin Boyanması

1. Elektroforez sonrasında jel, 30 µl etidyum bromid içeren 300 ml ultra saf su ile 30 dakika boyanmıştır.
2. Sonrasında jel 400 ml ultra saf su içerisinde 45 dakika 2–3 kere suyu değiştirilerek yıkanmıştır ve böylece DNA'ya bağlanmamış boya uzaklaştırılmıştır.
3. UV Transillüminatör (Vilber-Lourmat TFX–20.M (ETX–20 M), Fransa) altında bantlarının fotoğrafı fotoğraf makinesi (Canon Power Shot G5, Kanada) ile çekilmiş ve kayıt edilmiştir.

3.9.2.9. Sonuçların Değerlendirilmesi

PFGE sonrasında oluşan DNA paternleri hem gözle hem de “Gene Directory Programme” (Syngene, UK) ile değerlendirilmiştir. Benzerlik indeksi “Dice” katsayısı kullanılarak %1 tolerans değerinde oluşturulmuş ve izolatlar arası kümelenme ilişkisi aritmetik ortalamalı ağırlıksız çift grup yöntemi (unweighted pair group method of arithmetic averages-UPGMA) yöntemi kullanılarak gösterilmiştir. İzolatlar arası genotipik ilişkinin değerlendirilmesinde Tenover ve arkadaşları (Tenover ve ark., 1995) tarafından belirlenen ilkeler ve Gel Compar II (Applied Maths, Belçika) programı kullanılmıştır.

3.10. Verilerin Analizi ve İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin analizi “SPSS for Windows 15” paket programında yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler dağılımı normal olan değişkenler için ortalama $\pm$ standart sapma, dağılımı normal olmayan değişkenler için ortanca (minimum – maksimum), nominal değişkenler ise vaka sayısı ve (%) olarak gösterilmiştir.

Grup sayısı iki olduğunda gruplar arasında ortalamalar yönünden farkın önemliliği t testi ile ortanca değerler yönünden farkın önemliliği Mann Whitney U testi ile

araştırılmıştır. Grup sayısı ikiden fazla olduğunda gruplar arasında ortalamalar yönünden farkın önemliliği ANOVA varyans analizi testi ile ortanca değerler yönünden farkın önemliliği Kruskal Wallis testi ile araştırılmıştır. Nominal değişkenler Pearson Ki-Kare veya Fisher exact testi ile değerlendirilmiştir. Gerekli değişkenler için Phi ve Cramer V ilişki katsayıları hesaplanmıştır.

Sefoksitin disk difüzyon yöntemi için duyarlılık, seçicilik yanlış pozitif, yanlış negatif, yanlış pozitif olabilirlik oranı, yanlış negatif olabilirlik oranı, total doğruluk oranı ve bunlara ilişkin %95 güven aralıkları hesaplanmıştır.

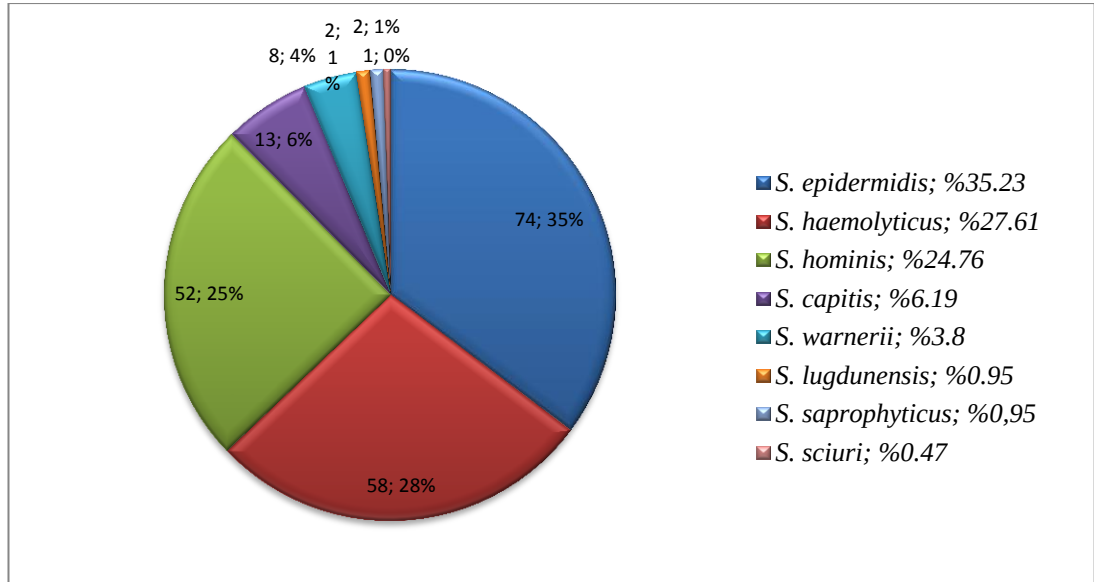
Sonuçlarda $p < 0,05$ için istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Koagülaz Negatif Stafilokok Suşları ve Sayıları

Çalışmaya 30'u sağlıklı hastane çalışanı olmayan bireylerin ellerinden, 26'sı sağlıklı hastane çalışanı gönüllülerin burunlarından, 35'i kateter kolonizasyonu etkeni, 15'i KİKDE etkeni (15 SVK'dan izole + 15 bu hastaların kan kültürlerinden izole), 89 SVK takılı olmayan hastaların periferik kan kültürlerinden izole edilen toplam 210 KNS suşu alınmıştır (Tablo 3.1).

Toplam 210 suşun 74'ü (%35.23) *S. epidermidis*, 58'i (%27.61) *Staphylococcus haemolyticus*, 52'si (%24.76) *Staphylococcus hominis*, 13'ü (%6.19) *Staphylococcus capitis*, 8'i (%3.8) *Staphylococcus warnerii*, 2'si (%0.95) *S. lugdunensis*, 2'si (%0.95) *Staphylococcus saprophyticus*, 1'i (%0.47) *Staphylococcus sciuri* olarak tiplendirilmiştir. KNS türlerinin dağılımları Şekil 4.1'de, invaziv olan ve olmayan örneklerle göre dağılımları ise Tablo 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4. 1. KNS izolatlarının türlere göre dağılımı

Tablo 4. 1. KNS türlerinin invaziv olan ve olmayan örnekler göre dağılımı

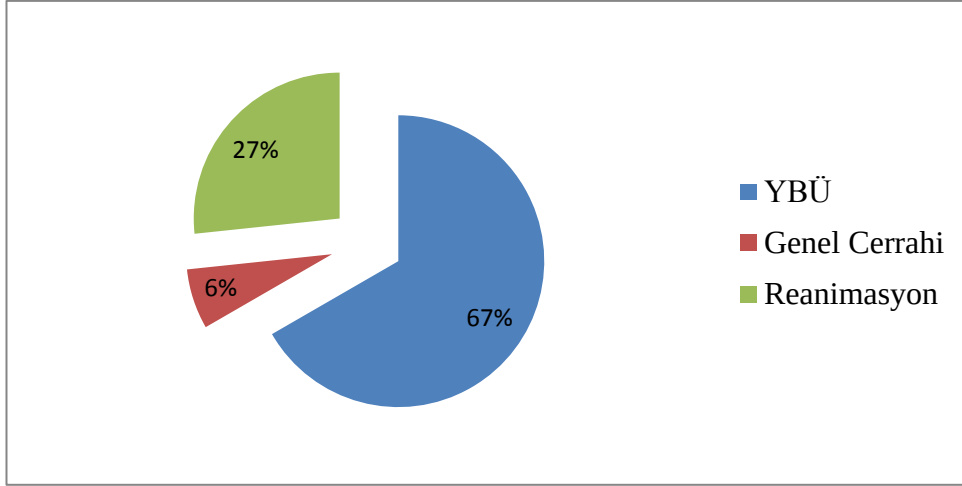
Örnekler			<i>S. epidermidis</i> n (%)	<i>S. haemolyticus</i> n (%)	<i>S. hominis</i> n (%)	<i>S. capitis</i> n (%)	<i>S. warnerii</i> n (%)	<i>S. lugdunensis</i> n (%)	<i>S. saprophyticus</i> n (%)	<i>S. sciuri</i> n (%)	Toplam n (%)
İnvaziv Örnekler (n=119)	KİKDE	Kan	7 (3.33)	5 (2.38)	3 (1.42)	-	-	-	-	-	15 (7.14)
		Kateter	7 (3.33)	5 (2.38)	3 (1.42)	-	-	-	-	-	15 (7.14)
	Periferik Kan (kateteri olmayan)		32 (15.23)	34 (16.19)	17 (8.09)	4 (1.90)	1 (0.47)	-	1 (0.47)	-	89 (42.38)
	İnvaziv Olmayan Örnekler (n=91)	El		8 (3.8)	4 (1.90)	9 (4.28)	1 (0.47)	6 (2.85)	2 (0.95)	-	-
Burun		6 (2.85)	1 (0.47)	11 (5.23)	6 (2.85)	1 (0.47)	-	1 (0.47)	-	26 (12.38)	
Kateter kolonizasyonu		14 (6.66)	9 (4.28)	9 (4.28)	2 (0.95)	-	-	-	1 (0.47)	35 (16.66)	
Toplam		74 (35.23)	58 (27.61)	52 (24.76)	13 (6.19)	8 (3.80)	2 (0.95)	2 (0.95)	1 (0.47)	210 (100)	

KİKDE etkenleri ve SVK'sı olmayan hastaların periferik kan kültürlerinden izole edilerek tiplendirilen KNS suşlarının (invaziv suşların) izole edildikleri kliniklere göre dağılımları sırasıyla Tablo 4.2, Şekil 4.2 ve Tablo 4.3, Şekil 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4. 2. KİKDE etkenlerinin izole edildikleri kliniklere göre dağılımı

	Dahili Bölümler n (%)	Cerrahi Bölümler n (%)	YBÜ* n (%)	Reanimasyon n (%)	Toplam n (%)
<i>S. epidermidis</i>	-	-	10 (33.33)	4 (13.33)	14 (46.66)
<i>S. haemolyticus</i>	-	2 (6.66)	6 (20)	2 (6.66)	10 (33.33)
<i>S. hominis</i>	-	-	4 (13.33)	2 (6.66)	6 (20)
Toplam	-	2 (6.66)	20 (66.66)	8 (26.66)	30 (100)

*Yoğun bakım ünitesi



Şekil 4. 2. KİKDE etkenlerinin izole edildikleri kliniklere göre dağılımları

Tablo 4. 3. SVK'sı olmayan hastaların periferik kan kültürlerinden izole edilen KNS türlerinin bölümlere göre dağılımı

	Acil n (%)	Dahili Bölümler n (%)	Cerrahi Bölümler n (%)	YBÜ* n (%)	Reanimasyon n (%)	Toplam n (%)
<i>S. epidermidis</i>	3 (3,37)	17 (19,10)	4 (4,49)	2 (2,25)	6 (6,74)	32 (35,96)
<i>S. haemolyticus</i>	1 (1,12)	4 (4,49)	4 (4,49)	4 (4,49)	21 (23,60)	34 (38,20)
<i>S. hominis</i>	4 (4,49)	4 (4,49)	2 (2,25)	1 (1,12)	6 (6,74)	17 (19,10)
<i>S. capitis</i>	-	1 (1,12)	-	1 (1,12)	2 (2,25)	4 (4,49)
<i>S. warnerii</i>	-	-	-	-	1 (1,12)	1 (1,12)
<i>S. saprophyticus</i>	-	-	1 (1,12)	-	-	1 (1,12)
Toplam	8 (8,99)	26 (29,21)	11 (12,36)	8 (8,99)	36 (40,45)	89 (100)

* Yoğun Bakım Üniteleri

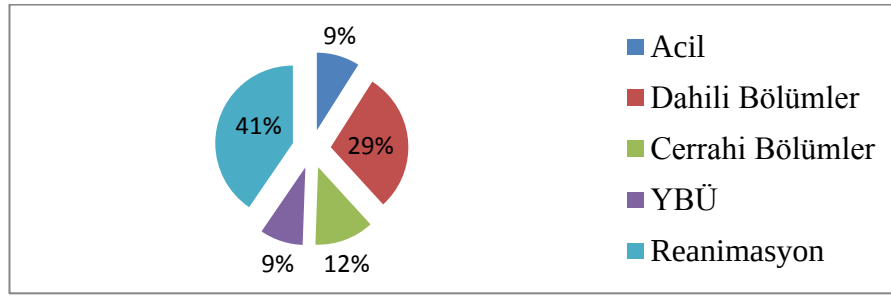
Periferik kan kültürlerinden izole edilen KNS suşları arasında; dahili bölümlerden izole edilenlerde *S. epidermidis* oranının, reanimasyon ve YBÜ'lerden izole edilenlerde ise *S. haemolyticus*'un oranının yüksek olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Şekil 4.4'te SVK'sı olmayan hastaların periferik kan kültürlerinden izole edilen KNS suşlarının türlere göre dağılımı izlenmektedir.

Periferik kan kültürlerinden izole edilen 89 KNS'nin 13'ünün (%13,61) KDE etkeni olduğu saptanmıştır. Bu KNS'lerde birden fazla kan kültür şişesinde üreme

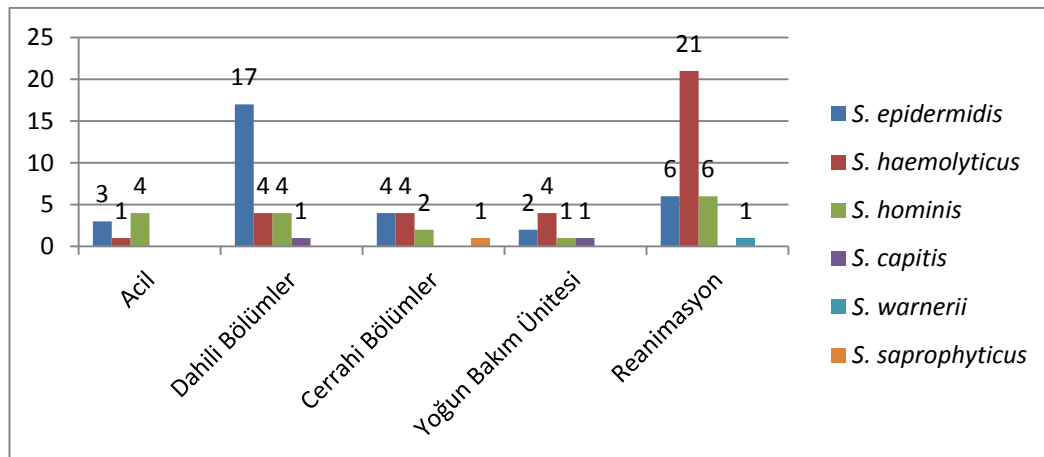
görülmüş, başka bir enfeksiyon odağı saptanamamıştır. KDE etkeni olarak tiplendirilen KNS suşlarının izole edildikleri bölgelere göre tür dağılımları Tablo 4.4'te verilmiştir. KDE etkeni olan KNS'lerin türlerine bakıldığında 6 (%46.15) *S. epidermidis*, 6 (%46.15) *S. haemolyticus* ve 1 (%7.69) tane *S. hominis* izole edilmiştir. Ayrıca 13 KNS'nin 8 (%61.54) tanesinin reanimasyon ünitesinden, 5 (%38.46) tanesinin dahili bölümlerden izole edildiği görülmüştür.

Tablo 4. 4. KDE etkeni olan KNS'lerin izole edildikleri bölümlere göre dağılımı

Suşlar	Reanimasyon n (%)	Dahili Bölümler n (%)	Toplam n (%)
<i>S. epidermidis</i>	2 (15.38)	4 (30.77)	6 (46.15)
<i>S. haemolyticus</i>	5 (38.46)	1 (7.69)	6 (46.15)
<i>S. hominis</i>	1 (7.69)	-	1 (7.69)
Toplam n (%)	8 (61.54)	5 (38.46)	13 (100)



Şekil 4. 3. SVK'sı olmayan hastaların periferik kan kültürlerinden izole edilen KNS suşlarının bölümlere göre dağılımı



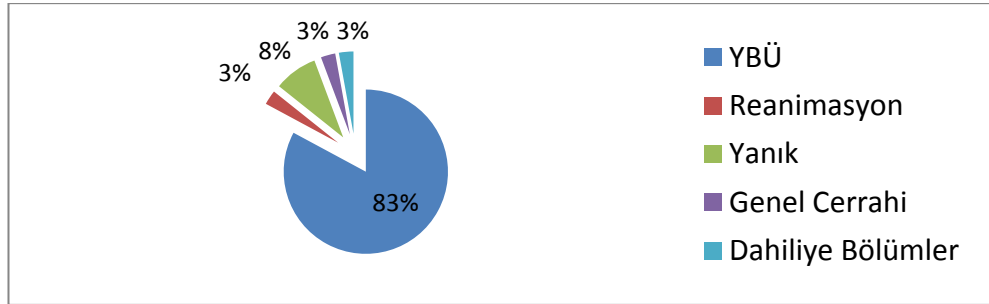
Şekil 4. 4. SVK'sı olmayan hastaların periferik kan kültürlerinden izole edilen KNS suşlarının türlere göre dağılımı

Tablo 4.5 ve Şekil 4.5'te kateter kolonizasyonu etkeni olan KNS türlerinin izole edildikleri kliniklere göre dağılımları görülmektedir.

Tablo 4. 5. Kateter kolonizasyonu etkenlerinin izole edildikleri kliniklere göre dağılımı

	Dahili Bölümler n (%)	Cerrahi Bölümler n (%)	YBÜ* n (%)	Reanimasyon n (%)	Yanık n (%)	Toplam n (%)
<i>S. epidermidis</i>	-	-	13 (37.14)	-	1 (2.86)	14 (40)
<i>S. haemolyticus</i>	-	-	7 (20)	1 (2.86)	1 (2.86)	9 (25.71)
<i>S. hominis</i>	1 (2.86)	1 (2.86)	6 (17.14)	-	1 (2.86)	9 (25.71)
<i>S. capitis</i>	-	-	2 (5.71)	-	-	2 (5.71)
<i>S. sciuri</i>	-	-	1 (2.86)	-	-	1 (2.86)
Toplam	1 (2.86)	1 (2.86)	29 (82.86)	1 (2.86)	3 (8.57)	35 (100)

*Yoğun bakım ünitesi



Şekil 4. 5. Kateter kolonizasyonu etkeni olan KNS suşlarının izole edildikleri kliniklere göre dağılımları

4.2. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

4.2.1. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi Sonuçları

KNS suşlarının, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile elde edilen antimikrobiyal duyarlılık oranları Tablo 4.6'da gösterilmiştir. Suşların hiçbirisinin teikoplanin ve linezolide dirençli olmadıkları saptanmıştır.

İndüklenebilir klindamisin direnci 13 *S. epidermidis* suşunda (%17.57), 8 *S. haemolyticus*'da (%13.79), 17 *S. hominis*'da (%32.69), 3 *S. capitis*'de (23.08)

bulunmuştur (Tablo 4.6). İstatistiksel olarak türler arasında indüklenebilir klindamisin direnci açısından anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$).

Tablo 4. 6. Suşların Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak elde edilen antimikrobiyal direnç ve indüklenebilir klindamisin direnç oranları

	<i>S. epidermidis</i> (74) n (%)	<i>S. haemolyticus</i> (58) n (%)	<i>S. hominis</i> (52) n (%)	<i>S. capitis</i> (13) n (%)	<i>S. warnerii</i> (8) n (%)	<i>S. lugdunensis</i> (2) n (%)	Diğer KNS** (3) n (%)
FOX*	41 (55.41)	53 (91.8)	34 (65.38)	7 (53.85)	2 (25)	2 (100)	3 (100)
CZ*	41 (55.41)	53 (91.8)	34 (65.38)	7 (53.85)	2 (25)	2 (100)	3 (100)
CİP*	31 (41.89)	49 (84.48)	26 (50)	3 (23.08)	1 (12.5)	1 (50)	1 (33.3)
SXT*	31 (41.89)	49 (84.48)	29 (55.77)	4 (30.77)	0	1 (50)	2 (40)
RF*	25 (33.78)	30 (51.72)	12 (23.08)	4 (30.77)	1 (12.5)	1 (50)	1 (33.3)
E*	51 (68.92)	50 (86.21)	39 (75)	8 (61.54)	1 (12.5)	1 (50)	3 (100)
DA*	44 (59.46)	20 (34.48)	29 (55.77)	6 (46.15)	1 (12.5)	1 (50)	1 (33.3)
İnd DA*	13 (17.57)	8 (13.79)	17 (32.69)	3 (23.08)	0	0	0
AMC*	41 (55.41)	53 (91.8)	34 (65.38)	7 (53.85)	2 (25)	2 (100)	3 (100)
TET*	34 (45.95)	31 (53.45)	25 (48.08)	3 (23.08)	1 (12.5)	1 (50)	0
GN*	32 (43.24)	47 (81.03)	25 (48.08)	3 (23.08)	1 (12.5)	1 (50)	0
TEC*	0	0	0	0	0	0	0
LİN*	0	0	0	0	0	0	0

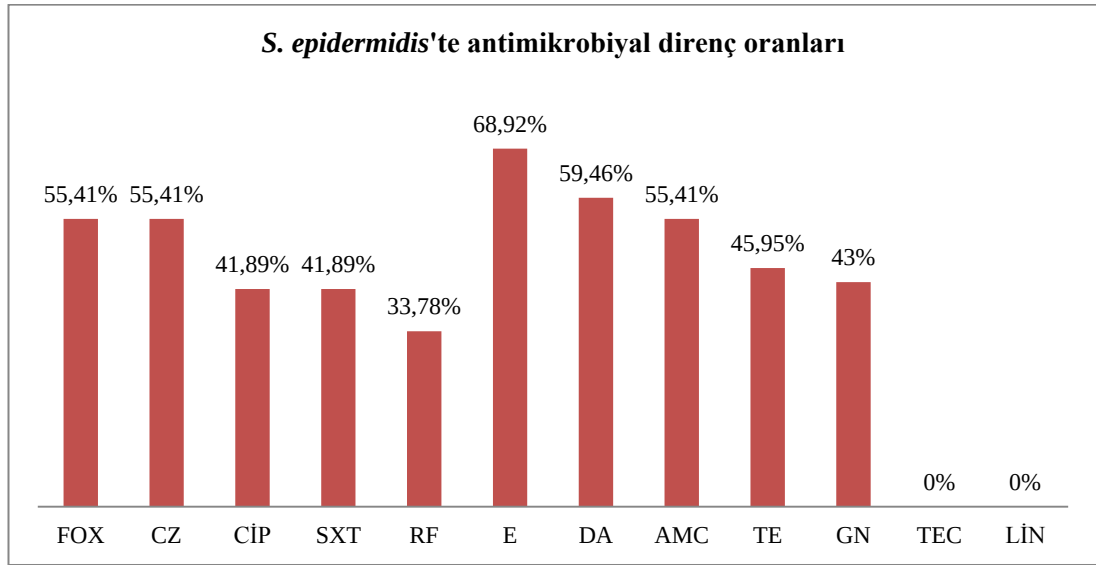
* FOX: Sefoksitin, CZ: Sefazolin, CİP: Siprofloksasin, SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol, RF: Rifampisin, E: Eritromisin, DA: Klindamisin, İnd DA: indüklenebilir klindamisin direnci, AMC: Amoksisilin klavulonata, TET: Tetrasiklin, GN: Gentamisin, VA: Vankomisin, DAP: Daptomisin, TEC: Teikoplanin ve LİN: Linezolid

** *S. saprophyticus* (n:2), *S. sciuri* (n:1)

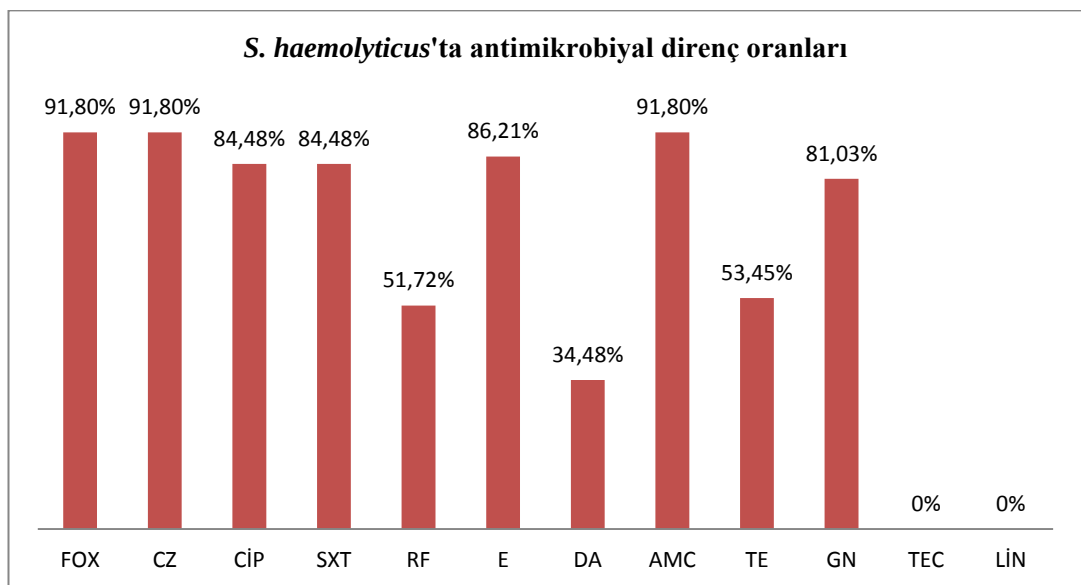
CLSI 2014 önerileri doğrultusunda oksasiline dirençli olarak saptanan KNS'ler, klinik olarak yeterli yanıt vermedikleri için, penisilinler, beta laktam/beta laktamaz inhibitör kombinasyonları gibi diğer beta laktam ajanlara da dirençli olarak kabul edilmektedirler. Dolayısıyla sefoksitin diski ile direnç saptanan KNS suşları sefazolin ve amoksisilin klavulanata da dirençli olarak kabul edilmiştir.

Şekil 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10 ve 4.11'de sırasıyla *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. capitis*, *S. warnerii* ve diğer KNS'lerin Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle elde edilen antimikrobiyal direnç oranları verilmiştir.

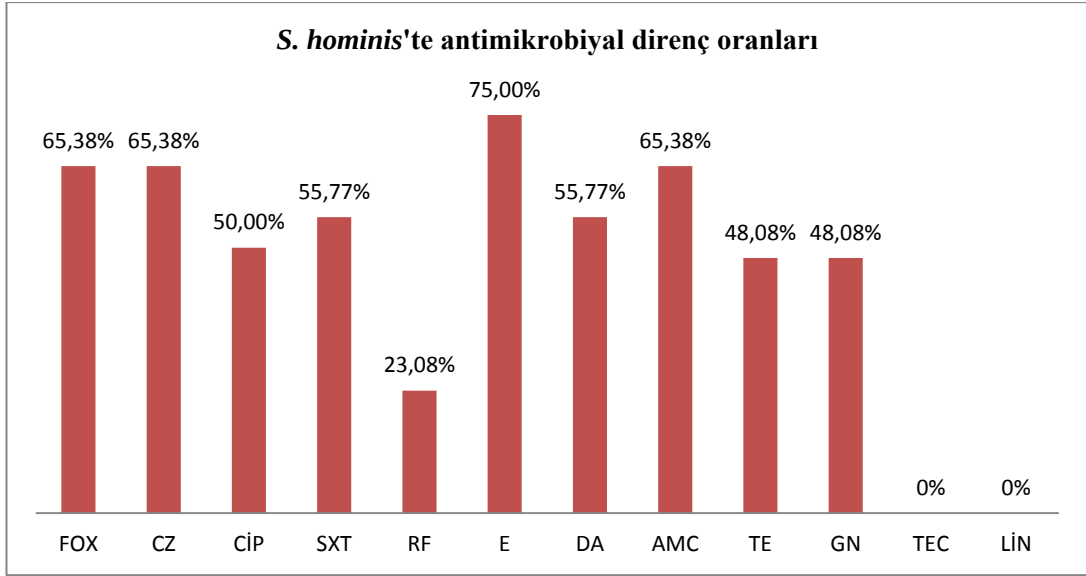
S. haemolyticus'ta sefoksitin (%91.8), sefazolin (%91.8), amoksisilin-klavulonat (%91.8), siprofloksasin (%84.48), trimetoprim-sülfametoksazol (%84.48), rifampisin (%51.72) ve gentamisine (%81.03) karşı direnç oranlarının diğer türlere göre anlamlı oranda yüksek olduğu ve klindamisine karşı direnç oranının da (%34.48) diğer türlere göre anlamlı oranda düşük olduğu saptanırken ($p<0.05$); eritromisin ve tetrasikline karşı olan direnç oranlarında türler arasında istatistiksel olarak farklılık saptanmamıştır.



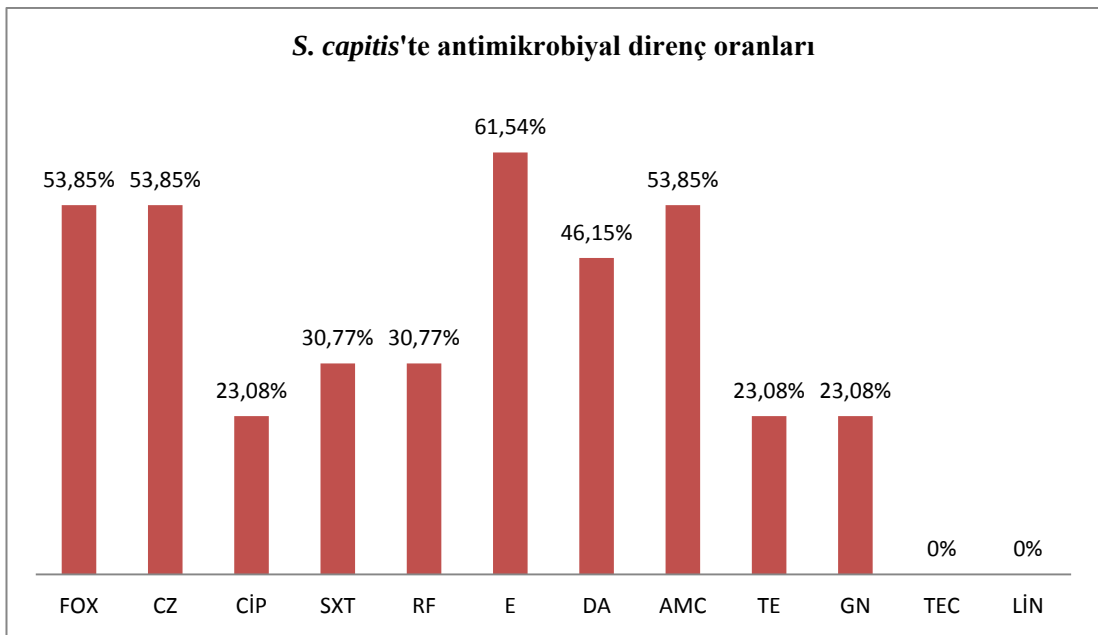
Şekil 4. 6. *S. epidermidis*'in antimikrobiyallere karşı direnç oranları



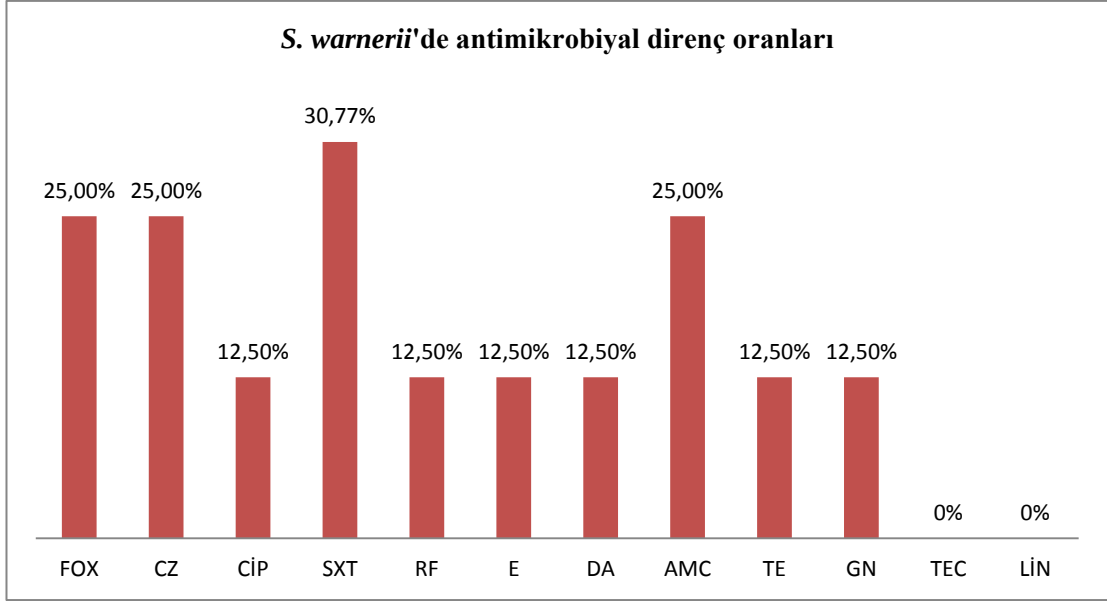
Şekil 4. 7. *S. haemolyticus*'un antimikrobiyallere karşı direnç oranları



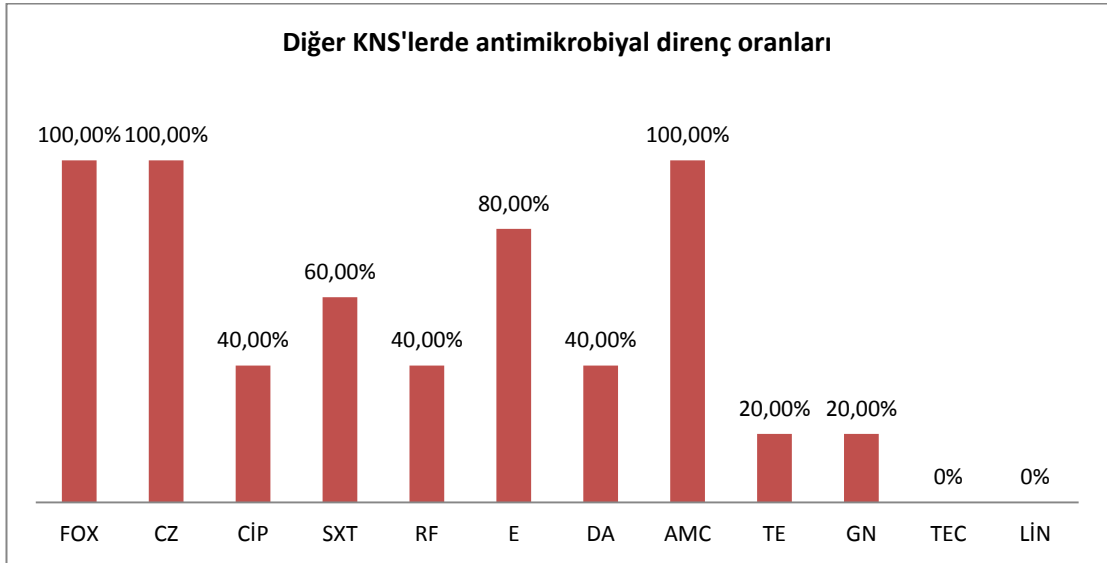
Şekil 4. 8. *S. hominis*'in antimikrobiyallere karşı direnç oranları



Şekil 4. 9. *S. capitis*'in antimikrobiyallere karşı direnç oranları



Şekil 4. 10. *S. warnerii*'nin antimikrobiyallere karşı direnç oranları



Şekil 4. 11. Diğer KNS'lerin antimikrobiyallere karşı direnç oranları

4.2.2. Vankomisin için Minimum İnhibitör Konsantrasyonun Değerlendirilmesi

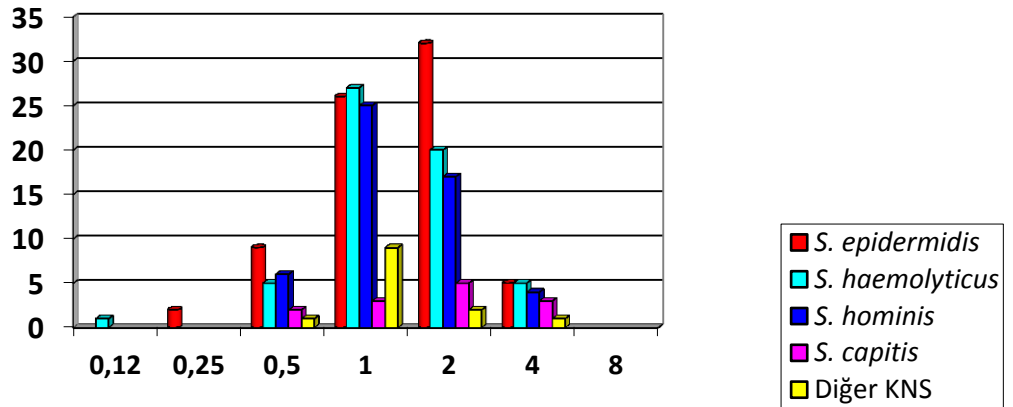
Suşların vankomisin için MİK değerleri CLSI (2014) verilerine göre değerlendirilmiştir. Çalışmadaki suşların hepsinin vankomisin MİK değerleri ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuş ve vankomisine duyarlı kabul edilmiştir (Tablo 3.3). Sonuçlar Tablo 4.7'de gösterilmiştir.

Tablo 4. 7. Vankomisin için MİK değerleri (tüm suşlar)

	0.12 µg/ml n (%)	0.25 µg/ml n (%)	0.5 µg/ml n (%)	1 µg/ml n (%)	2 µg/ml n (%)	4 µg/ml n (%)	Toplam n (%)
<i>S. epidermidis</i>	-	2 (0.95)	9 (4.28)	26 (12.38)	32 (15.23)	5 (2.38)	74 (35.23)
<i>S. haemolyticus</i>	1 (0.47)	-	5 (2.38)	2 (12.85)	20 (9.52)	5 (2.38)	58 (27.61)
<i>S. hominis</i>	-	-	6 (2.85)	25 (11.90)	17 (8.09)	4 (1.90)	52 (24.76)
<i>S. capitis</i>	-	-	2 (0.95)	3 (1.42)	5 (2.38)	3 (1.42)	13 (6.19)
Diğer KNS			1 (0.47)	9 (4.28)	2 (0.95)	1 (0.47)	13 (6.19)
Toplam	1 (0.47)	2 (0.95)	23 (10.95)	90 (42.85)	76 (36.19)	18 (8.57)	210 (100)

Suşların büyük bir bölümünün MİK değerinin 1 µg/ml [90 KNS (%42.85)] ve 2 µg/ml [76 KNS (%36.19)] olduğu görülmüştür. Diğer MİK değerlerine dağılan suş sayısı az olduğu için, hangi MİK dağılım aralığında yığılma olduğu ile ilgili suşlar arasında istatistiksel açıdan anlamlı fark olup olmadığı konusunda bir değerlendirim yapılamamıştır.

S.epidermidis, *S.haemolyticus*, *S.hominis* ve *S.capitis* suşlarının vankomisin MİK değerlerinin dağılım aralıkları Şekil 4.12’de gösterilmiştir.



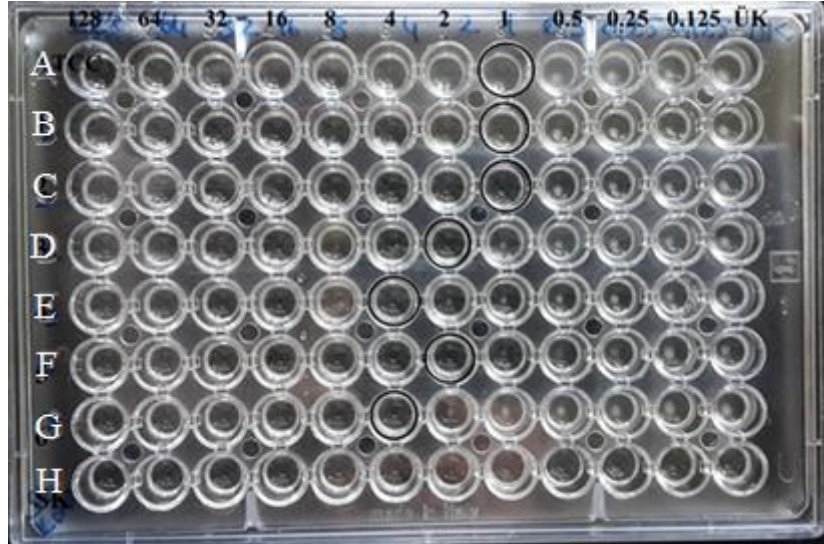
Şekil 4. 12. Vankomisin MİK değerlerinin suşlara göre dağılım aralıkları (µg/ml)

KNS suşlarının izole edildikleri klinik örneklerle göre vankomisin MİK dağılımı Tablo 4.8’de özetlenmiştir.

Tablo 4. 8. Klinik örneklere göre vankomisin MİK dağılımı

Örnekler			0.12 µg/ml n (%)	0.25 µg/ml n (%)	0.5 µg/ml n (%)	1 µg/ml n (%)	2 µg/ml n (%)	4 µg/ml n (%)	Toplam n (%)
İnvaziv Örnekler (n=119)	KİKDE etkeni	Kan	-	1 (0.47)	1 (0.47)	9 (4.28)	4 (1.90)	-	15 (7.14)
		Kateter	-	1 (0.47)	1 (0.47)	9 (4.28)	4 (1.90)	-	15 (7.14)
	Periferik kan (kateteri olmayan)		-	-	7 (3.34)	32 (15.24)	39 (18 57)	11 (5.24)	89 (42.38)
İnvaziv olmayan Örnekler (n=91)	El		-	-	11 (5.24)	17 (8.10)	2 (0.95)	-	30 (14.29)
	Burun		-	-	1 (0.47)	6 (2.86)	13 (6.19)	6 (2.86)	26 (12.38)
	Kateter kolonizasyonu		1 (0.47)	-	2 (0.95)	17 (8.10)	14 (6.67)	1 (0.47)	35 (16.67)
Toplam			1 (0.47)	2 (0.95)	23 (10.95)	90 (42.86)	76 (36.19)	18 (8.57)	210 (100)

İnvaziv olan ve olmayan örneklerden izole edilen KNS suşları arasında vankomisin MİK değerleri açısından anlamlı farklılık saptanamamıştır ($p=0.117$). Suşların izole edildikleri bölgelere göre vankomisin MİK değerleri karşılaştırıldığında; burundan ve periferik kan kültürlerinden izole edilen KNS'lerde MİK değeri istatistiksel olarak anlamlı oranda daha yüksek bulunmuştur ($p<0.001$).



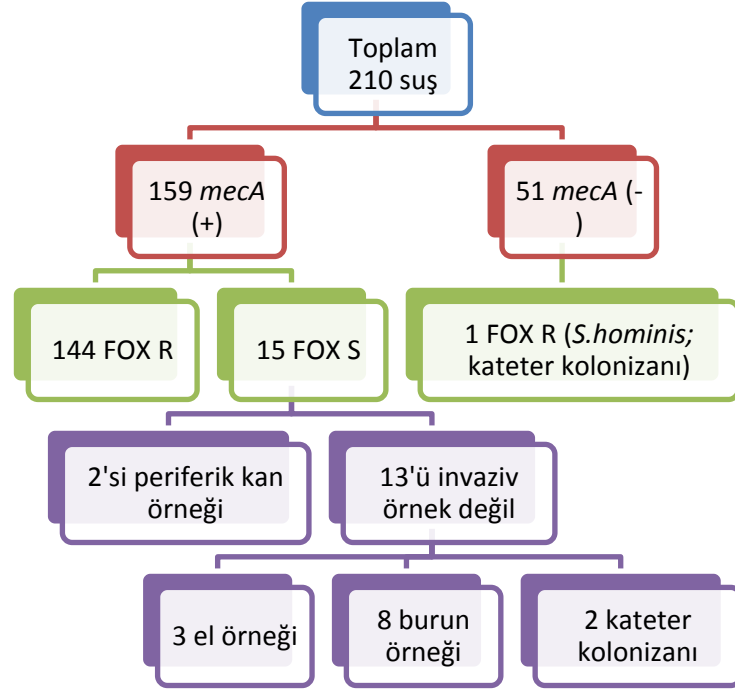
Şekil 4. 13. Sıvı Mikrodilüsyon yöntemi ile suşların vankomisin MİK değerlerinin belirlenmesi

Suşıların MİK değerlerini gösteren kuyucuklar siyah daire içine alınmıştır. H sırasındaki tüm kuyucuklar sterilizasyon kontrolü, mikroorganizma konulan her sıranın sonundaki kuyucuk ise üreme kontrolü için kullanılmıştır. ATCC: *S. aureus* ATCC 29213; ÜK: üreme kontrolü

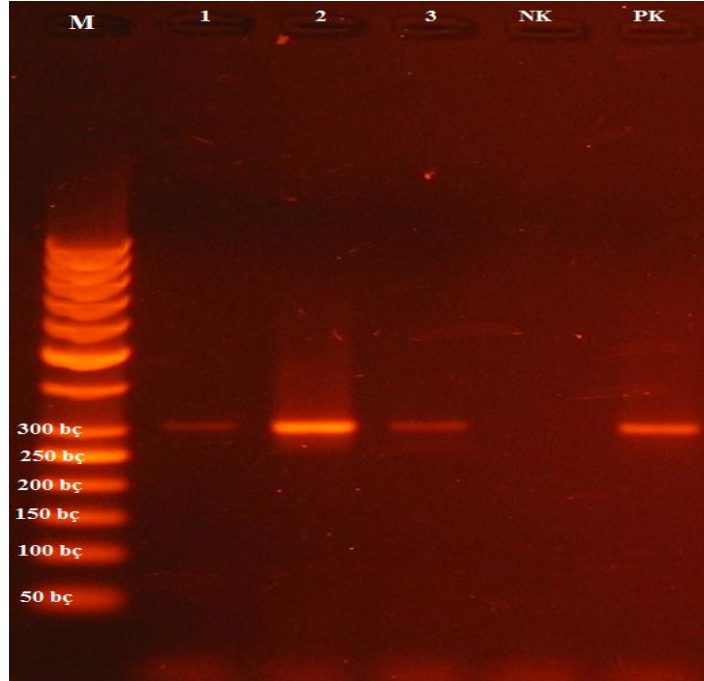
4.3. *mecA* Geni Varlığına Bakılması

Suşıların *mecA* geni varlığına PZR yöntemiyle bakılmıştır. Toplam 210 KNS suşunun 159'unda (%78.09) *mecA* geni varlığı saptanmıştır. Bu 159 suşun 144'ü (%90.57) CLSI (2014) tarafından önerilen fenotipik yöntem olan Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile sefoksitin diski kullanılarak metisilin dirençli olarak saptanırken, 15'i (%9.43) bu yöntem ile metisilin duyarlı bulunmuştur. *mecA* geni taşıdığı halde fenotipik olarak duyarlı bulunan 15 suşun, 13'ü invaziv olmayan örneklerden izole edilen suşlar iken (3 el, 8 burun, 2 kateter kolonizasyon örneği), 2'si periferik kan kültüründen izole edilen KNS örneğidir. *mecA* geni negatif olarak bulunan toplam 51 suşun, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle saptanan direnç oranlarına bakıldığında, kateter kolonizasyonu etkeni olan bir *S. hominis* suşunda disk difüzyon yöntemiyle direnç saptandığı görülmüştür (Şekil 4.14). Buna göre metisilin direnci saptanmasında *mecA* geni bulunması altın standart olarak kabul edildiğinde, sefoksitin diski kullanılarak yapılan metisilin direnci saptanması yönteminin duyarlılığı %91 (testin güven aralığı: %85–94), özgüllüğü %98, (testin güven aralığı: %89–99), negatif prediktif değeri %76.92 (testin güven aralığı: %71–82), pozitif prediktif değeri %99.31 (testin güven aralığı: %97–99) olarak saptanmıştır.

İnvaziv olan ve olmayan örneklerde fenotipik ve genotipik yöntemler ile saptanan metisilin direncinin karşılaştırılması Tablo 4.9'da verilmiştir.



Şekil 4. 14. Suşların *mecA* direnç geni varlığı ve Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle saptanan metisilin direnç durumlarının karşılaştırılması (FOX: sefoksitin; S: duyarlı; R: dirençli)



Şekil 4. 15. Suşlarda *mecA* geni varlığının PZR yöntemiyle gösterilmesi

Şekil 4.15'te Hat 1, 2 ve 3: *mecA* pozitif (310 bç) olarak izlenmektedir [PK: pozitif kontrol; *S. aureus* ATCC BAA-42, NK: negatif kontrol; M: Moleküler büyüklük belirteci: Gene ruler 50 bç, ready-to-use, 50-1.000, (Thermo, Almanya)].

Tablo 4. 9. İnvaziv olan ve olmayan örneklerde fenotipik ve genotipik yöntemler ile saptanan metisilin direncinin karşılaştırılması

<i>mecA</i> geni pozitif olan suşlar				
		FOX		Toplam
		S (Duyarlı) n (%)*	R (Dirençli) n (%)*	
İnvaziv olmayan örnekler	Ellerden alınan örnekler	3 (1.43)	8 (3.81)	11 (5.24)
	Burundan alınan örnekler	8 (3.81)	12 (5.71)	20 (9.52)
	Kateter kolonizasyonu	2 (0.95)	26 (12.2)	28 (13.33)
İnvaziv Örnekler	Periferik Kan (kateter takılı olmayan)	2 (0.95)	74 (35.8)	76 (36.19)
	KİKDE	Kan örneği	12 (5.71)	12 (5.71)
	Etkeni		12 (5.71)	12 (5.71)
Toplam		15 (7.14)	144 (68.57)	159 (75.71)

*Toplam suş sayısına göre (210) hesaplanmıştır

İnvaziv örneklerin %84.03'ünde (100/119) *mecA* geni pozitif, %15.97'sinde (19/119) negatif olarak bulunurken; invaziv olmayan örneklerin %64.84'ünde (59/91) *mecA* geni saptanmış, %35.16'sında (32/91) saptanamamıştır. İnvaziv örneklerden izole edilen KNS suşlarında *mecA* geninin yüksek oranda pozitif, invaziv olmayan örneklerden izole edilenlerde ise *mecA* geninin yüksek oranda negatif olarak saptanması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$).

Suşlar izole edildikleri yerlere göre gruplandırılarak birbirleriyle karşılaştırıldıklarında, ellerden izole edilen 30 suşun 19'unda (%63.3) *mecA* geninin negatif olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$).

Periferik kan kültürlerinden izole edilen KDE etkeni (13/13; %100) ile kontaminasyon (63/76; %82.89) olarak kabul edilen KNS'ler arasında *mecA* pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamamıştır ($p=0.201$).

İnvaziv olan ve olmayan örneklerle göre, suşların sefoksitin diski kullanılarak yapılan Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle saptanan metisilin direnç oranlarının *mecA* geni varlığı ile karşılaştırmalı sonuçları Tablo 4.9 ve Tablo 4.10’da verilmiştir.

Tablo 4. 10. İnvaziv olan ve olmayan örneklerde *mecA* geni negatif olarak bulunan suşların Kirby- Bauer disk difüzyon yöntemiyle saptanan sefoksitin direnç oranlarının karşılaştırılması

mecA geni negatif olanlar					
			FOX		Toplam
			S (Duyarlı) n (%)*	R (Dirençli) n (%)*	
İnvaziv olmayan örnekler	Ellerden alınan örnekler		19 (9.05)	-	19 (9.05)
	Burundan alınan örnekler		6 (2.86)	-	6 (2.86)
	Kateter kolonizasyonu etkeni olanlar		6 (2.86)	1 (0.48)	7 (3.33)
İnvaziv Örnekler	Periferik kan (kateter takılı olmayan)		13 (6.19)	-	13 (6.19)
	KİKDE etkeni	Kan örneği	3 (1.43)	-	3 (1.43)
		Kateter örneği	3 (1.43)	-	3 (1.43)
Toplam			48 (23.81)	1 (0.48)	51 (24.29)

*Toplam suş sayısına göre (210) hesaplanmıştır

Toplam 210 KNS suşunda fenotipik ve genotipik yöntemler ile saptanan metisilin direncinin türlere göre dağılımı karşılaştırmalı olarak Tablo 4.11’de verilmiştir. Buna göre *mecA* pozitif 159 suşun 50’sini *S. epidermidis* (%31.45), 54’ünü *S. haemolyticus* (%33.96), 40’ını *S. hominis* (%25.16), 8’ini *S. capitis* (%5.03), 2’sini *S. warnerii* (%1.26), 2’sini *S. lugdunensis* (%1.26), 2’sini *S. saprophyticus* (%1.26), 1’ini *S. sciuri* (%0.63) oluşturmaktadır. Fischer exact testi ile suşlar türlerine göre incelendiğinde *S. haemolyticus*’ta *mecA* geninin yüksek oranda pozitif ($p<0.001$), *S. warnerii*’de ise yüksek oranda negatif saptanması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$).

Tablo 4. 11. KNS’lerde fenotipik ve genotipik yöntemler ile saptanan metisilin direncinin karşılaştırılması

	<i>mecA</i> geni pozitif (n:159) n (%)		<i>mecA</i> geni negatif (n:51) n (%)		Toplam
	FOX S	FOX R	FOX S	FOX R	
<i>S. epidermidis</i>	5 (2.38)	45 (21.43)	24 (11.43)	-	74 (35.24)
<i>S. haemolyticus</i>	2 (0.95)	52 (24.76)	4 (1.90)	-	58 (27.62)
<i>S. hominis</i>	7 (3.33)	33 (15.71)	11 (5.24)	1 (0.48)	52 (24.76)
<i>S. capitis</i>	1 (0.48)	7 (3.33)	5 (2.38)	-	13 (6.19)
<i>S. warnerii</i>	-	2 (0.95)	6 (2.86)	-	8 (3.81)
<i>S. lugdunensis</i>	-	2 (0.95)	-	-	2 (0.95)
<i>S. saprophyticus</i>	-	2 (0.95)	-	-	2 (0.95)
<i>S. sciuri</i>	-	1 (0.48)	-	-	1 (0.48)
Toplam	15 (7.14)	144 (68.57)	50 (23.81)	1 (0.48)	210 (100)

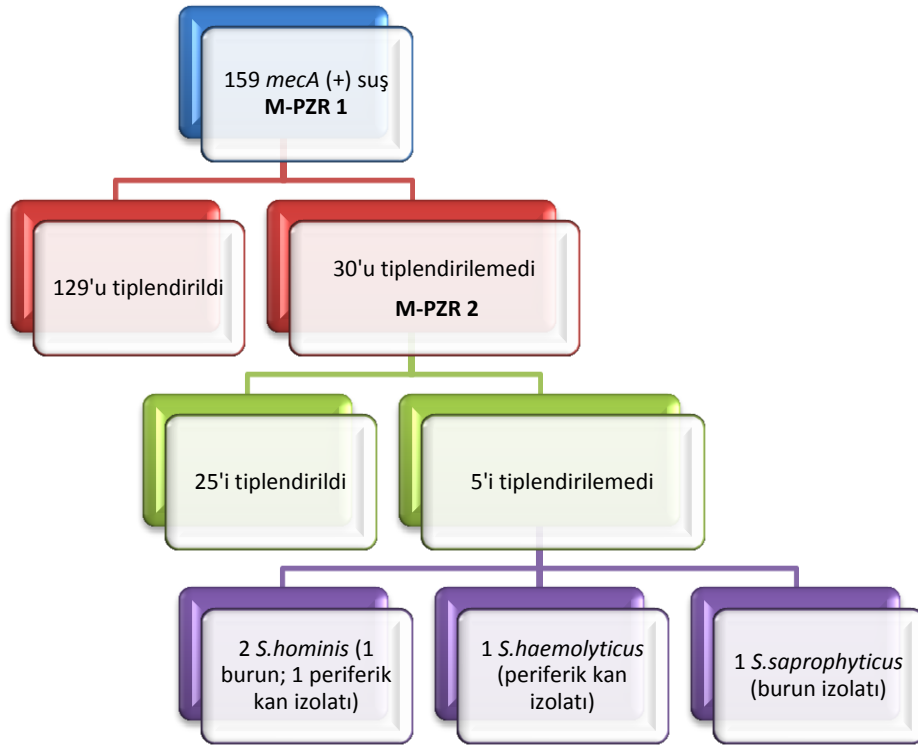
*Toplam suş sayısına göre (210) hesaplanmıştır

4.4. *mecA* Pozitif Olan Suşlara SCC*mec* Tiplendiriminin Yapılması

mecA geni pozitif bulunan 159 olan suşa SCC*mec* tiplendirimi amacıyla M-PZR 1 protokolü uygulanmıştır. Suşlardan 129’u bu protokol ile tiplendirilmiş, kalan 30 suşa M-PZR 2 protokolü ile tiplendirim yapılmış ancak 5 suş bu protokol ile de tiplendirilememiştir. Tiplendirimi yapılamayan suşların ikisinin *S. hominis* (birisi burun, birisi periferik kan kültüründen izole edilen), birinin *S. epidermidis* (periferik kan kültüründen izole edilen), birinin *S. haemolyticus* (periferik kan kültüründen izole edilen) ve birinin de *S. saprophyticus* (burundan izole edilen) suşları olduğu görülmüştür (Şekil 4.16).

Tiplendirimi yapılan 154 suşun 38’inin SCC*mec* tip I (%24.68), 27’sinin SCC*mec* tip II (%17.53), 3’ünün SCC*mec* tip III (%1.89), 59’unun SCC*mec* tip V (%38.31), 15’inin SCC*mec* tip VI (%9.74), 5’inin SCC*mec* tip I + V (%3.25), 2’sinin SCC*mec* tip I + II (%1.30), 2’sinin SCC*mec* tip I + III (%1.30), 2’sinin SCC*mec* tip II + V (%1.30) ve 1’inin SCC*mec* tip III + VI (%0.63) olduğu saptanmıştır. KNS suşlarının SCC*mec* tiplerine göre dağılımı Tablo 4.12’de verilmiştir.

SCC*mec* tip V ve SCC*mec* tip VI’da *S. haemolyticus* oranları sırasıyla %85 ve %54.7 olarak bulunmuştur ($p < 0.001$).



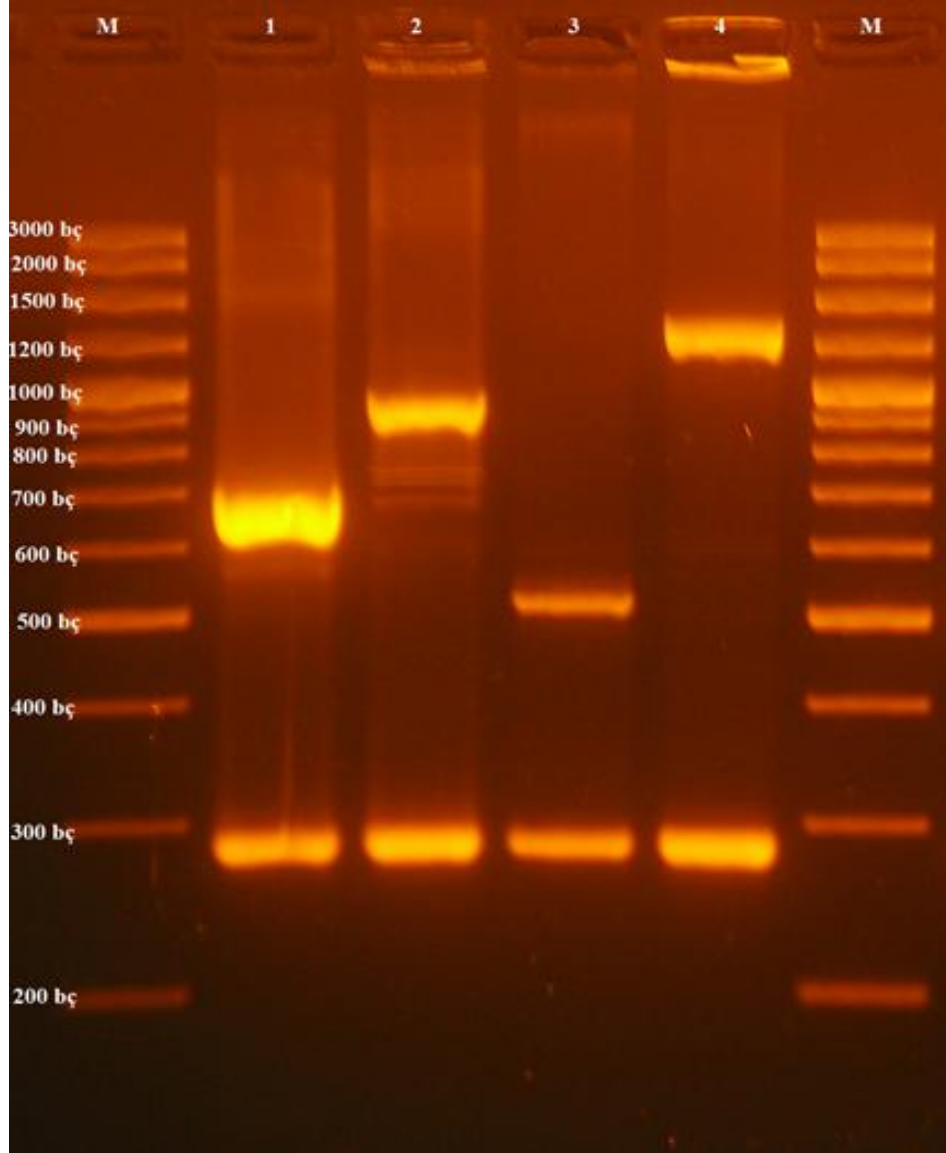
Şekil 4. 16. M-PZR 1 ve M-PZR 2 uygulanan suş sayıları

Tablo 4. 12. KNS suşlarının SCCmec tiplerine göre dağılımları

	TipI n (%)	TipII n (%)	TipIII n (%)	TipV n (%)	TipVI n (%)	Tip I + II n (%)	Tip I+III n (%)	Tip I + V n (%)	Tip III+VI n (%)	Tip II + V n (%)	Toplam n (%)
<i>S. epidermidis</i>	13 (8.44)	13 (8.44)	3 (1.95)	16 (10.39)	1 (0.65)	1 (0.65)	2 (1.30)	-	-	-	49 (31.82)
<i>S. haemolyticus</i>	7 (4.55)	3 (1.95)	-	29 (18.83)	13 (8.44)	-	-	-	-	2 (1.30)	54 (35.06)
<i>S. hominis</i>	15 (9.74)	8 (5.19)	-	8 (5.19)	1 (0.65)	1 (0.65)	-	3 (1.95)	1 (0.65)	-	38 (24.68)
<i>S. capitis</i>	2 (1.30)	3 (1.95)	-	3 (1.95)	-	-	-	-	-	-	8 (5.19)
<i>S. warnerii</i>	1 (0.65)	-	-	1 (0.65)	-	-	-	-	-	-	2 (1.30)
<i>S. lugdunensis</i>	-	-	-	1 (0.65)	-	-	-	1 (0.65)	-	-	2 (1.30)
<i>S. sciuri</i>	-	-	-	-	1 (0.65)	-	-	-	-	-	1 (0.65)
<i>S. saprophyticus</i>	-	-	-	1 (0.65)	-	-	-	-	-	-	1 (0.65)
Toplam	38 (24.68)	27 (17.53)	3 (1.95)	59 (38.31)	16 (10.39)	2 (1.30)	2 (1.30)	4 (2.60)	1 (0.65)	2 (1.30)	154 (100)

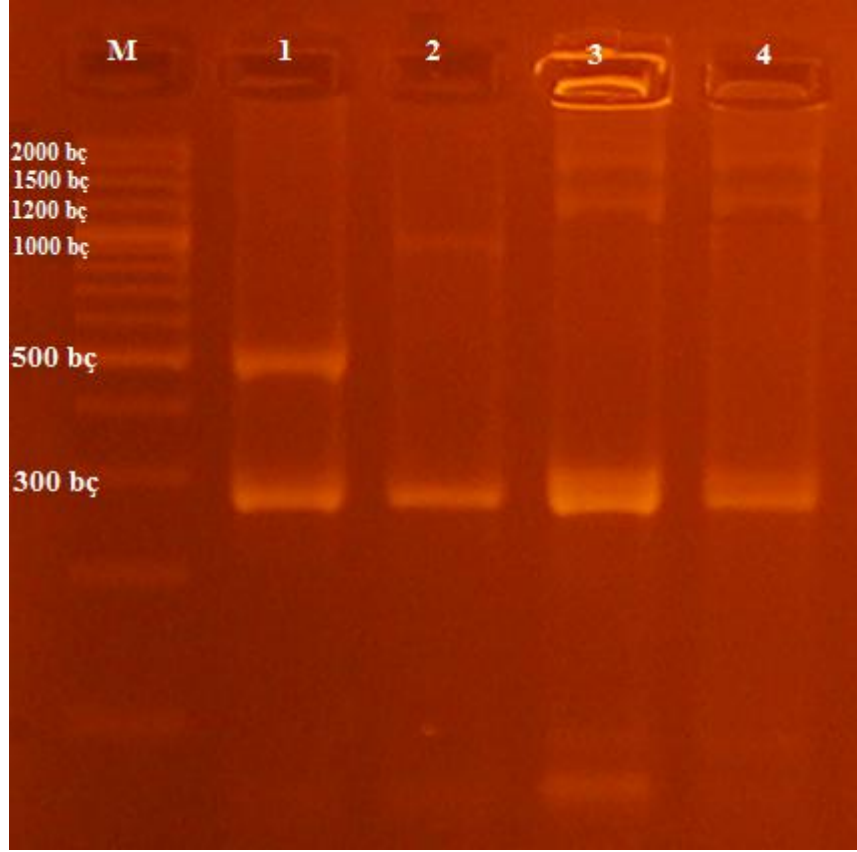
KDE etkeni 13 KNS'nin 10 (%76.92) tanesinin SCCmec tip I olduğu [5 (%38.46)'i *S. epidermidis*, 4 (%30.77)'ü *S. haemolyticus* ve 1 (%7.69)'i *S. hominis*], 3 (%23.08) tanesinin SCCmec tip II [1 (%7.69)'i *S. epidermidis*, 2 (%15.38)'si *S. haemolyticus*] olduğu saptanmıştır (Tablo 4.14) .

SCCmec M-PZR 1 ve M-PZR 2 ile saptanan SCCmec tiplerinin jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.17, 4.18 ve 4.19’da izlenmektedir.



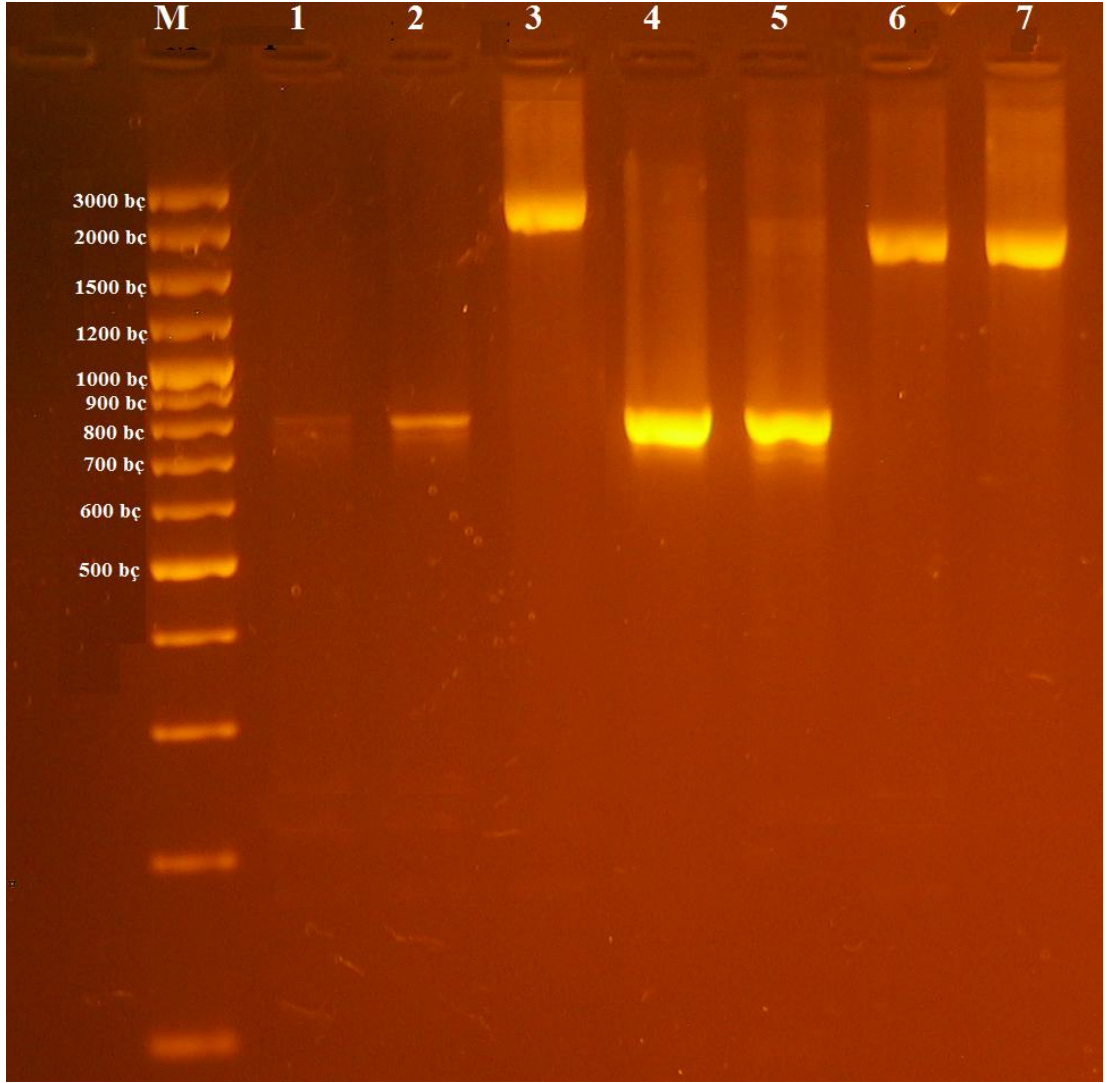
Şekil 4. 17. SCCmec M-PZR 1 ile tiplendirim sonucunda saptanan SCCmec tip I, tip II, tip V ve tip VI KNS örnekleri

SCCmec M-PZR 1 sonucunda; 1no’lu hat: tipI; 2 no’lu hat: tip II; 3 no’lu hat: tipV; 4 no’lu hat: tip VI olarak saptanmıştır [M: Moleküler ağırlık belirteci: Gene Ruler 100 bç plus, 100-3000 bç, (Thermo, Almanya)]



Şekil 4. 18. SCCmec M-PZR 1 ile tiplendirim sonucunda saptanan SCCmec tip V, tip III, tip III + tip VI KNS örnekleri

SCCmec M-PZR 1 sonucunda; 1no'lu hat: tip V; 2 no'lu hat: tip III; 3 ve 4 no'lu hatlar: tip III + tip VI olarak saptanmıştır [M: Moleküler ağırlık belirteci: Gene Ruler 100 bp plus, 100-3000 bp, (Thermo, Almanya)]



Şekil 4. 19. SCCmec M-PZR 2 ile tiplendirim sonucunda saptanan SCCmec tip I, tip II ve tip V KNS örnekleri

SCCmec M-PZR 2 sonucunda 1ve 2 no'lu hatlar: tip V; 3 no'lu hat: tip I; 4 ve 5 no'lu hatlar: tip V; 6 ve 7 no'lu hatlar: tip II olarak saptanmıştır [M: Moleküler ağırlık belirteci: Gene Ruler 100 bç plus, 100-3000 bç, Thermo, Almanya)]

4.5. Biyofilm Deneylerinin Sonuçları

4.5.1. Mikroplak Yöntemi ile Biyofilm Oluşumunun Kantitatif Olarak Değerlendirilmesi

Suşlar mikroplak yöntemiyle biyofilm oluşumlarının değerlendirilmesi amacıyla, 96 kuyucuklu düz tabanlı plakların üç farklı kuyucuğuna, materyal ve yöntemde anlatıldığı düzenekte yerleştirilmiştir. Pozitif kontrol olarak biyofilm oluşturduğu bilinen *S. aureus* ATCC 25923 ve *S.epidermidis* ATCC 35984, negatif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 29213, sterilite kontrolü için sadece besiyeri içeren, mikroorganizma ilave edilmemiş kuyucuklar kullanılmıştır. Cut off değerinin belirlenmesinde sadece besiyeri içeren ve negatif kontrol için kullanılan kuyucukların optik dansitometrelerinin ortalaması alınmış ve üç standart derivasyonu hesaplanarak OD_C değeri belirlenmiştir. OD_C değeri 0.28'in altında değer veren kuyucukta biyofilm oluşmadığı; 0.28-0.56 değerleri arasındaki kuyucuklarda zayıf (+ kuvvetinde) biyofilm oluştuğu; 0.57-1.12 değerleri arasındaki kuyucuklarda orta (++ kuvvetinde) düzeyde biyofilm oluştuğu; 1.13 ve üzerinde değer veren kuyucuklarda biyofilm oluşumunun kuvvetli (+++) olduğu kabul edilmiştir (Şekil 4.20) (Zmantar ve ark., 2010).

OD ≤0.28	negatif
0.28<OD ≤ 0.56	+
0.56< OD ≤ 1.12	++
1.12< OD	+++

Şekil 4. 20. Mikroplak yöntemi ile biyofilm oluşumunun kantitatif olarak hesaplanması

Suşların mikroplakta biyofilm oluşumlarının değerlendirilmesi sonucunda; toplam 210 suşun 48'i (%22.86) zayıf; 55'i (%26.19) orta; 33'ü (%15.71) kuvvetli biyofilm oluşturmuşlardır. Tablo 4.13'te suşların mikroplak yöntemiyle biyofilm oluşturma oranları örneklerin invaziv olup olmamalarına göre yorumlanmıştır. Biyofilm

oluşturan suşların 76'sı (76/136; %55.88) invaziv örneklerle ait iken, 59'unun (59/136; %43.38) invaziv olmayan örneklerle ait suşlar olduğu saptanmıştır. Suşların 74'ünün (%35.23) biyofilm oluşturmadağı, bunların 43'ünün (43/75; %57.33) invaziv örneklerle ait olduğu görülmüştür.

Mikroplak yöntemiyle biyofilm oluşumu açısından incelendiğinde, invaziv olan ve invaziv olmayan örneklerden izole edilen KNS suşları arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$).

Tablo 4. 13. İnvaziv olan ve olmayan KNS suşlarının mikroplak yöntemiyle biyofilm oluşturma oranları

Örnekler n:210	Biyofilm oluşturmayan n:74	Biyofilm oluşturan n:136			TOPLAM n (%)*
	Mikroplak (-) n (%)*	Mikroplak (+) n (%)*	Mikroplak (++) n (%)*	Mikroplak (+++) n (%)*	
İnvaziv Örnekler	42 (20)	27 (12.86)	36 (17.14)	14 (6.66)	119 (56.67)
İnvaziv Olmayan Örnekler	32 (15.71)	21(10)	19 (9.04)	19 (9.04)	91 (43.33)
TOPLAM	74 (35.23)	48 (22.86)	55 (26.19)	33 (15.71)	210 (100)

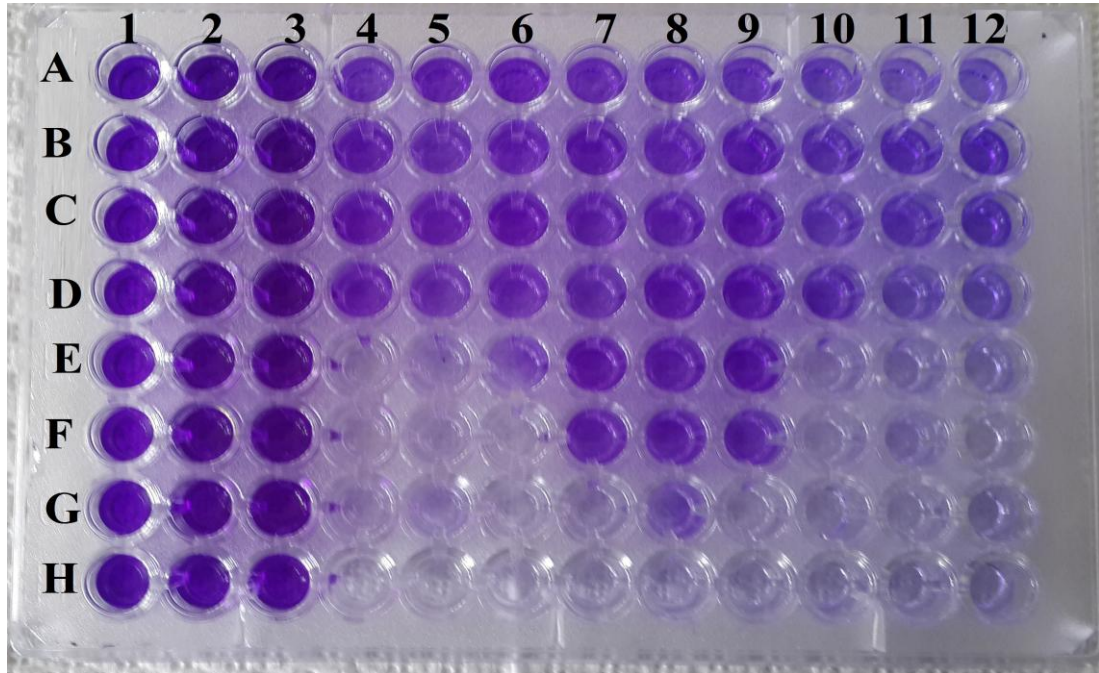
*Toplam suş sayısı (210) üzerinden hesaplanmıştır

İzole edildikleri yerlere göre incelendiğinde; KİKDE etkeni olan ve kateter kolonizasyonu yapan KNS suşlarında mikroplak yönteminde biyofilm oluşturma oranının diğerlerine göre daha yüksek saptanması istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p< 0.001$). Periferik kan kültürlerinden ve ellerden izole edilen KNS'lerin ise mikroplak yönteminde biyofilm oluşturmama oranı diğerlerine göre anlamlı oranda yüksektir ($p< 0.001$). Kan kültürlerinden izole edilen KDE etkenleri ve kontaminasyon olarak kabul edilen KNS'lerde mikroplakta biyofilm oluşturma oranları karşılaştırıldığında; KDE etkeni olanlarda mikroplakta biyofilm oluşturma oranının (11/13; %84.62), kontaminantlara (36/74; %48.65) göre daha yüksek olduğu görülmüştür ($p< 0.01$). KDE etkeni olan KNS'lerin özellikleri Tablo 4.14'te izlenmektedir. Mikroplakta biyofilm oluşumu için hazırlanan düzenek Şekil 4. 21'de gösterilmiştir.

Tablo 4. 14. KDE etkeni KNS'lerin özellikleri

Suş No	Suş*	SCC <i>mec</i> Tipi	<i>icaA</i>	<i>icaD</i>	IS256	KRA 24 saat	Mikroplakta biyofilm sonucu	Vankomisin		MBEK/ MİK
								MİK µg/ml	MBEK µg/ml	
2 KAN	<i>S. epidermidis</i>	I	+	+	-	+	++	1	2	2
152 KAN	<i>S. epidermidis</i>	II	-	-	+	+	++	2	4	2
192 KAN	<i>S. epidermidis</i>	II	-	+	-	-	++	4	64	16
225 KAN	<i>S. epidermidis</i>	III	-	+	+	+	++	1	16	16
226 KAN	<i>S. epidermidis</i>	II	+	+	-	-	++	1	2	2
4 N KAN	<i>S. epidermidis</i>	II	+	-	-	+	++	2	4	2
155 KAN	<i>S. haemolyticus</i>	VI	-	-	+	-	-	2	4	2
196 KAN	<i>S. haemolyticus</i>	V	-	-	-	-	-	1	1	1
203 KAN	<i>S. haemolyticus</i>	V	-	+	+	+	++	2	64	32
205 KAN	<i>S. haemolyticus</i>	V	-	+	+	+	++	2	4	2
213 KAN	<i>S. haemolyticus</i>	II	-	-	+	+	++	2	64	32
61839 KAN	<i>S. haemolyticus</i>	I	-	+	+	+	+++	2	8	4
193 KAN	<i>S. hominis</i>	I	-	+	+	-	+	2	4	2

* Bütün suşlar *mecA* geni pozitifdir



Şekil 4. 21. Düz tabanlı 96 kuyucuklu mikroplaklarda oluşturulan 24 saatlik biyofilmlerin spektrofotometrede değerlendirme aşamasından önce makroskobik görünümü

Her suş üçer kuyucukta çalışılmıştır. En alt sırada bulunan H-1, H-2, H-3'te; pozitif kontrol: *S. epidermidis* ATCC 35984, H-4, H-5, H-6'da; sadece besiyeri içeren mikrorganizma içermeyen kuyucuklar, H-7, H-8, H-9'da ; negatif kontrol: *S. aureus* ATCC 29213 izlenmektedir.

Mikroplakta biyofilm oluşumu açısından KNS suşları tek tek incelendiğinde; 74 *S.epidermidis* suşunun 57'si (%77.02); 58 *S.haemolyticus*'un 33'ü (%56.89); 52 *S.hominis*'in 36'sı (%69.23) ve 13 *S.capitis*'in 7'si (%53.84) biyofilm oluşturmuştur (Tablo 4.15). *S. epidermidis* ve *S. hominis* suşlarının biyofilm oluşturma oranlarının diğer suşlara göre yüksek olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

Tablo 4. 15. KNS suşlarının mikroplakta biyofilm oluşturma oranları

	Mikroplak (-) n (%)*	Mikroplak (+) n (%)*	Mikroplak (++) n (%)*	Mikroplak (+++) n (%)*	Toplam n (%)*
<i>S. epidermidis</i>	17 (8.10)	21 (10)	21 (10)	15 (7.14)	74 (35.24)
<i>S. haemolyticus</i>	25 (11.90)	14 (6.66)	13 (6.19)	6 (2.85)	58 (27.62)
<i>S. hominis</i>	16 (7.61)	7 (7.14)	19 (9.05)	10 (4.76)	52 (24.76)
<i>S. capitis</i>	6 (2.85)	3 (1.42)	2 (0.95)	2 (0.95)	13 (6.19)
<i>S. warnerii</i>	8 (3.80)	-	-	-	8 (3.80)
<i>S. lugdunensis</i>	1 (0.48)	1 (0.48)			2 (0.95)
<i>S. saprophyticus</i>	1 (0.48)	1 (0.48)	-	-	2 (0.95)
<i>S. sciuri</i>	-	1 (0.48)	-	-	1 (0.48)
Toplam	74 (35.23)	48 (22.86)	55 (26.19)	33 (15.71)	210 (100)

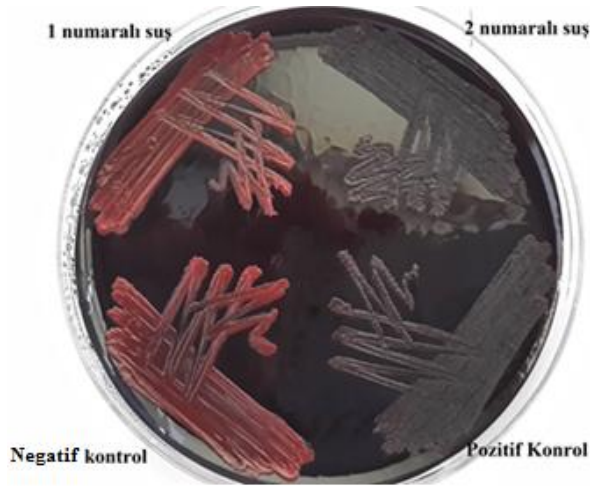
4.5.2. Kongo Red Agar Yöntemi ile Slime Faktörü Oluşumunun Fenotipik Olarak Gösterilmesi

KRA'ya ekimi takiben 24. saatte kuru kristal kıvamında, siyah renkli koloni oluşturan suşlar slime faktörü pozitif olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.22). Buna göre toplam 210 suşun 68'i (%32.38) slime faktörü pozitif, 142'si (%67.62) slime faktörü negatif olarak değerlendirilmiştir. Slime faktörü pozitif olan 68 suşun 41 (41/68; %60.29)'inin invaziv suşlar, 27'sinin (27/68; %39.71) ise invaziv olmayan suşlar olduğu görülmüştür. KRA yöntemi ile slime faktörü oluşturmayan 142 suşun 78'i (78/142; %54.93) invaziv, 64'ü (64/142; %45.07) ise invaziv olmayan suşlardır (Tablo 4.13).

KRA ekimlerinin 24. ve 48. saatlerde oluşan kolonilerdeki farklılıklar incelendiğinde; 24. saatte daha fazla pozitiflik tespit edilmiş; 24 saatte değerlendirildiğinde negatif olarak bulunan hiçbir suşun 48. saatte pozitif olarak yorumlanmadığı görülmüştür. İstatistiksel olarak da KRA ile 24 saatte elde edilen sonuçlar 48 saatteki sonuçlara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$).

Bu nedenle çalışmamızda elde edilen ön verilerin değerlendirilmesinden sonra, KRA yöntemi ile slime faktörü oluşumunun fenotipik olarak değerlendirilmesinde 24. saatte elde edilen veriler kullanılmıştır.

İnvaziv olan suşlar arasında KRA’da slime faktörü pozitif olarak değerlendirilen 41 (41/119), invaziv olmayanlarda pozitif olarak değerlendirilen 27 (27/91) suş bulunmaktadır (Tablo 4.16). KRA’da slime faktörü oluşumu açısından toplam suş sayısı üzerinden değerlendirildiğinde invaziv olan ve olmayan gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). İzole edildikleri yerlere göre incelendiğinde ise KİKDE etkeni olan KNS suşlarında KRA’da slime faktör oluşumu anlamlı oranda yüksek (%60) olarak saptanmıştır ($p<0.001$).



Şekil 4. 22. Slime faktörünün fenotipik olarak KRA’da gösterilmesi

1 numaralı suş: slime faktör negatif, 2 numaralı suş: slime faktör pozitif

Tablo 4. 16. İnvaziv olan ve olmayan KNS suşlarının KRA yöntemiyle slime faktörü oluşturma oranları

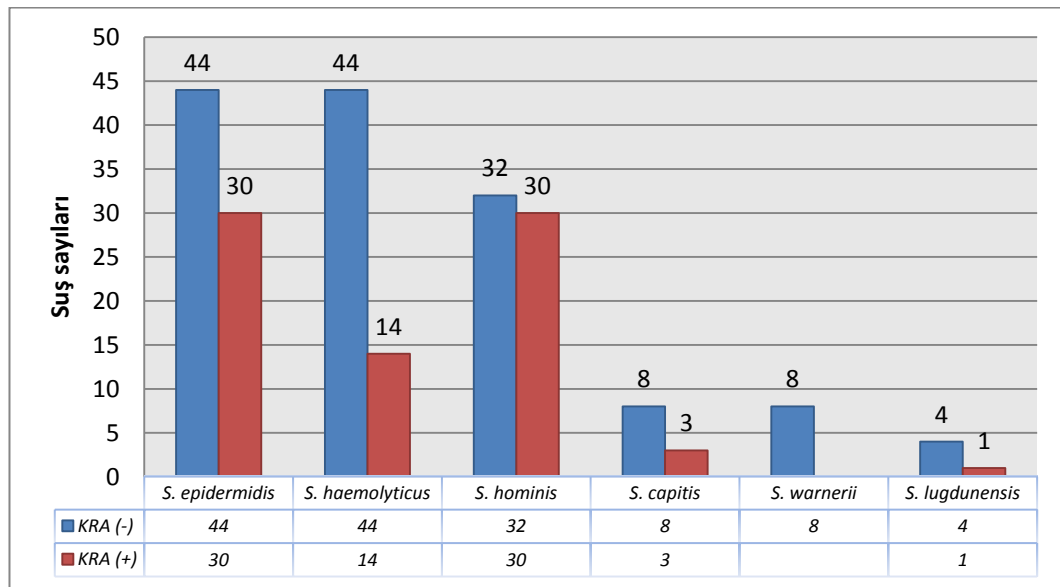
KNS Suşları	KRA (+) n (%)*	KRA (-) n (%)*
İnvaziv olan	41 (19.52)	78 (37.14)
İnvaziv olmayan	27 (12.85)	64 (30.47)
Toplam	68 (32.38)	142 (67.62)

*Toplam suş sayısı (210) üzerinden hesaplanmıştır KRA(+): KRA’da slime faktörü oluşumu gösterenler; KRA(-)’da slime faktörü oluşumu göstermeyenler

KRA besiyerine ekim yöntemiyle slime faktörü oluşumu açısından KNS suşları tek tek incelendiğinde; 74 *S.epidermidis* suşunun 30'u (%40.54); 58 *S. haemolyticus*'un 14'ü (%24.14); 52 *S. hominis*'in 20'si (%38.46) ve 13 *S. capitis*'in 3'ünün (%23.08) slime faktör oluşturduğu saptanmıştır. İstatistiksel olarak türler arasında KRA slime faktör oluşumu oranları incelendiğinde anlamlı farklılık saptanmamıştır (p=0.463) (Tablo 4.17).

Tablo 4. 17. KNS suşlarının türlere göre KRA'da slime faktörü oluşturma oranları

	<i>S. epidermidis</i> n (%)	<i>S. haemolyticus</i> n (%)	<i>S. hominis</i> n (%)	<i>S. capitis</i> n (%)	<i>S. warnerii</i> n (%)	<i>S. lugdunensis</i> n (%)	<i>S. saprophyticus</i> n (%)	<i>S. sciuri</i> n (%)	Toplam n (%)
KRA (-)	44 (20.95)	44 (20.95)	32 (15.24)	10 (4.76)	8 (3.81)	2 (0.95)	1 (0.48)	1 (0.48)	142 (67.62)
KRA (+)	30 (14.29)	14 (6.67)	20 (9.52)	3 (1.43)	-	-	1 (0.48)	-	68 (32.38)
Toplam	74 (35.24)	58 (27.62)	52 (24.76)	13 (6.19)	8 (3.81)	2 (0.95)	2 (0.95)	1 (0.48)	210 (100)



Şekil 4. 23. KRA'da slime faktörü oluşturan suşların türlere göre dağılımı

Tablo 4.18'de biyofilm oluşumunu değerlendirmede kullanılan mikropalak yöntemi ve slime faktörü oluşumunu değerlendirmede kullanılan KRA yöntemi ile elde edilen

sonuçların karşılaştırması verilmiştir. Mikroplak yöntemi ile biyofilm oluşturmamayan suşların biri hariç tamamı KRA yönteminde de negatif olarak değerlendirilmiştir. KRA deneyleri iki kez tekrarlanmış ve bağımsız iki araştırmacı tarafından değerlendirilmiş, mikroplak deneyi üç farklı kuyucukta gerçekleştirilmiştir. Buna karşın kateter kolonizasyonu örneği olan bir adet *S.haemolyticus* suşu mikroplak yönteminde biyofilm oluşturmazken, KRA’da 24. saatte siyah koloni oluşturmuş ve pozitif olarak değerlendirilmiştir. Aynı suşun araştırılan biyofilm genlerinden *icaA* genini taşımazken, *icaD* ve IS256 genleri pozitif olduğu gösterilmiştir. Suşun bazı genleri taşımasından yola çıkarak, farklı koşullar altında biyofilm ekspresyonunda değişkenlik olabileceği yorumunda bulunulmuştur.

Tablo 4. 18. Mikroplakta biyofilm oluşturan suşlar ile KRA’da 24 saatte slime faktörü pozitif olarak değerlendirilen invaziv olan ve olmayan suşların karşılaştırmalı analizi

Örnekler					Mikroplak (-) n (%)	Mikroplak (+) n (%)	Mikroplak (++) n (%)	Mikroplak (+++) n (%)	Toplam n (%)	
İnvaziv Örnekler (n=119)	KİKDE	Kan	KRA	+	-	1 (0.47)	6 (2.85)	2 (0.95)	9 (4.28)	
				-	1 (0.47)	2 (0.95)	1 (0.47)	2 (0.95)	6 (2.85)	
		Kateter	KRA	+	-	1 (0.47)	6 (2.85)	2 (0.95)	9 (4.28)	
				-	1 (0.47)	2 (0.95)	1 (0.47)	2 (0.95)	6 (2.85)	
		Periferik kan (kateteri olmayan)		KRA	+	-	2 (0.95)	16 (7.61)	5 (2.38)	23 (10.95)
					-	41 (19.52)	18 (8.57)	6 (2.85)	1 (0.47)	66 (31.42)
İnvaziv olmayan Örnekler (n=91)		El	KRA	+	-	4 (1.90)	2 (0.95)	1 (0.47)	7 (7.14)	
				-	15 (7.14)	5 (2.38)	2 (0.95)	1 (0.47)	23 (10.95)	
		Burun	KRA	+	-	2 (0.95)	2 (0.95)	8 (3.80)	12 (5.71)	
				-	10 (4.76)	3 (1.42)	1 (0.47)	-	14 (6.66)	
		Kateter kolonizasyonu	KRA	+	1 (0.47)	-	3 (1.42)	4 (1.90)	8 (3.80)	
				-	5 (2.38)	8 (3.80)	9 (4.28)	5 (2.38)	27 (12.85)	
Toplam					74 (35.23)	48 (22.86)	55 (26.19)	33 (15.71)	210 (100)	

Buna karşılık mikroplak yöntemiyle zayıf, orta ya da kuvvetli pozitif biyofilm oluşturduğu gösterildiği halde KRA’da negatif olarak saptanan suşlar bulunmaktadır. KRA yöntemi mikroplak yöntemi ile karşılaştırıldığında; KRA’nın mikroplakta biyofilm oluşturan suşları yakalama ilişki katsayısı $\Phi = 0.489$ olarak saptanmıştır. Özellikle mikroplak yönteminde zayıf (+) biyofilm oluşumu gösteren 20 adet periferik kan KNS suşunun 18’inin KRA’da negatif olarak izlenmesi dikkat çekici bulunmuştur. Toplamda bakılacak olursa; mikroplakta (+) kuvvetinde biyofilm oluşumu gösteren 48 adet KNS suşunun 37’si (37/47; %78.72) KRA’da negatif

olarak izlenmiştir. Mikroplakta (++) kuvvetinde biyofilm oluşumu gösteren 55 adet KNS suşunun 20'si (20/55; %36.36) KRA'da negatif olarak izlenmiştir. Son olarak, 33 adet mikroplakta (+++) kuvvetinde biyofilm oluşumu gösteren KNS suşunun 11'i (11/33; %33.33) KRA'da negatif olarak izlenmiştir. KRA; mikroplakta (+) kuvvetinde biyofilm oluşturan suşların 10'unda (10/48), (++) kuvvetinde biyofilm oluşturan suşların 35'inde (35/55), (+++) kuvvetinde biyofilm oluşturan suşların ise 22'sinde (22/33) pozitif olarak saptanmıştır. Mikroplak yönteminde biyofilm oluşturma gücü (pozitiflik derecesi) arttıkça KRA yönteminin de pozitif olanları saptama olasılığının arttığı görülmektedir (ilişki katsayısı, Cramer's V= 0.608).

Tablo 4. 19. Mikroplakta biyofilm oluşturan suşlar ile KRA'da 24 saatte slime faktörü oluşturan invaziv olan ve olmayan suşların türlere göre karşılaştırmalı analizi

			Mikroplak (-) n (%)*	Mikroplak (+) n (%)*	Mikroplak (++) n (%)*	Mikroplak (+++) n (%)*	Toplam n (%)*
<i>S. epidermidis</i>	KRA	+	-	6 (2.85)	13 (6.19)	11 (5.24)	30 (14.29)
		-	17 (8.10)	15 (7.14)	8 (3.80)	4 (1.90)	44 (20.95)
<i>S. haemolyticus</i>	KRA	+	1 (0.47)	2 (0.95)	9 (4.28)	2 (0.95)	14 (6.67)
		-	24 (11.43)	12 (5.71)	4 (1.90)	4 (1.90)	44 (20.95)
<i>S. hominis</i>	KRA	+	-	1 (0.47)	12 (5.71)	7 (3.33)	20 (9.52)
		-	16 (7.61)	6 (2.85)	7 (3.33)	3 (1.43)	32 (15.24)
<i>S. capitis</i>	KRA	+	-	-	1 (0.47)	2 (0.95)	3 (1.43)
		-	6 (2.85)	3 (1.42)	1 (0.47)	-	10 (4.76)
<i>S. warnerii</i>	KRA	+	-	-	-	-	-
		-	8 (3.80)	-	-	-	8 (3.80)
<i>S. lugdunensis</i>	KRA	+	-	-	-	-	-
		-	1 (0.47)	1 (0.47)	-	-	2 (0.95)
<i>S. saprophyticus</i>	KRA	+	-	1 (0.47)	-	-	1 (0.47)
		-	1 (0.47)	-	-	-	1 (0.47)
<i>S. sciuri</i>	KRA	+	-	-	-	-	1 (0.47)
		-	-	1 (0.47)	-	-	-
Toplam			74 (35.23)	48 (22.86)	55 (26.19)	33 (15.71)	210 (100)

*Toplam suş sayısı (210) üzerinden hesaplanmıştır

4.5.3. Biyofilm Genlerinin Saptanması ve Değerlendirilmesi

Çalışmadaki tüm suşlarda (n:210) *icaA*, *icaD* ve IS256 genleri araştırılmıştır. *icaA*, *icaD* ve IS256 gen pozitiflikleri saptanan suş sayıları sırasıyla; 47 (%22.38), 75 (%35.71) ve 100 (%47.62) olarak bulunmuştur.

İkili gen grupları incelendiğinde KİKDE etkenlerinde bütün ikili grupların (*icaA* + *icaD*, *icaA* + IS256, *icaD* + IS256) ve üç genin bir arada pozitif (*icaA* + *icaD* + IS256) bulunma oranının anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0,05$). Periferik kanda ve ellerden alınan örneklerde *icaA* + *icaD* genlerinin birlikte negatif bulunma oranı sırasıyla %60 ve %70.8 olarak saptanmıştır ve istatistiksel olarak anlamlı oranda düşüktür ($p<0.05$).

KRA'da slime faktörü oluşumu ile biyofilm oluşturan genlerin varlığı arasındaki ilişkiye bakıldığında; burunda ve periferik kanda *icaA* geni taşıyan suşlarda KRA'da slime faktörü oluşumunun da saptanma oranının daha yüksek olduğunu görülmüştür ($p<0.05$). *icaD* geninin ellerde, burunda, KİKDE etkenlerinde ve periferik kanda pozitif saptanması halinde KRA'da da slime faktörü pozitifliğinde artma olmaktadır ($p<0.05$). IS256 pozitifliği için ise sadece el örneklerinde aynı ilişki söz konusudur ($p<0.05$).

Çalışmada suşlarda araştırılan biyofilm oluşumuna katkıda bulunan genlerden *icaA*, *icaD* ve IS256 genlerinin varlığı ile mikropalak yönteminde saptanan biyofilm oluşumu istatistiksel olarak karşılaştırıldığında;

1.*icaA* geni pozitif olduğunda mikropalakta da biyofilm oluşumu pozitif olarak saptanmıştır ($p<0.001$).

2.*icaD* geni pozitif olan suşlarda mikropalakta da biyofilm oluşumu pozitif olarak saptanmıştır ($p<0.001$).

3. IS256 geni pozitif olan suşlarda mikropalakta biyofilm oluşumu pozitif olarak saptanmıştır ($p<0.05$).

4. İkili gruplar halinde incelendiğinde eğer iki gen de negatifse (*icaA* + *icaD*), (*icaA* + IS256), (*icaD* + IS256) mikropalakta da biyofilm oluşumunun gözlenmediği ortaya çıkmıştır ($p<0.001$).

Suşların her üç geni de taşıması halinde mikroplakta biyofilm oluşturmama durumunun izlenmediği görülmüştür ($p<0.001$).

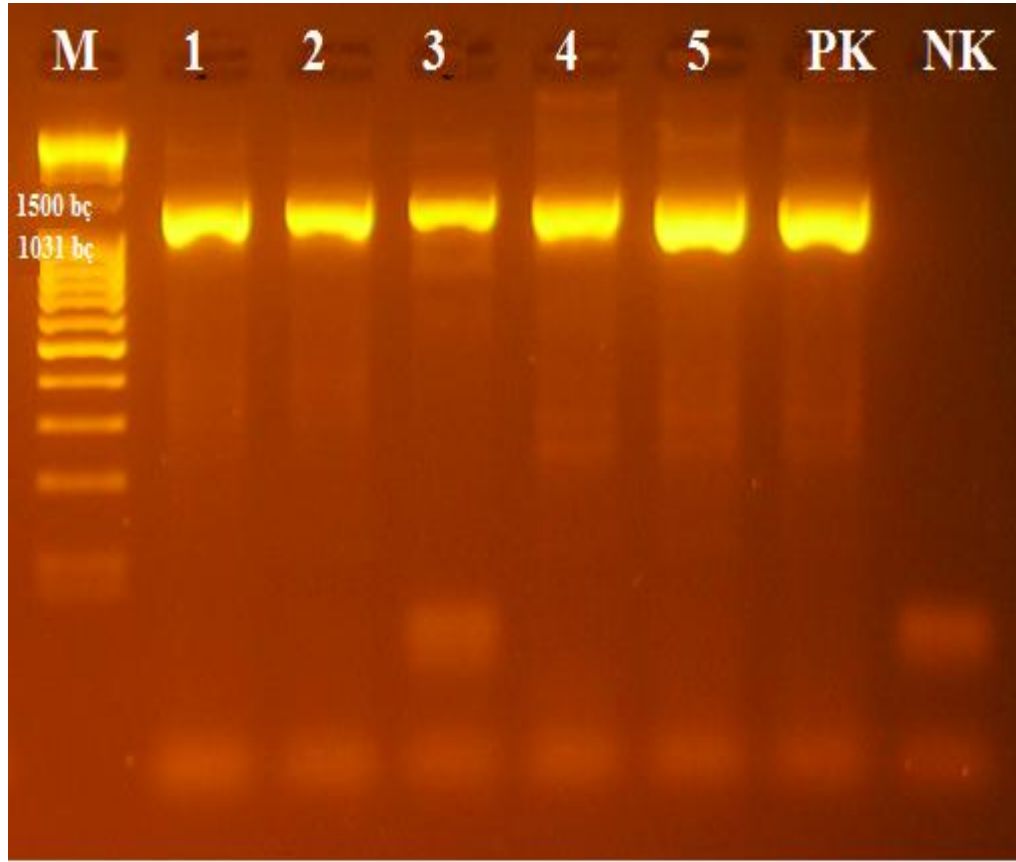
Çalışmamızda toplam 12 adet suşta (10 periferik kan kültürü, 2 burunlardan alınan örneklerden izole edilen suşlar) mikroplakta biyofilm oluşumu gösterilmesine rağmen PZR yöntemi ile araştırılan genler saptanamamıştır. Bu suşların 7'si *S. epidermidis*, 3'ü *S. hominis*, 1'i *S. haemolyticus* ve 1'i *S. capitis*'tir.

KRA ile elde edilen sonuçlarla, biyofilm genlerin birlikteliği araştırıldığında; üç genden (*icaA*, *icaD* ve IS256) herhangi birinin pozitif olarak tespit edilmesi halinde KRA'da da slime faktörü oluşumu tespit edildiği görülmüştür ($p<0.005$).

Tablo 4.20'de mikroplakta biyofilm oluşturmayan toplam 74 suşun taşıdığı genlerin durumu, suşların invaziv olan /olmayan suşlar olmalarına göre ayrılarak sunulmuştur.

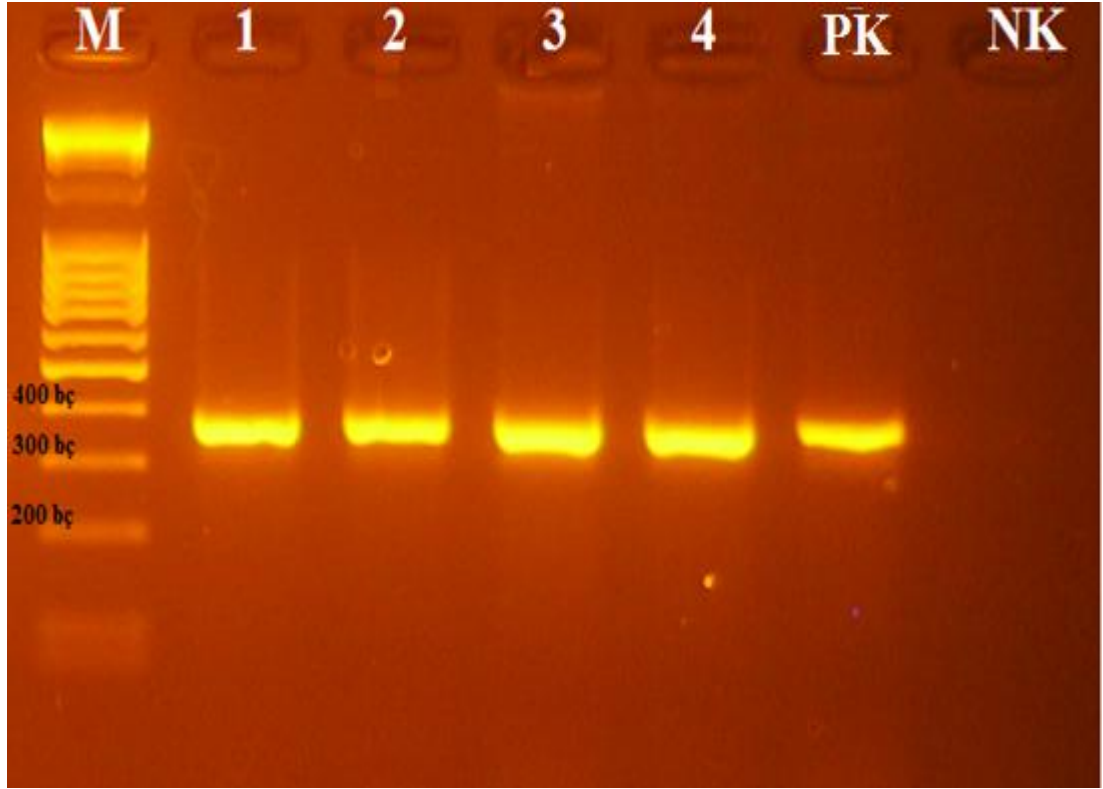
Tablo 4. 20. Mikroplakta biyofilm oluşturmayan suşların taşıdığı biyofilm genlerinin analizi

				<i>icaA</i> n (%)			<i>icaD</i> n (%)		IS256 n (%)	
					+	-	+	-	+	-
İnvaziv örnekler	KİKDE	Kan	KRA	+	5 (2.38)	4 (1.90)	7 (3.33)	2 (0.95)	9 (4.29)	-
				-	2 (0.95)	4 (1,90)	2 (0.95)	4 (1.90)	5 (2.38)	1 (0.48)
		Kateter	KRA	+	5 (2.38)	4 (1,90)	7 (3,33)	2 (0.95)	9 (4.29)	-
				-	2 (0.95)	4 (1,90)	2 (0.95)	4 (1,90)	5 (2.38)	1 (0.48)
	Periferik Kan	KRA	+	4 (1,90)	19 (9.05)	11 (5.24)	12 (5.71)	11 (5.24)	12 (5.71)	
			-	1 (0.48)	65 (30.95)	13 (6.19)	53 (25.24)	19 (9.05)	47 (22.38)	
İnvaziv olmayan örnekler	El	KRA	+	1 (0.48)	6 (2.86)	6 (2.86)	1 (0.48)	4 (1,90)	3 (1.43)	
			-	2 (0.95)	21 (10)	6 (2.86)	17 (8.10)	3 (1.43)	20 (9.52)	
	Burun	KRA	+	12 (5.71)	-	5 (2.38)	7 (3,33)	2 (0.95)	10 (4.76)	
			-	3 (1.43)	11 (5.24)	-	14 (6.67)	2 (0.95)	12 (5.71)	
	Kateter Kolonizasyonu	KRA	+	3 (1.43)	5 (2.38)	6 (2.86)	2 (0.95)	8 (3.81)	-	
			-	7 (3.33)	20 (9.52)	10 (4.76)	17 (8.10)	23 (10.95)	4 (1.90)	
Toplam					47 (22.38)	163 (77.62)	75 (35.71)	135 (64.29)	100 (47.62)	110 (52.38)



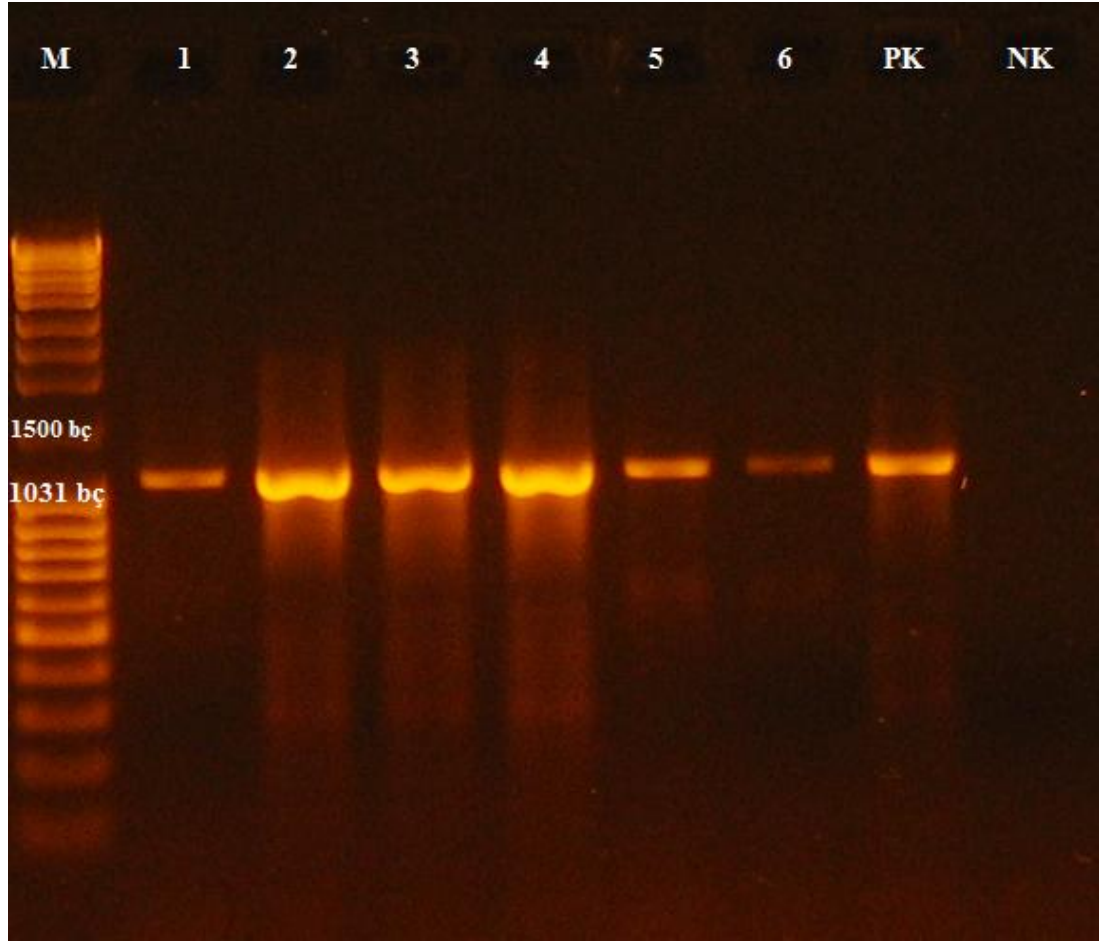
Şekil 4. 24. *icaA* lokusuna ait PZR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüleri

1, 2, 3, 4 ve 5 no'lu hatlar *icaA* pozitif (1315 bç) olarak belirlenmiştir [PK: pozitif kontrol- *S. epidermidis* ATCC 35984, NK: negatif kontrol- *S. aureus* ATCC 29213, M: Moleküler ağırlık belirteci: Mass ruler DNA ladder mix, ready-to-use, 80-10000 bç (Thermo, Almanya)]



Şekil 4. 25. *icaD* lokusuna ait PZR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

1, 2, 3 ve 4 numaralı suşlar *icaD* pozitif (381 bç) olarak belirlenmiştir (PK: pozitif kontrol- *S. epidermidis* ATCC 35984, NK: negatif kontrol- *S. aureus* ATCC 29213, M: Moleküler ağırlık belirteci: Mass ruler DNA ladder mix, ready-to-use, 80-10000 bç (Thermo, Almanya))



Şekil 4. 26. IS256'ya ait PZR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jel elektroforezi

1, 2, 3, 4, 5 ve 6 no'lu hatlar IS256 pozitif (1102bç) olarak belirlenmiştir (PK: pozitif kontrol- *S. epidermidis* ATCC 35984, NK: negatif kontrol- *S. aureus* ATCC 29213, M: Moleküler ağırlık belirteci: Mass ruler DNA ladder mix, ready-to-use, 80-10000 bç (Thermo, Almanya))

Tablo 4.21'de KNS suşlarının türlere göre taşıdıkları biyofilm genleri, mikropalakta zayıf, orta ya da kuvvetli biyofilm oluşturma derecelerine göre ilişkilendirilerek verilmiştir.

Tablo 4. 21. KNS türlerinin; mikropalakta, biyofilm oluşturmayan ve zayıf, orta ya da kuvvetli biyofilm oluşturma derecelerine göre taşıdıkları biyofilm genlerinin dağılımı

Mikroplak (-) biyofilm ile genlerin ilişkisi (n=74)														
	<i>icaA</i> n %		<i>icaD</i> n %		IS256 n %		<i>icaA</i> ve <i>icaD</i> n %		<i>icaA</i> ve IS256 n %		<i>icaD</i> ve IS256 n %		<i>icaA</i> , <i>icaD</i> ve IS256 n %	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>S. epidermidis</i> n=17	-	17 8.10	1 0.48	16 7.62	1 0.48	16 7.62	-	16 7.62	-	16 7.62	-	15 7.14	-	15 7.14
<i>S. haemolyticus</i> n=25	-	25 11.90	1 0.48	24 11.43	9 4.29	16 7.62	-	24 11.43	-	16 7.62	1 0.48	16 7.62	-	16 7.62
<i>S. hominis</i> n=16	1 0.48	15 7.14	-	16 7.62	2 0.95	14 6.67	-	15 7.14	-	13 6.19	-	14 6.67	-	13 6.19
<i>S. capitis</i> n=16	1 0.48	5 2.38	-	6 2.86	-	6 2.86	-	5 2.38	-	5 2.38	-	6 2.86	-	5 2.38
<i>S. warnerii</i> n=8	-	8 3.81	-	8 3.81	-	8 3.81	-	8 3.81	-	8 3.81	-	8 3.81	-	8 3.81
<i>S. lugdunensis</i> n=1	-	1 0.48	-	1 0.48	-	1 0.48	-	1 0.48	-	1 0.48	-	1 0.48	-	1 0.48
<i>S. saprophyticus</i> n=1	-	1 0.48	-	1 0.48	-	1 0.48	-	1 0.48	-	1 0.48	-	1 0.48	-	1 0.48
<i>S. sciuri</i> n=0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toplam	2 0.95	72 34.29	2 0.95	72 34.29	12 5.71	62 29.52	-	70 33.33	-	60 28.57	1 0.48	61 29.04	-	59 28.10
Mikroplak (+) biyofilm ile genlerin ilişkisi (n=48)														
	<i>icaA</i> n %		<i>icaD</i> n %		IS256 n %		<i>icaA</i> ve <i>icaD</i> n %		<i>icaA</i> ve IS256 n %		<i>icaD</i> ve IS256 n %		<i>icaA</i> , <i>icaD</i> ve IS256 n %	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>S. epidermidis</i> n=21	5 2.38	16 7.62	11 5.24	10 4.76	7 3.33	14 6.67	3 1.43	8 3.81	3 1.43	12 5.71	2 0.95	5 2.38	2 0.95	4 1.90
<i>S. haemolyticus</i> n=14	1 0.48	13 6.19	5 2.38	9 4.29	14 6.67	-	1 0.48	9 4.29	-	3 1.43	1 0.48	-	-	-
<i>S. hominis</i> n=7	1 0.48	6 2.86	5 2.38	2 0.95	6 2.86	1 0.48	-	2 0.95	-	3 1.43	3 1.43	1 0.48	-	1 0.48
<i>S. capitis</i> n=3	-	3 1.43	-	3 1.43	3 1.43	-	-	3 1.43	-	-	-	3 1.43	-	-
<i>S. warnerii</i> n=0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. lugdunensis</i> n=1	1 0.48	-	1 0.48	-	-	1 0.48	1 0.48	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. saprophyticus</i> n=1	1 0.48	-	-	1 0.48	-	1 0.48	-	-	-	-	-	1 0.48	-	-
<i>S. sciuri</i> n=1	-	1 0.48	1 0.48	-	1 0.48	-	-	-	-	-	1 0.48	-	-	-
Toplam	9 4.29	39 18.57	23 10.95	25 11.90	31 14.76	17 8.10	5 2.38	22 10.48	3 1.43	18 8.57	7 3.33	9 4.29	2 0.95	5 2.38
Mikroplak (++)biyofilm ile genlerin ilişkisi (n=55)														
	<i>icaA</i> n %		<i>icaD</i> n %		IS256 n %		<i>icaA</i> ve <i>icaD</i> n %		<i>icaA</i> ve IS256 n %		<i>icaD</i> ve IS256 n %		<i>icaA</i> , <i>icaD</i> ve IS256 n %	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>S. epidermidis</i> n=21	7 3.33	14 6.67	12 5.71	9 4.29	11 5.24	10 4.76	6 2.86	8 3.81	2 0.95	5 2.38	5 2.38	3 1.43	-	2 0.95
<i>S. haemolyticus</i> n=13	5 2.38	8 3.81	7 3.33	6 2.86	11 5.24	2 0.95	2 0.95	3 1.43	5 2.38	2 0.95	6 2.86	1 0.48	2 0.95	1 0.48
<i>S. hominis</i> (n=19)	4 1.90	15 7.14	10 4.76	9 4.29	15 7.14	4 1.90	3 1.43	8 3.81	2 0.95	2 0.95	8 3.81	2 0.95	2 0.95	1 0.48
<i>S. capitis</i> n=2	-	2 0.95	-	2 0.95	1 0.48	1 0.48	-	2 0.95	-	1 0.48	-	1 0.48	-	1 0.48
<i>S. warnerii</i> n=0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. lugdunensis</i> n=0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. saprophyticus</i> n=0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. sciuri</i> n=0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toplam	16 7.62	39 18.57	29 13.81	26 12.38	38 18.10	17 8.10	11 5.24	21 10	9 4.29	10 4.76	19 9.5	7 3.33	4 1.90	5 2.38

Mikroplak (+++)biyofilm ile genlerin ilişkisi (n=33)														
	icaA n %		icaD n %		IS256 n %		icaA ve icaD n %		icaA ve IS256 n %		icaD ve IS256 n %		icaA, icaD ve IS256 n %	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>S. epidermidis</i> n=15	11 5.24	4 1.90	10 4.76	5 2.38	13 6.19	5 2.38	8 3.81	2 0.95	11 5.24	2 0.95	9 4.29	1 0.48	1 0.48	1 0.48
<i>S. haemolyticus</i> n=6	1 0.48	5 2.38	6 2.86	-	6 2.86	-	1 0.48	-	1 0.48	-	6 2.86	-	5 2.38	-
<i>S. hominis</i> n=10	6 2.86	4 1.90	6 2.86	4 1.90	3 1.43	7 3.33	3 1.43	1 0.48	1 0.48	1 0.48	3 1.43	4 1.90	1 0.48	1 0.48
<i>S. capitis</i> n=2	2 0.95	-	1 0.48	1 0.48	1 0.48	1 0.48	1 0.48	1 0.48	1 0.48	-	1 0.48	1 0.48	-	-
<i>S. warnerii</i> n=0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. lugdunensis</i> n=0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. saprophyticus</i> n=0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. sciuri</i> n=0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toplam	20 95.24	13 6.19	23 10.95	10 4.76	23 10.95	13 6.19	13 6.19	4 1.90	14 6.67	3 1.43	19 9.05	6 2.86	7 3.33	2 0.95

4.6. Minimum Biyofilm Eradike Edici Konsantrasyon Değerleri

Mikroplak yöntemiyle biyofilm oluşturduğu gösterilen (zayıf, orta ya da kuvvetli düzeyde) *S. epidermidis* (n:57), *S. hominis* (n:36), *S. haemolyticus* (n:33), *S. capitis* (n:7), *S. lugdunensis* (n:1), *S. saprophyticus* (n:1), ve *S. sciuri* (n:1) olmak üzere toplam 136 suş tespit edilmiştir. MBK değerlerinin hesaplanması için test edilmişlerdir. Bu amaçla 96 kuyucuklu düz tabanlı mikroplaklarda önce biyofilm oluşturmaları sağlanmış, daha sonra vankomisin farklı konsantrasyonlarıyla karşılaştırılmış ve hangi vankomisin dozunun biyofilmi yok ettiğini saptamak amacıyla plaklar spektrofotometrede 24. saat sonunda 570 nm’de okutulmuştur. Pozitif kontrol olarak biyofilm oluşturduğu bilinen *S. aureus* ATCC 25923 ve *S. epidermidis* ATCC 35984, negatif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 29213, sterilite kontrolü için sadece besiyeri içeren, mikroorganizma ilave edilmemiş kuyucuklar kullanılmıştır. Cut off değerinin belirlenmesinde sadece besiyeri içeren ve negatif kontrol için kullanılan kuyucukların optik dansitometrelerinin ortalaması alınmış ve üç standart derivasyonu hesaplanarak OD_C değeri belirlenmiştir. Her sırada OD_C değeri 0.45’in altında değer veren ilk kuyucuktaki ilaç konsantrasyonu MBK olarak belirlenmiştir.

Çalışmada MBK değerleri; 136 biyofilm oluşturan KNS’nin 4’ü (%2.94) için 1µg/ml, 35’i (%25.74) için 2µg/ml, 43’ü (%31.62) için 4µg/ml, 22’si (%16.18) için 8

$\mu\text{g/ml}$, 5'i (%3.68) için 16 $\mu\text{g/ml}$, 11'i (%8.09) için 32 $\mu\text{g/ml}$, 9'u (%6.62) için 64 $\mu\text{g/ml}$ ve 5'i (%3.68) için 256 $\mu\text{g/ml}$ olarak saptanmıştır. Vankomisin için MBEK değerleri Tablo 4.21'de görülmektedir. Türler arasında *S. warnerii*'nin diğer suşlara göre MBEK değeri anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($p<0.001$).

İnvaziv olan ve olmayan örneklerden izole edilen KNS suşlarında MBEK değerleri açısından anlamlı farklılık saptanamamıştır ($p=0.243$). Suşların izole edildikleri bölgelere göre MBEK değerleri ortanca değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.22). Buna göre MBEK değerleri karşılaştırıldığında, ellerden izole edilen KNS suşlarının MBEK değerleri diğer suşlara göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.001$).

Tablo 4. 22. Biyofilm oluşturan suşların vankomisin için MBEK değerleri

	1 $\mu\text{g/ml}$ n (%)	2 $\mu\text{g/ml}$ n (%)	4 $\mu\text{g/ml}$ n (%)	8 $\mu\text{g/ml}$ n (%)	16 $\mu\text{g/ml}$ n (%)	32 $\mu\text{g/ml}$ n (%)	64 $\mu\text{g/ml}$ n (%)	128 $\mu\text{g/ml}$ n (%)	256 $\mu\text{g/ml}$ n (%)	Toplam n (%)
<i>S. epidermidis</i>	3 (2.20)	17 (12.5)	16 (11.76)	9 (6.62)	3 (2.20)	5 (3.68)	4 (2.94)	-	-	33 (24.26)
<i>S. haemolyticus</i>	-	7 (5.15)	14 (10.29)	5 (3.68)	1 (0.74)	1 (0.74)	5 (3.68)	-	-	36 (26.47)
<i>S. hominis</i>	-	5 (3.68)	12 (8.82)	7 (5.15)	1 (0.74)	5 (3.68)	2 (1.47)	-	4 (2.94)	57 (41.91)
<i>S. capitis</i>	-	4 (2.94)	1 (0.74)	1 (0.74)	-	-	-	-	1 (0.74)	7 (5.15)
<i>S. lugdunensis</i>	-	1 (0.74)	-	-	-	-	-	-	-	1 (0.74)
<i>S. saprophyticus</i>	1 (0.74)	-	-	-	-	-	-	-	-	1 (0.74)
<i>S. sciuri</i>	-	1 (0.74)	-	-	-	-	-	-	-	1 (0.74)
Toplam	4 (2.94)	35 (25.74)	43 (31.62)	22 (16.18)	5 (3.68)	11 (8.09)	9 (6.62)	-	5 (3.68)	136 (100)

Tablo 4. 23. KNS suşlarının izole edildikleri bölgelere göre MBEK değerleri

Örnek	Ortanca ($\mu\text{g/ml}$)	Minimum ($\mu\text{g/ml}$)	Maksimum ($\mu\text{g/ml}$)
El	2	0.50	64
Burun	4	2	256
Kateter kolonizanı	4	2	64
KİKDE*	6	2	32
Periferik kan kültürü	4	1	64
Toplam	4	0.50	256

* Kateter ilişkili kan dolaşım enfeksiyonu

Tüm suşlar ele alındığında; vankomisin için MBEK ortanca değerinin 4 µg/ml (1–128) olduğu saptanmıştır.

Suşların biyofilm oluşturduktan sonra vankomisin ile muamele edildiğindeki MBEK değerleri ile planktonik formdaki MİK değerlerini karşılaştırmak amacıyla MBEK/MİK oranlarını hesaplanmıştır (Tablo 4.24). Buna göre zayıf biyofilm oluşturan suşlarda MBEK / MİK oranı düşüken, suşların biyofilm oluşturma gücü arttıkça bu oranın yükselmesi istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$).

Ayrıca mikropalak yönteminde biyofilm oluşturduğu gösterilen KNS'lerin MBEK/MİK oranlarının ortanca değeri 4 (1–128), negatif bulunan KNS'lerin MBEK/MİK oranlarının ortanca değeri 1 (1–4) olarak saptanmıştır.

Tablo 4. 24. KNS türlerinin MBEK/MİK ortanca değerleri

Tür	Ortanca	Minimum	Maksimum
<i>S. epidermidis</i>	4	1	128
<i>S. haemolyticus</i>	4	1	32
<i>S. hominis</i>	4	1	128
<i>S. capitis</i>	3	1	64
<i>S. warnerii</i>	1	1	1
Diğer KNS	1.5	1	2

S. epidermidis, *S. haemolyticus* ve *S. hominis* suşlarında MBEK/MİK oranlarının diğer KNS'lere göre daha yüksek olarak saptanması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

KNS suşları invaziv olan veya olmayan örneklerden izole edilmelerine göre gruplandırılarak incelendiğinde, MBEK/MİK değerlerinde anlamlı farklılık saptanamamıştır ($p = 0.795$).

Suşların izole edildikleri bölgelere göre MBEK/MİK ortanca değerleri hesaplanmıştır (Tablo 4.25). Buna göre ellerden ve periferik kandan izole edilen KNS'lerde MBEK/MİK değerlerinin diğerlerine göre daha düşük olması, KİKDE

etkenlerinin MBEK/MİK değerlerinin diğerlerine göre yüksek olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Tablo 4. 25. KNS suşlarının izole edildikleri bölgelere göre MBEK/MİK ortalama değerleri

Örnek	Ortanca	Minimum	Maksimum
El	2	1	64
Burun	4	1	128
Kateter	4	1	64
KİKDE*	4	2	128
Periferik Kan Kültürü	2	1	32
Toplam	4	1	128

* Kateter ilişkili kan dolaşım enfeksiyonu

Tablo 4.26 ve Şekil 4.27’de mikropalak yönteminde biyofilm oluşturan KNS suşlarının vankomisin için MBEK / MİK oranları verilmektedir.

Tablo 4. 26. Biyofilm oluşturan suşların vankomisin için MBEK/MİK oranları

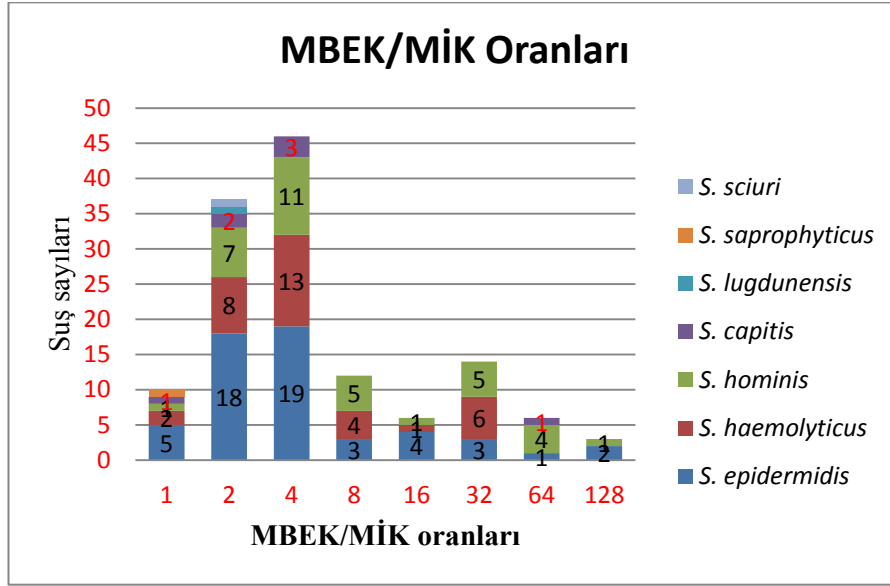
	MBEK/MİK oranları*								
	1 n(%)	2 n(%)	4 n(%)	8 n(%)	16 n(%)	32 n(%)	64 n(%)	128 n(%)	Toplam n(%)
<i>S. epidermidis</i>	5 (3.68)	18 (13.24)	19 (13.97)	5 (3.68)	4 (2.94)	3 (2.20)	1 (0.74)	2 (1.47)	57 (41.91)
<i>S. haemolyticus</i>	2 (1.47)	8 (5.88)	13 (9.56)	3 (2.20)	1 (0.74)	6 (4.41)	-	-	33 (24.26)
<i>S. hominis</i>	1 (0.74)	7 (5.15)	11 (8.09)	6 (4.41)	1 (0.74)	5 (3.68)	4 (2.94)	1 (0.74)	36 (26.47)
<i>S. capitis</i>	1 (0.74)	2(1.47)	3 (2.20)	-	-	-	1 (0.74)	-	7 (5.15)
<i>S. lugdunensis</i>	-	1(0.74)	-	-	-	-	-	-	1 (0.74)
<i>S.saprophyticus</i>	1 (0.74)	-	-	-	-	-	-	-	1 (0.74)
<i>S. sciuri</i>	-	1 (0.74)	-	-	-	-	-	-	1 (0.74)
Toplam	10 (7.35)	37 (27.21)	46 (33.82)	14 (10.29)	4 (2.94)	14 (10.29)	6 (4.41)	3 (2.20)	136 (100)

*Yüzde değerleri mikropalak yönteminde biyofilm oluşturan suş sayısı üzerinden (n:136) üzerinden hesap edilmiştir.

KDE etkeni olan KNS’lerin MBEK/MİK değerleri kontaminasyon olarak kabul edilen KNS’lerin MBEK/MİK değerleri ile karşılaştırılmıştır; KDE etkeni olan KNS’lerin MBEK/MİK değerleri anlamlı oranda yüksek bulunmuştur (Tablo 4.27).

Tablo 4. 27. Periferik kan kültürlerinden izole edilen KNS'lerin vankomisin için MBEK/MİK değerleri

	Örnek	Ortanca	Minimum	Maksimum	
Periferik kan kültüründen izole edilen KNS	Kontaminasyon	1	1	32	p=0.016
	KDE etkeni	2	1	32	



Şekil 4. 27. Biyofilm oluşturan suşların vankomisin için MBEK/MİK oranları

4.7. Değişken Alanlı Jel Elektrofrez (Pulsed Field Gel Electrophoresis-PFGE) Sonuçları

KİKDE etkeni 15 adet suş izole edilmiştir; bunların 7'si *S. epidermidis*, 5'i *S. haemolyticus*, 3'ü *S. hominis* olarak tiplendirilmiştir. Kanlarından bu etkenlerin izole edildiği hastaların SVK örneklerinden de aynı tür bakteriler tanımlanmıştır. KİKDE etkeni olan suşlara, SVK'lardan izole edilen suşlar ile olan yakınlıklarını ortaya koymak amacıyla PFGE uygulanmıştır. Dört kez tekrarlanmasına rağmen kesim enzimi ile uygun sonuç vermeyen kandan izole edilen bir *S. epidermidis* suşu değerlendirme dışı bırakılmış; bunun dışında, PFGE'de aynı hastaların SVK örnekleri ve kanlarından KİKDE etkeni olarak izole edilen suşların %100 benzer profil oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte iki farklı hastadan (6 ve 36 no'lu hastalar) izole edilen *S. epidermidis* suşları arasında %85 oranında yakınlık

tespit edilmiştir (Şekil 4.28). Tablo 4.28’de KİKDE etkeni olan suşların özellikleri verilmiştir. Şekil 4.28, 4.29 ve 4.30’da sırasıyla *S.epidermidis*, *S. haemolyticus* ve *S. hominis* suşlarına ait PFGE dendogramları görülmektedir.

Tablo 4. 28. KİKDE etkeni olan suşların özellikleri

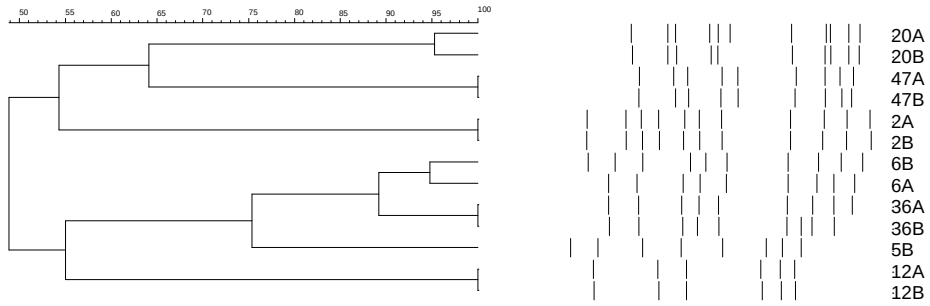
Suş no*	Tür	mecA	SCCmec	KRA	Mikroplakta biyofilm oluşumu	icaA	icaD	IS256	MİK	MBEK
20A	<i>S.epidermidis</i>	+	I	-	+++	+	-	+	2	8
20B	<i>S.epidermidis</i>	+	I	-	+++	+	-	+	2	8
47A	<i>S.epidermidis</i>	+	II	-	++	+	+	-	2	8
47B	<i>S.epidermidis</i>	+	II	-	++	+	+	-	2	8
2A	<i>S.epidermidis</i>	+	II	+	+++	+	+	+	0.25	32
2B	<i>S.epidermidis</i>	+	II	+	+++	+	+	+	0.25	32
6A	<i>S.epidermidis</i>	-	-	+	++	-	-	+	1	4
6B	<i>S.epidermidis</i>	-	-	+	++	-	-	+	1	4
36A	<i>S.epidermidis</i>	-	-	+	+	+	+	+	2	4
36B	<i>S.epidermidis</i>	-	-	+	+	+	+	+	2	4
5A	<i>S.epidermidis</i>	+	I	+	++	-	+	+	1	2
5B	<i>S.epidermidis</i>	+	I	+	++	-	+	+	1	2
12A	<i>S.epidermidis</i>	+	V	+	+++	+	+	+	1	8
12B	<i>S.epidermidis</i>	+	V	+	+++	+	+	+	1	8
3A	<i>S. haemolyticus</i>	+	V	-	+	-	-	+	1	4
3B	<i>S. haemolyticus</i>	+	V	-	+	-	-	+	1	4
48A	<i>S. haemolyticus</i>	+	II+V	-	+	-	-	+	1	4
48B	<i>S. haemolyticus</i>	+	II+V	-	+	-	-	+	1	4
4A	<i>S. haemolyticus</i>	+	V	-	+++	-	+	+	1	4
4B	<i>S. haemolyticus</i>	+	V	-	+++	-	+	+	1	4
50A	<i>S. haemolyticus</i>	+	V	-	-	-	-	+	0.5	-
50B	<i>S. haemolyticus</i>	+	V	-	-	-	-	+	0.5	-
7A	<i>S. haemolyticus</i>	+	V	+	++	+	+	+	1	4
7B	<i>S. haemolyticus</i>	+	V	+	++	+	+	+	1	4
43A	<i>S. hominis</i>	+	III+VI	+	++	-	+	+	1	32
43B	<i>S. hominis</i>	+	VI	+	++	-	+	+	1	32
14A	<i>S. hominis</i>	-	-	+	++	+	+	+	2	8
14B	<i>S. hominis</i>	-	-	+	++	+	+	+	2	8
49A	<i>S. hominis</i>	+	I	+	++	-	-	+	1	32
49B	<i>S. hominis</i>	+	I	+	++	-	-	+	1	32

*A: Kan izolatu; B: SVK izolatu (aynı numaralı suşlar, aynı hastadan izole edilmiştir)

KİKDE etkenleri *mecA* pozitiflikleri açısından değerlendirildiğinde 12’sinin (%80) pozitif, 3’ünün (%20) negatif olduğu görülmüştür. Aynı hastaların SVK ve kan izolatlarının SCCmec tiplerinin 2 suş dışında aynı olduğu görülmüştür. Farklı SCCmec tipi gösteren, KİKDE etkeni olan ve SVK’dan izole edilen *S.hominis* türündeki KNS suşunun aynı hastanın kateterinden izole edilen ve kaynak kabul edilen izolatuyla PFGE sonucu %100 benzerlik gösterdiği ortaya konulmuştur. *S.haemolyticus* türündeki bir KİKDE etkeni ve aynı hastanın SVK’sından izole edilen aynı tür suş hariç tüm KİKDE etkenleri ve kaynak kabul edilen kateter

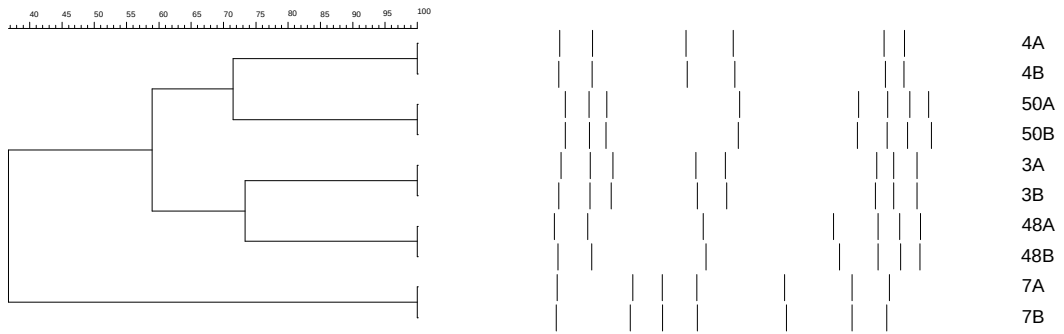
izolatlarının mikroplakta biyofilm oluşturduğu gösterilmiştir. Sadece bir hastadan izole edilen kan-kateter ikili izolatu (*S.epidermidis*) hariç tüm suşların IS256 genini taşıdık ; bu geni taşımayan suşlarında *icaA* ve *icaD* genlerini taşıdıkları ortaya konulmuştur. Suşların M K/MBEK oranlarına bakıldık nda en az 2 kat, en çok 128 kat artış olduğu gözlenmiştir. M K/MBEK oranında 128 katlık artış izlenen suşların bakılan her    biyofilm genini de taşıdık  ve mikroplakta kuvvetli biyofilm oluşturduğu, aynı zamanda KRA'da slime faktörü meydana getirdik  g r lm ştir.

K KDE Etkenleri: *Staphylococcus epidermidis* suşları



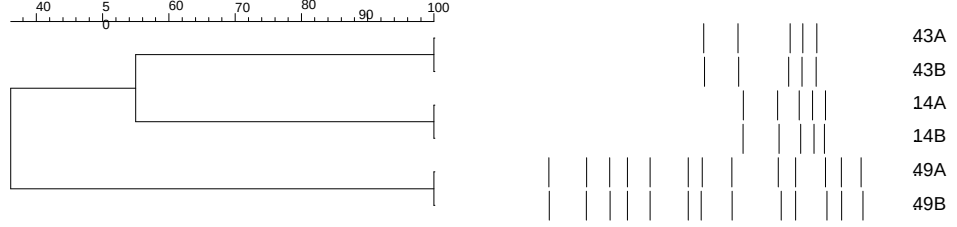
şekil 4. 28. *S.epidermidis* suşlarının PFGE dendogramları

K KDE Etkenleri: *Staphylococcus haemolyticus*



şekil 4. 29. *S.haemolyticus* suşlarının PFGE dendogramları

KİKDE Etkenleri: *Staphylococcus hominis* suşları



Şekil 4. 30. *S.hominis* suşlarının PFGE dendogramları

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda 30'u sağlıklı hastane çalışanı olmayan bireylerin ellerinden, 26'sı sağlıklı hastane çalışanı gönüllülerin burunlarından, 35'i kateter kolonizasyonu etkeni, 15'i KİKDE etkeni (15 santral venöz kateterden + 15 bu hastaların periferik kan kültürlerinden izole), 89 kateter takılı olmayan hastaların periferik kan kültürlerinden izole edilen toplam 210 KNS suşu kullanılmıştır. Toplam 210 suşun 74'ü (%35.23) *S. epidermidis*, 58'i (%27.61) *S. haemolyticus*, 52'si (%24.76) *S. hominis*, 13'ü (%6.19) *S. capitis*, 8'i (%3.8) *S. warnerii*, 2'si (%0.95) *S. lugdunensis*, 2'si (%0.95) *S. saprophyticus*, 1'i (%0.47) *S. sciuri* olarak tiplendirilmiştir (Tablo 4.1).

Hastanede yatan hastalarda kateter ilişkili enfeksiyonlar ve komplikasyonları çok sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Kateter ilişkili enfeksiyonlara en sık sebep olan mikroorganizma KNS'lerdir. KNS'lerin çeşitli virulans özelliklerinin yanında biyofilm oluşturma özellikleri de bu enfeksiyonları oluşturmaları açısından çok önemlidir (Francois ve ark., 1996).

Kateterin dış kısmındaki mikroorganizmaların tespiti için semikantitatif, iç yüzeyindeki mikroorganizmaların tespiti için ise tam kantitatif kültür yöntemi tercih edilmektedir. Kateter ucu kültür örneklerinin değerlendirilmesinde kullanılan yöntemlerin incelendiği bir çalışmada semikantitatif ve tam kantitatif yöntemlerin duyarlılıkları %72.7 ve %59.3; özgüllükleri %95.7 ve %94.4 olarak saptanmıştır. Çalışmanın sonucunda da semikantitatif kültür yönteminin yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu vurgulanmıştır (Riboli ve ark.,2014). Siegman-Igra ve arkadaşlarının yaptığı bir meta-analizde semikantitatif yöntemin KİKDE için duyarlılık ve özgüllüğü %85 olarak tespit edilmiştir ve kantitatif kültürlerin semikantitatif ve kalitatif kültürlerle göre daha güvenilir olduğu saptanmıştır (Siegman-Igra ve ark., 1997). Çalışmamızda da; duyarlılık ve özgüllük oranlarının artırılması amacıyla; kateter kültür ucu örneklerinin mikrobiyolojik değerlendirilmesinde semikantitatif ve tam kantitatif kültür yöntemlerinin her ikisi birlikte kullanılmıştır.

Penel ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada 14 KİKDE etkeninin yedisinde KNS, dördünde metisilin duyarlı *S. aureus* (MSSA), ikisinde *E. coli* ve birinde *C. albicans* etken olarak izole edilmiştir (Penel ve ark., 2007). Templeton ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise, 34 adet KİKDE saptanmış ve etken olarak en sık KNS (%28), *S. aureus* (%19) ve *Candida* spp. (%17) suşları izole edilmiştir (Templeton ve ark., 2008). Yenidoğanlarda KİKDE enfeksiyonlarının araştırıldığı bir çalışmada; yedi yıllık bir sürede 399 hastadan gelen 584 kateter örneği incelenmiş, 29 KİKDE saptanmıştır. KİKDE etkenlerinin arasında en sık KNS'ler saptanmış olmakla birlikte KNS'ler içinde ilk sıralarda; *S. epidermidis* (%65.5) ve *S. haemolyticus* (%10.3) izole edilmiştir. (Riboli ve ark., 2014). Çalışmamızda KİKDE etkeni olarak en sık *S. epidermidis* (14 adet; yedi tanesi kateterden, yedi tanesi periferik kandan) ve *S. haemolyticus* (10 adet; beş tanesi kateterden, beş tanesi periferik kandan) suşları izole edilmiş ve bu sonuçlar diğer çalışmaların bulgularıyla uyumlu bulunmuştur.

Çalışmamızda periferik kan kültürlerinden izole edilen KNS sayısı 89'dur. Laboratuvara, SVK'sı olmayan hastalara ait ve en az iki adet kan kültür şişesi (en az bir set) olarak gönderilen örnekler kabul edilmiş ve bu örneklerde üreyen KNS'ler "periferik kan kültür" izolatu olarak tanımlanmıştır. Bu KNS'lerin KDE etkeni ya da kontaminant olarak karar verilmesinde; üreyen şişe sayısı ve beraberinde hastanın laboratuvar bulgularından lökositöz, CRP ve prokalsitonin yüksekliği göz önünde bulundurulmuştur. İki veya daha fazla şişede aynı tür KNS üremesi olduğunda, hastanın klinik bulguları ve yukarıda sıralanan laboratuvar verilerinin de eşlik ettiği durumlarda; mikroorganizma KDE etkeni olarak kabul edilmiştir. Çalışmamızdaki periferik kan kültür örneklerinden izole edilen 89 KNS'nin 13 (%17.11) tanesi KDE etkeni, 76 (%85.39) tanesi kontaminasyon olarak belirlenmiştir.

Periferik kan kültürlerinden en sık izole edilenler; *S. epidermidis*; 34 (%38.20) adet, *S. haemolyticus*; 32 (%35.96) adet ve *S. hominis*; 17 (%19.11) suşlarıdır. Kontaminasyonları çıkardığımızda; KDE etkeni olarak 6 (% 6.74) *S. epidermidis*, 6 (% 6.74) *S. haemolyticus* ve 1 (%1.12) *S. hominis* saptanmıştır. Türkiye'den Köksal ve arkadaşları KNS'lerin etken olduğu KDE'leri araştırmışlar ve en sık etken olarak *S. epidermidis* (%43.5), sonra sırayla *S. haemolyticus* (%11.5) ve *S. hominis* (%9.5)

suşlarını bulmuşlardır (Köksal ve ark., 2009). Mert ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da 462 kan kültüründe 313 KNS (261metisilin dirençli KNS -MRKNS) tespit edilmiştir. Çalışmalarında hem bakteriyemi etkenleri hem de kontaminasyon olarak belirledikleri KNS'ler içinde en sık olarak *S. epidermidis*'i izole etmişlerdir (Mert ve ark., 2011). Gattermann ve arkadaşları; kan kültürleri ve kateter enfeksiyonlarından izole ettikleri KNS'ler içinde *S. epidermidis*'i %67.4, *S. haemolyticus*'u %11.9 ve *S. hominis*'i %7.5 sıklığında saptamışlardır (Gattermann ve ark., 2007). Çalışmamıza laboratuvara gelen tek kan kültür şişelerinde üreyen KNS'ler ile SVK'sı olan hastalarda üreyen KNS'leri dahil edilmemiştir. Çalışmamızın sonucunda KDE etkenleri arasında en sık saptanan KNS'ler *S. epidermidis* ve *S. haemolyticus* olarak saptanmış ve bu bulgu yapılan benzer çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olarak bulunmuştur.

Stafilokoklara bağlı KDE'lerde mortalite oranları ortalama %35 (%12-80)'tir (Pittet ve ark., 1997). Periferik kan kültürlerinden stafilokoklar izole edildiğinde; etken/kontaminant kararı vermek her zaman kolay olmamaktadır. KDE'lerde KNS'lerin etken olarak saptanması için birden fazla kan kültür şişesinde KNS'nin üremesi, temel alınan algoritma basamaklarından birisidir. Bir şişede veya birden fazla şişede kan kültüründe KNS pozitifliğinin mortalite üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmaların bazılarında mortalite oranlarının tek kan kültürü şişesinde pozitif olanlarda daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Tak ve arkadaşları tek kan kültür şişesinde KNS üreyen hastalarda mortalite oranını %23, birden fazla şişede KNS üremesi olanlarda ise %14 olarak tespit edilmiştir edilmiştir (Tak ve ark., 2013). Favre ve arkadaşları ise tek kan kültüründe KNS pozitifliği ve birden fazla kan kültür şişesinde KNS saptanması oranlarını sırasıyla %15.3 ve % 7.0 (14 günde) ve % 20.8 ve % 11.3 (28 günde) olarak saptamışlardır (Favre ve ark., 2005). Dolayısıyla tek kan kültür şişesinde KNS üremesi durumunda bile kontaminasyon olarak yorumlanmadan önce sepsis açısından klinik verilerle birlikte değerlendirilmesi, sepsis tanısı, mortalite ve morbidite açısından daha uygun olacaktır.

Çalışmamızda izole edilen KNS'lerin antimikrobiyallere karşı direnç oranlarına bakıldığında *S. haemolyticus*'ta sefoksitin (%91.8), sefazolin (%91.8), amoksisilin-klavulonat (%91.8), siprofloksasin (%84.48), trimetoprim-sülfametoksazol (%84.48), rifampisin (%51.72) ve gentamisine (%81.03) karşı direnç oranlarının diğer türlere göre anlamlı oranda yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). *S. haemolyticus*'un çok fazla antibiyotiğe dirençli olması tedavide yaşanan güçlüğün yanı sıra, bu antibiyotik direnç genlerinin diğer KNS'lere transfer olabilmesi gibi özelliklerden dolayı önem kazanmaktadır (Barrosa ve ark., 2012; Bouchami ve ark., 2012).

Çalışmamızda indüklenebilir klindamisin direnci 41 (%19.52) KNS izolatında saptanmıştır. İndüklenebilir klindamisin direncinin türlere göre dağılımına bakıldığında *S. epidermidis* suşlarının 13'ünde (%17.57), *S. haemolyticus* suşlarının 8'inde (%13.79), *S. hominis* suşlarının 17'sinde (%32.69), *S. capitis* suşlarının 3'ünde (%23.08) tespit edildiği görülmüştür (Tablo 4.6). İstatistiksel olarak türler arasında indüklenebilir klindamisin direnci açısından anlamlı fark saptanmamıştır ($p>0.05$). Stafilokoklarda indüklenebilir klindamisin direnci ile ilgili yapılan çeşitli çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Delialioğlu ve arkadaşlarının çalışmasında indüklenebilir klindamisin direnci oranı %14.7, Gönüllü ve arkadaşlarının çalışmasında ise bu oran %11.4 olarak saptanmıştır (Delialioğlu ve ark., 2005; Gönüllü ve ark., 2009). Fiebelkorn ve arkadaşları ABD'de yaptıkları stafilokoklarla ilgili çalışmalarında indüklenebilir klindamisin direnç oranlarını % 29.8; Schmitz ve arkadaşları Avrupa'da % 7 olarak tespit etmişlerdir (Schmitz ve ark., 2000; Fiebelkorn ve ark., 2003).

mecA geninin heterojen ekspresyonu nedeniyle, metisilin direncinin fenotipik olarak gösterilmesi halen bir sorun oluşturmaktadır. PZR ile *mecA* geninin tespit edilmesi altın standart yöntem olmakla birlikte, çoğu laboratuvarında rutin olarak moleküler yöntemlerin çalışılabileceği olanaklar bulunmadığından, metisiline dirençli suşları hızlı ve doğru olarak saptayabilecek, kolay uygulanabilir fenotipik yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızda metisilin direncinin tespiti için fenotipik ve moleküler yöntemler birlikte kullanılmıştır. Fenotipik olarak; Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi (sefoksitin diski kullanarak), genotipik olarak *mecA* geninin tespiti

için PZR yöntemi uygulanılmıştır. PZR yöntemi ile 210 KNS suşunun 159'unda (%78.09) *mecA* geni varlığı gösterilmiştir. Disk difüzyon yöntemi kullanılarak araştırıldığında ise 145'inde (% 69.12) sefoksitin diskine karşı direnç saptanmış ve metisiline dirençli kabul edilmiştir (CLSI, 2014). İki yöntem karşılaştırıldığında 15 (%9.43) KNS suşunda moleküler yöntemlerle metisilin direnci tespit edilmesine rağmen fenotipik yöntemlerle direnç gösterilememiştir. Kateter kolonizasyonu etkeni olarak bir tane *S. hominis* suşu ise disk difüzyon yöntemi ile metisilin dirençli olarak tespit edilmesine rağmen, PZR ile *mecA* geni saptanamamıştır. *mecA* geni saptanamayan fakat fenotipik olarak dirençli bulunan suşlarda gösterilen metisilin direnci, bu suşlarda: aşırı β -laktamaz yapımı, metisilini inaktive eden enzimlerin varlığı, PBP2a dışında penisilin bağlayan proteinlerin bulunması gibi farklı mekanizmalar ile açıklanmaya çalışılmaktadır (Tenover ve ark., 1999). Sefoksitin disk difüzyon testi ile *mecA* geni tespitini karşılaştıran çeşitli çalışmalar mevcuttur. Telli ve arkadaşları *S. aureus*'larda metisilin direncini araştırdıkları çalışmalarında; *mecA* geni pozitif olan 181 suştan üçünü sefoksitin disk difüzyon testi ile negatif, *mecA* negatif 119 suştan birini sefoksitin disk difüzyon testi ile pozitif olarak belirlemişlerdir (Telli ve ark., 2006). Palazzo ve arkadaşları da 58 *S. aureus* ve 58 KNS'de metisilin direncini çok yönlü olarak inceledikleri çalışmalarında 1 adet KNS suşunu *mecA* genine sahip olmamasına rağmen sefoksitin disk difüzyon yönteminde ve oksasilin agar dilüsyon yönteminde duyarlı olarak saptamışlardır (Palazzo ve ark., 2007).

Metisilin direnci saptanmasında kesin yöntem *mecA* geni tespiti olarak kabul edildiğinde (Cavassini ve ark., 1999); sefoksitin disk difüzyon testiyle metisilin direnci saptanması yönteminin duyarlılığı %91 (testin güven aralığı: %85–94), özgüllüğü %98, (testin güven aralığı: %89–99), negatif prediktif değeri %76.92 (testin güven aralığı: %71–82), pozitif prediktif değeri %99.31 (testin güven aralığı: %97–99) olarak saptanmıştır. Sonuçlara bakıldığında disk difüzyon yönteminde özgüllüğün (%98), duyarlılıktan (%91) daha yüksek olduğu görülmektedir. Bir başka deyişle, yanlış pozitif sonuç olasılığı, yanlış negatif sonuç olasılığından daha yüksektir. Bazı çalışmalarda sefoksitin disk difüzyon için duyarlılık % 98, özgüllük %99, pozitif prediktif değer %99, negatif yorumlama gücü % 98 olarak belirtilmiştir

(Telli ve ark., 2006). Velasco ve arkadaşları ise sefoksitin disk difüzyon yönteminin duyarlılığını %100, özgüllüğünü %98, pozitif prediktif değerini %98, negatif prediktif değerini %100 olarak belirlemişlerdir (Velasco ve ark., 2005). Özel ve arkadaşları stafilocoklarda metisilin direncini; değişik antimikrobiyallerin kullanıldığı disk difüzyon ve PBP2a lateks aglütinasyon yöntemi ile araştırmışlardır. Çalışmalarında PBP2a lateks aglütinasyonunu referans yöntem olarak aldıklarında; sefoksitin disk difüzyon difüzyon yönteminin duyarlılığını %90.9, özgüllüğünü ise %98.2 olarak bulmuşlardır (Özel ve ark., 2011).

Metisilin direnci tespit etmede karşılaşılan sorunlar nedeniyle genetik direnci, fenotipik yöntemlerle en iyi gösteren test veya yöntem arayışı sürmektedir. Heterojen dirence sahip stafilocoklarda, sefoksitin metisilin direncini oksasilinden daha iyi gösterdiğini kanıtlayan birçok yayın bulunmaktadır. Bazı çalışmalarda da sefoksitin, özellikle heterojen suşların tespitinde *mecR1* için daha iyi ve hızlı bir indükleyici olduğu ve *mecA* gen varlığı ile uyumunun daha iyi olduğu bildirilmiştir (Felten ve ark., 2002; Boutiba-Ben Boubaker ve ark., 2004; Cauwelier ve ark., 2004; Swenson ve ark., 2005; Swenson ve ark., 2007).

Metisilin direncinin belirlenmesindeki hatalar ciddi klinik sorunlara neden olabilmektedir. Yalancı duyarlı sonuçlar tedavide yetersizliğe ve MRKNS suşlarının yayılmasına; yalancı dirençli sonuçlar ise glikopeptidlerin aşırı kullanımı ve gereksiz izolasyon tedbirleri nedeniyle aşırı maliyete yol açabilmektedir. Bu nedenle stafilocoklarda metisilin direncinin doğru tanımlanması önem taşımaktadır. Çalışmamızda genotipik olarak *mecA* pozitif bulunan suşların %90.57'sinde fenotipik olarak disk difüzyon ile metisilin direnci saptanabilmiştir; bu da KNS'lerde metisilin direncini belirlemede fenotipik duyarlılık testlerinin çevresel değişikliklerden etkilenebildiğini, genotipik yöntemlerin daha duyarlı ve güvenilir olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızda *mecA* geni pozitif olarak bulunan ve SCC*mec* tiplendirimi yapılan 154 suşun (154/159) %38.31'inin SCC*mec* tip V, %24.68'inin SCC*mec* tip I, %17.53'ünün SCC*mec* tip II, %9.74'ünün SCC*mec* tip VI ve %1.89'unun SCC*mec*

tip III olduğu saptanmıştır. Her SCCmec tipine düşen KNS sayısı az olduğu için; tiplerin bulunma sıklığı hakkında istatistiksel olarak yorum yapılamamıştır. Tiplendirimi yapılan 154 (154/159) suş arasında SCCmec tip V ve SCCmec tip VI'da *S. haemolyticus* oranları sırasıyla %85 ve %54.7 olarak bulunmuştur ($p < 0.001$). Rupee ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da *ccrC* kompleksinin *S. haemolyticus*'ta daha sık olduğu tespit edilmiştir (Rupee ve ark., 2009). Yapılan çalışmalarda farklı KNS türlerinde, farklı SCCmec tiplerinin olduğu görülmektedir. Mombach ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada *S. epidermidis* ve *S. capitis*'lerde en sık bulunan SCCmec tipi tip III (aynı çalışmada tüm KNSler içinde en sık tip III olarak bulunmuştur) olarak bulunurken, İbrahim ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; *S. epidermidis*'lerde en sık SCCmec tip IV saptanmıştır (Mombach ve ark., 2007; İbrahim ve ark., 2009). Xu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise KNS'lerde tip II baskın olarak izlenmektedir (Xu ve ark., 2008).

Mert ve arkadaşları kan kültürlerinden izole ettikleri KNS'lerde SCCmec tiplendirimi yapmışlar; tip I'i %23.3, tip II'yi %0, tip III'ü %11.8, tip IV'ü %24.9 ve tip V'i %14.1 sıklığında saptamışlardır (Mert G ve ark., 2011). Mombach ve arkadaşlarının kan kültürlerinden izole ettikleri 129 KNS'nin SCCmec tiplerine göre dağılımı; 36 (%27.9) tip I, 4 (%3) tip II, 67 (%52) tip III, 1 (%0.8) tip IV olarak belirtilmiştir. (Mombach ve ark., 2007). Rupee ve arkadaşlarının burunlardan izole ettikleri KNS'lerde SCCmec tiplerinin dağılımı; 1 (%1) tip III, 28 (%29) tip IV, 25 (%26) tip V olarak saptanmıştır (Rupee ve ark., 2009). İbrahim ve arkadaşları 61 MRKNS'de SCCmec tiplendirimi yapmışlar ve dağılımı tip IV; 20 (%33), tip V; 11 (%18), tip I /IA; 4 (%6) ve tip II; 3 (%4) olarak vermişlerdir (İbrahim ve ark., 2009). Xu ve arkadaşlarının sınıf I integron taşıyıcılığı ve SCCmec tiplerini araştırdıkları çalışmalarında; 30 integron taşıyıcısı MRKNS'de: tip I, tip II ve tip III olarak saptanan MRKNS sayıları; 5, 15 ve 5; 23 integron taşıyıcısı olmayanlarda ise tip I, tip II ve tip III sayıları sırasıyla 4, 9 ve 7 olarak saptanmıştır (Xu ve ark., 2008).

Güney Brezilya'da yapılan bir çalışmada KNS'ler içinde en sık SCCmec tip III saptanmış ve tip III'ün diğer türlere (tip I, II ve IV) göre beta laktam olmayan antibiyotiklere karşı daha fazla dirençli olduğu saptanmıştır ve klindamisin ($p =$

0.021), rifampisin ($p = 0.010$), levoflaksasine ($p = 0.005$) karşı direnç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Mombach ve ark., 2007). Çalışmamızda SCCmec tipleri ile antimikrobiyallere direnç arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmamıştır ($p > 0.05$).

Çalışmamızda birden fazla SCCmec tipine sahip KNS tespit edilmiştir. Bunlar; tip I + V (%3.25), tip I + II (%1.30), tip I + III (%1.30), tip II + V (%1.30) ve tip III + VI (%0.63)'dir (Tablo 4.12). Yapılan birçok çalışmada da; türüne ve izole edildiği örneğe bağlı olmaksızın birden fazla SCCmec tipine sahip KNS saptanmıştır. Mert ve arkadaşları 46 (%17.6); Mombach ve arkadaşları 4 (%3); Ruppe ve arkadaşları 35 (%36.3); Bhargava ve arkadaşları 2 tane KNS'de birden fazla bant saptamışlardır (Mombach ve ark., 2007; Rupee ve ark., 2009; Mert ve ark., 2011; Bhargava ve ark., 2014).

Çalışmamızda 159 suştan 5 (%3.14)'i SCCmec tiplendirimi için yapılan PZR'ler sonucunda tiplendirilememiştir. Yapılmış bazı çalışmalarda da çeşitli örneklerden izole edilen KNS'lerde SCCmec tiplendirimi yapılamayanlar bulunmaktadır. Rupee ve arkadaşları 96 MRKNS'nin SCCmec tiplendirmesini yaptıkları çalışmalarında kullanılan şemaya uymayan 10 (%10) adet MRKNS saptamışlardır (Rupee ve ark., 2009). Mert ve arkadaşları ise kan kültürlerinden izole ettikleri 265 MRKNS suşunu inceledikleri çalışmalarında 21 (%7.92) MRKNS'nin SCCmec tipini saptayamamışlardır. 21 MRKNS suşunun; 10'u gerçek bakteriyemi etkeni, 11'i ise kontaminant olarak ayrılmıştır (Mert ve ark., 2011). İbrahim ve arkadaşlarının hastaların burun örneklerinden izole ettikleri 61 MRKNS'de SCCmec tiplendirmesi yapmışlar ve 3 (%4.92) *S. epidermidis* suşunu tiplendirememişlerdir (İbrahim ve ark 2009). Mombach ve arkadaşları KDE izolatu olan 129 KNS'yi inceledikleri çalışmalarında, 17 (%13.18)'sini tiplendirememişlerdir (Mombach ve ark., 2007). Xu ve arkadaşlarının 53 MRKNS'yi inceledikleri çalışmalarında ise 8 (%15.09) adet [5 (%9.43)'i integron taşıyıcısı, 3 (%5.66)'ü integron taşıyıcısı olmayan] tiplendirimi yapamadığı KNS suşu mevcuttur (Xu ve ark., 2008). Etlerden izole edilen 25 MRKNS'nin 9 [%36: 6: (%24) *S. sciuri*, 1(%4) *S. epidermidis*, 1(%4) *S. fleuretti* ve 1(%4) *S. vitulinus*]'unu tiplendirememişlerdir (Bhargava ve ark., 2014).

SCC*mec* tiplendiriminde kullanılan yöntemlerin çoğu *S. aureus*'a göre düzenlenmiş olduğu için, KNS'lerde kullanıldığında *ccr* genlerindeki genetik varyasyonlara bağlı olarak, tiplendirimde bazı kısıtlılıklar ortaya çıkmaktadır. KNS'ler arasında metisilin direncinin transferinde SCC'den farklı vektör ya da mekanizmaların olduğu düşünülmektedir (Zhang ve ark., 2009). SCC*mec* elmanı hareketli genetik bir elemandır ve stafilokoklar arasında geniş bir dağılıma sahiptir. Ülkemizdeki baskın tipin saptanması ve dağılımının belirlenmesi için daha fazla epidemiyolojik çalışmaya ihtiyaç duyulduğu çok açıktır.

Çalışmamızda suşların mikropakta biyofilm oluşumlarının değerlendirilmesi sonucunda; toplam 210 suşun 136'sının biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir; oluşan biyofilm tabakalarının 48'i (%22.86) zayıf; 55'i (%26.19) orta; 33'ü (%15.71) kuvvetli olarak değerlendirilmiştir. KİKDE etkeni olan ve kateter kolonizasyonu yapan KNS suşlarında mikropak yönteminde biyofilm oluşturma oranları; periferik kan kültürlerinden ve ellerden izole edilen KNS'lerin ise biyofilm oluşturmama oranları diğerlerine göre anlamlı oranda yüksek ($p < 0.001$) bulunmuştur. Periferik kan kültürlerinden izole edilen KNS'ler; KDE etkenleri ve kontaminasyon olarak ikiye ayrıldığında, KDE etkeni olan KNS'lerde biyofilm oluşumunun (11/13; %84.62) kontaminant suşlara (36/74; %48.65) göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p = 0.016$). Kateterden izole edilen KNS'lerin katetere tutunmak için adezyon özelliklerini kullanmaları; KDE ve KİKDE etkenlerinin klinik açıdan taşıdıkları önem gibi özellikler dikkate alındığında, bu, beklenen bir sonuçtur. Oufrid ve arkadaşları yaptıkları çalışmada biyofilm oluşturan suşların oranını %36 olarak bildirirken; kateterden izole edilen mikroorganizmaların periferik kandan izole edilenlere göre daha fazla biyofilm oluşturduğunu göstermişlerdir. Test edilen klinik örneklerde biyofilm genlerinin varlığı ile mikropakta biyofilm oluşturma oranlarını karşılaştırdıklarında da %97.77 gibi yüksek bir korelasyon saptamışlardır (Oufrid ve ark., 2015). Biyofilm genlerinin varlığı ile in vitro biyofilm oluşumu arasında uyum olmadığını belirten çalışmalar da mevcuttur. Örneğin Ruzicka ve arkadaşları *ica* genleri taşıyan suşların %20'sinin biyofilm oluşturmadığını belirtmişlerdir. Çalışmalarında sağlıklı gönüllülerin ellerinden ve kan kültürlerinden izole edilen KNS'lerin biyofilm özelliklerini araştırmışlardır. Christensen tüp yöntemi, PZR (*ica*

operonunun gösterilmesi) ve KRA kullandıkları araştırmalarında; kan kùltüründen izole edilen KNS'lerde *ica* operonunu %62.6 (92/147), ellerden izole edilenlerde ise %29.9 (44/147) oranlarında saptamışlardır. Kan kùltürlerinden izole edilen suşların 21(21/147)'inde tùp testinde biyofilm oluşturmasına rağmen, KRA'da slime oluşumu izlenmemiştir. Ellerden izole edilen ve *ica* operonu taşıyan 29 suş (29/147) her iki yùntemle de biyofilm oluşturmuştur. *ica* operonu taşıyan suşlardan; 4 (4/147)'ù sadece tùp metodu ile pozitif, 1 (1/147)'i sadece KRA'da zayıf pozitiflik gùstermiřtir. *ica* operonu taşmayan ve KRA'da zayıf pozitiflik gùsteren 1 suş bulunmaktadır (Ruzicka ve ark., 2004).

Çalışmamızdaki 210 suşun 68 (%32.38)'inin slime faktùrù pozitif (41'i invaziv suşlar, 27'si invaziv olmayan suşlar) olarak değerlendirilmiştir. Arciola ve arkadaşları 100 adet kateter ilişili enfeksiyonlardan, 51 adet ise sağlıklı gùnùllùlerin (26'sı hastane çalışanı) cilt ve mukozalarından elde ettikleri *S. epidermidis* suşlarında *icaA*, *icaD* genlerini PZR yùntemi kullanarak, slime faktùr oluşumunu da KRA yùntemi ile araştırmışlardır. Sonuçta 100 kateter ilişili enfeksiyon etkeninin 61'inde, 51 kontrol suşunun ise 3'ünde (3 suş da hastane çalışanlarından) genler pozitif bulunmuş, KRA'da da fenotipik olarak slime faktùr oluşumu tespit edilmiştir (Arciola ve ark., 2001). Çalışmamızda KİKDE etkeni olduğu halde mikropakta biyofilm oluşumu saptanmamış 1'i kateterden, 1'i aynı hastanın periferik kan kùltüründen izole edilmiş 2 adet *S. haemolyticus* suşumuz bulunmaktadır. KDE etkeni olan ve biyofilm oluşturmamış 1 adet *S. haemolyticus* suşumuz bulunmaktadır. Arciola ve arkadaşları kateter ilişili enfeksiyon etkeni olmasına rağmen biyofilm genleri ve slime faktùrù oluşumunun saptanmadığı %39 oranındaki *S. epidermidis* suşunda; adeziv matriks moleküllerini tanıyan mikrobiyal yùzey komponentleri (Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules-MSCRAMMs) ya da fibrinojen bağlayıcı protein gibi adezyondan sorumlu diğer patojenik faktùrlerin sorumlu olabileceği yorumunda bulunmuşlardır (Arciola ve ark., 2004). Çalışmamızda *icaA*, *icaD* ve IS256 gen pozitiflikleri saptanan suş sayıları sırasıyla; 47 (%22.38), 75 (%35.71) ve 100 (%47.62) olarak bulunmuştur. Genlerin tek tek pozitiflikleri durumunda, mikropakta biyofilm oluşumunun da pozitif olarak saptanması anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$).

Kateter kolonizasyonu olarak kabul ettiğimiz 35 suşun 6'sında biyofilm oluşumu gösterilememiştir. Biyofilm oluşumu gösterilen suşların 8'i (+), 12'si (++), 9'u ise (+++) kuvvetinde biyofilm oluşturmuştur. Antunes ve arkadaşları çalışmalarında SVK'dan izole ettikleri 224 stafilokok suşunun (185 KNS ve 39 *S. aureus*) hepsinin biyofilm üreticisi olduğunu belirtmişlerdir (Antunes ve ark., 2011).

Çalışmamızda KRA ekimleri 24. ve 48. saatlerde değerlendirilmiştir ve 24. saatte daha fazla pozitiflik saptadığı tespit edilmiş ($p < 0.001$); 24 saatte değerlendirildiğinde negatif olarak yorumlanan hiçbir suşun 48. saatte pozitif olarak yorumlanmadığı görülmüştür. Arciola ve arkadaşları da KKA besiyerinde 24 saatlik inkübasyon sonucu siyah olan kolonilerde, 48 saatlik inkübasyon sonucu merkezinde pembe veya kırmızı renk değişimi görülebildiğini ve bu durumun faz değişiminden kaynaklandığını bildirilmişlerdir. Kendi çalışmalarında faz değişimi görülen 50 suşla yapılan çalışmalarda; insersiyonel mutasyonla (IS256 bölgesi) *icaC* geninin inaktive olması buna sebep olarak gösterilmektedir (Arciola ve ark., 2001; Arciola ve ark., 2004).

Mikroplakta (+) kuvvetinde biyofilm oluşturan suşların 10 (10/48)'unda, (++) kuvvetinde oluşturanların 35 (35/55)'inde, (+++) kuvvetinde oluşturanların ise 22 (22/33)'sinde KRA'da slime faktör üretimi pozitif olarak saptanmıştır. Mikroplak yönteminde biyofilm oluşturma gücü (pozitiflik derecesi) arttıkça KRA yönteminin de pozitif olanları saptama olasılığının arttığı görülmektedir (ilişki katsayısı, Cramer's $V = 0,608$). Buna karşılık çalışmamızda mikroplak yöntemiyle zayıf, orta ya da kuvvetli pozitif biyofilm oluşturduğu gösterildiği halde KRA'da negatif olarak saptanan suşlar bulunmaktadır. Yapılan bir çalışmada 128 *ica* pozitif *S. aureus* suşun mikroplak yöntemi, tüp yöntemi ve KRA kullanarak araştırıldığında; tüp yöntemi ve mikrotitrasyon plağı yöntemini uyumlu bulurken, KRA besiyeri sonuçları uyumlu bulunmamıştır (Knobloch ve ark., 2002).

Çalışmamızda *icaA*, *icaD* ve IS256 gen pozitiflikleri saptanan suş sayıları sırasıyla; 47 (%22.38), 75 (%35.71) ve 100 (%47.62) olarak bulunmuştur. PZR yöntemiyle araştırılmış olan *icaA*, *icaD* ve IS256 genlerinin en az birinin pozitif olma durumunda

mikroplakta da biyofilm oluşumu pozitif olarak saptanmıştır (sırasıyla, $p<0.001$, $p<0.001$, $p<0.05$). Suşların her üç geni de taşıması halinde mikroplakta biyofilm oluşturmama durumunun izlenmediği görülmüştür ($p<0.001$). Liberto ve arkadaşlarının yaptığı bir araştırmada da çalıştıkları KNS'lerin %79.3'ünde KRA'da slime faktörü oluşumu ile biyofilm genlerinin (*icaA* ve *icaD*) varlığı ve slime faktörü üretimi olmamasıyla da *icaA* ve *icaD* genlerinden birinin yokluğu arasında uyum tespit edilmiştir (Liberto ve ark., 2009).

Toplam 12 adet suşta (10'u periferik kan kültürü, 2'si burun örneğinden izole edilen suşlar) mikroplakta biyofilm oluşumu gösterilmesine rağmen PZR yöntemi ile *icaA*, *icaD* ve IS256 genleri saptanamamıştır. Biyofilm oluşumunda farklı genlerin ve mekanizmaların rol oynadığı düşünülürse daha fazla gen araştırılması sonucunda bu suşların da mekanizmalarının açıklanabileceğini düşünmekteyiz. Vasudevan ve arkadaşlarının biyofilm pozitif ve negatif toplam 35 izolatın tamamında *icaA* ve *icaD* genlerinin bulunduğunu göstermişlerdir. Çalışmada iki suşta *icaAD* pozitif olmasına rağmen üretiminin görülmemesi insersiyonel inaktivasyona veya *ica* lokusundaki delesyonlara bağlı olabileceği bildirilmiştir (Vasudevan ve ark., 2003).

Biyofilm oluşumundan sorumlu genlerin gösterilmesi kolay değerlendirilebilir, hızlı bir yöntem olmakla birlikte biyofilm oluşturma kapasitesini göstermesi ve her zaman fenotipik olarak göstermemesi gibi dezavantajları mevcuttur (O'Gara ve ark., 2001). Genotipik yöntem sonucunda genlerin saptanamadığı durumlarda; var olan genlerin faz varyasyonu, biyofilm oluşumunda başka genler ya da başka mekanizmaların etkin olması söz konusu olabileceği gibi, var olan genlerde değişiklik de göz ardı edilmemelidir. KRA ucuz, kolay, rutinde uygulanabilir olmakla birlikte değerlendirmenin sübjektif olması, besiyerinden, kültür koşullarından etkilenmesi ve mikroplak sonucunda zayıf biyofilm oluşumu gösterenleri saptayamama gibi dezavantajları nedeniyle dikkatli değerlendirilmesi gerekmektedir. Mikroplak yöntemi biyofilm hakkında kantitasyon vermesi açısından faydalı olmakla birlikte, yöntemin zahmetli olması, çok uzun sürede sonuç vermesi, kontaminasyon riski ve her seferinde cut off değerinin hesaplanması gibi zorlukları mevcuttur.

Mikroplak yönteminde biyofilm oluşturduğu gösterilen KNS'lerin MBEK/MİK oranlarının ortanca değeri 4 (1–128), negatif bulunan KNS'lerin MBEK/MİK oranlarının ortanca değeri 1 (1–4) olarak saptanmıştır (Tablo 4.24). Zayıf biyofilm oluşturan suşlarda MBEK/MİK oranı düşükken, suşların biyofilm oluşturma gücü artıkça bu oranın yükselmesi istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$). Antunes ve arkadaşları da biyofilm oluşturma derecesi arttıkça MBEK değerlerinin arttığını saptamışlardır ($p < 0.001$). Ayrıca çalışmalarında zayıf biyofilm oluşturanlar ile güçlü biyofilm oluşturanların MBEK/MİK değerlerini karşılaştırmışlar ve MBEK/MİK değerlerinin güçlü biyofilm oluşturanlarda anlamlı derecede yüksek olduğunu göstermişlerdir ($p < 0.001$). MBEK ya da MBEK/MİK oranının güçlü biyofilm üretenlerde daha yüksek değerlerde olmasını, bu suşlarda biyofilm tabakasının daha fazla olduğu için vankomisin difüzyonunun daha zor olacağı yönünde açıklanmaktadır (Antunes ve ark., 2011). Yapılan başka çalışmalarda da biyofilm oluşumu ile direnç gelişimi; biyofilm matriksi nedeniyle antimikrobiyallerin difüzyonundaki azalmaya bağlanmıştır (Rice, 2006; Frank ve ark., 2007).

KNS suşları invaziv olan veya olmayan örneklerden izole edilmelerine göre gruplandırılarak incelendiğinde, MBEK/MİK değerlerinde anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p = 0.795$). İnvaziv olan ve olmayan suşların arasında fark bulunamamasının nedeninin; KDE etkeni olan ve kontaminant olan KNS'lerin periferik kan kültürü izolatu olarak tek bir grup altında toplanması ve invaziv örnekler arasında yer almasından; kateter kolonizanı olarak kabul edilen suşların ise invaziv olmayan grupta yer almasından kaynaklanıyor olacağını düşünmekteyiz (Tablo 4.1). Suşların izole edildikleri bölgelere göre MBEK/MİK değerleri karşılaştırıldığında ise ellerden ve periferik kandan izole edilen KNS'lerde MBEK/MİK değerlerinin diğerlerine göre daha düşük olması, KİKDE etkenlerinin MBEK/MİK değerlerinin diğerlerine göre yüksek olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$). KİKDE etkeni olan KNS'lerin yüksek virulans, adezyon özelliklerinin olması ve dolayısıyla da MBEK oranlarının yüksek olması beklenen bir sonuç olarak yorumlanmıştır.

Son yıllarda özellikle tedavi seçimlerinde yenilikler yapılmasına yönelik fikirler gündemdedir. İdeal tedavi stratejisi, biyofilm matriksindeki ekstrasellüler polimerik maddelerden en az etkilenecek, çok hızlı bakterisidal etki gösterebilecek ve etki mekanizması biyofilm hücrelerinin büyüme hızından etkilenmeyecek antimikrobiyal ajanlar üzerine yoğunlaşmaktadır (Mathur ve ark., 2004; Cargill ve ark., 2009).

Mathur ve arkadaşları çalışmalarında iki kontrol suşu (*S.epidermidis* ATCC 35983 ve *S.epidermidis* ATCC 12228) ve iki klinik izolatta (MRSA ve metisilin dirençli KNS) linezolid, vankomisin, dalfopristin/ kinupristin ve ranbezolidin MİK ve MBEK değerlerini karşılaştırmışlardır. Çalışmadaki tüm örneklerde MBEK değerleri MİK değerlerine göre belirgin artmış (2–16 kat) olmakla birlikte, bu artış oranının en az olduğu antibiyotiklerin dalfopristin/kinupristin ve ranbezolid olduğu görülmüştür. Çalışmalarında dalfopristine/kinupristin ve ranbezolidi biyofilm oluşumundaki bakterilere en etkili antibiyotikler olarak bildirilmişlerdir (Mathur ve ark., 2004).

Ceri ve arkadaşları in vitro model kullanarak çeşitli antibiyotiklerin MBEK değerlerini araştırmışlardır. Çalışmalarında stafilokokların MİK değerleri ile MBEK değerleri arasındaki farkların çok yüksek olduğunu, siprofloksasin, klindamisin, sefazolin, oksasilin ve vankomisinin çok yüksek dozda uygulanması durumunda bile stafilokokların oluşturduğu biyofilmi inhibe etmediğini gözlemişlerdir ve biyofilme karşı en etkili antibiyotiği gentamisin olarak belirtmişlerdir (Ceri ve ark., 1999).

Vankomisin ve teikoplaninin subinhibitör konsantrasyonlarda *ica* genlerinin ekspresyonunu etkilemediği gösterilmiştir. *S.epidermidis* vankomisine oldukça duyarlı olmasına rağmen biyofilm içindeki bakteri için aynı şeyi söylemek mümkün değildir. Vankomisinin molekül büyüklüğü bu azalmış duyarlılıktan sorumlu tutulmaktadır. Bazı çalışmalarda biyofilmin kendisinin glikopeptid aktivitesini azalttığı öne sürülmektedir (Rachid ve ark., 2000).

El-azizi ve arkadaşları linezolid, vankomisin, quinupristin / dalfopristinin MİK ve MBEK değerlerini karşılaştırmışlardır. Çalışmalarında planktonik form, biyofilm oluşumu ve biyofilmden kopan bakteriler olmak üzere üç faz kullanmışlardır.

Biyofilm bakterilerinin plaktoniklere ve biyofilmden kopan bakterilere kıyasla antibiyotiklere karşı çok daha dirençli olduğunu belirtmişlerdir. Quinupristin /dalfopristin biyofilmden kopan parçalara karşı en etkili antimikrobiyal olarak bulunurken, vankomisin 500 ve 1000 µg/ml gibi yüksek dozlarda uygulandığında MRSA ve *S. epidermidis* biyofilmlerine etkili olurken, MSSA'nın oluşturduğu biyofilme karşı etkili olmamıştır (El-Azizi ve ark., 2005).

Çalışmamızda invaziv olmayan örneklerin içine dâhil ettiğimiz hastane çalışanlarının burun örneklerinden izole edilen KNS'lerin %46.15'inin slime faktör ve %61.54'ünün mikropakta biyofilm oluşturduğu görülmüştür. Mikropakta biyofilm oluşturanların 8 (8/26)'i kuvvetli, 3 (3/26)'ü orta, 5 (5/26)'i zayıf biyofilm oluşturduğu gösterilmiştir. Hastane çalışanlarının burunlarından izole edilen stafilocların incelendiği bir çalışmada 81 (%68.6) KNS ve 37'si (%31.4) *S.aureus* saptanmıştır. Dahili kliniklerde çalışan personelden izole edilen KNS suşlarının 25/44'ü (%56.8) slime faktörü pozitifken, cerrahi kliniklerde bu oran 28/37 (%75.7) olarak saptanmıştır (Çelik ve ark., 2005). Hastane çalışanlarının burunlarından izole edilen KNS'lerde slime faktör oluşumunun incelendiği başka bir çalışmada 190 tıbbi personelin burun boşluklarında saptanan *S. epidermidis* suşlarında %72.2 gibi yüksek bir oranda slime faktör üretimi gözlenmiştir (Bal ve ark., 1997). KNS türlerinin kan akımı ve prostetik materyal enfeksiyonlarından sorumlu olduğu dikkate alınırsa sağlık çalışanlarının enfeksiyon kontrol önlemlerine uyumda son derecede titiz davranmaları gerekliliği bir kez daha ön plana çıkmıştır.

Yenidoğanlarda KİKDE enfeksiyonlarının araştırıldığı bir çalışmada, KİKDE tanısında PFGE yöntemi kullanılmış; kateter ucu kültür örneklerinden ve kan kültürlerinden izole edilen KNS'ler arasında benzerlik karşılaştırılması yapılmıştır. Analiz sonucunda duyarlılık oranı %82.6, özgüllük oranı %100 olarak saptanmıştır (Riboli ve ark., 2014).

Bizim çalışmamızda da bir suş hariç PFGE'de aynı hastaların kateter örnekleri ve kanlarından KİKDE etkeni olarak izole edilen suşların %100 benzer profil oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu bulgu hastalardaki KDE etkenlerinin kateter

kaynaklı olduğunun göstergesi olarak yorumlanmıştır. K KDE etkenlerinin epidemiyolojik özellikleri incelendiğinde; iki farklı hastadan (6 ve 36 no’lu hastalar) izole edilen *S. epidermidis* suşları arasında %85 oranında yakınlık tespit edilmiştir (şekil 4.28). Suşların izole edildiği hastalara ait veriler incelendiğinde; hastaların yatış tarihlerinin, bölümlerinin ve hastanelerinin farklı olduğu saptanmıştır. İki suş arasındaki yakınlık rastlantısal olarak yorumlanmıştır.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Birçok enfeksiyonda etken olarak karşımıza çıkan KNS'lerin tedavilerinde uygun olmayan antibiyotiklerin bilinçsizce kullanımı, bakterilerin kısa sürede birden çok ilaca direnç geliştirmesine neden olmaktadır. Özellikle biyofilm tabakası oluşturan türlerin neden oldukları enfeksiyonlarda, biyofilm tabakasının antimikrobiyal ajanlardan korunma da bakterilere sağladığı avantajlar yüzünden, tedavileri daha zor ve daha uzun sürede olmaktadır. Bu nedenle KNS suşlarının oluşturdıkları biyofilm mekanizmasının anlaşılması önemlidir. Biyofilm oluşumunda yer alan genlerin ve mekanizmaların anlaşılması ile bu enfeksiyonların tedavisinde yeni nesil mekanizma bloke edici ilaçların üretilmesine ışık tutulabilecektir.

1. Çalışmaya 30'u sağlıklı hastane çalışanı olmayan bireylerin ellerinden, 26'sı sağlıklı hastane çalışanı gönüllülerin burunlarından, 35'i kateter kolonizasyonu etkeni, 15'i KİKDE etkeni (15 SVK örneklerinden + 15 bu hastaların periferik kan kültürlerinden izole edilen), 89 SVK takılı olmayan hastaların periferik kan kültürlerinden izole edilen toplam 210 KNS suşu alınmıştır. Çalışmamızdaki KİKDE etkenlerinin sayısının az olması kliniklerden SVK ile birlikte periferik kan kültür örneği gönderilmemesinden kaynaklanmaktadır. Çalışmamıza periferik kan kültürü gönderilmeden sadece kateter kültürü gönderilen ve kateter kültüründe KNS üreyen hastalardan izole edilen suşlar; kateter kolonizasyonu veya KİKDE etkeni ayrımı yapılamayacağı için dâhil edilmemiştir. (Çalışmamızdaki kateter kolonizanı olan suşlar; SVK örneği ile birlikte periferik kan kültürü gönderilen hastaların, periferik kan kültürlerinde KNS üremesi olmayıp, sadece SVK kültürlerinde anlamlı KNS üremesi olan suşlardır.) Hastaların kateterlerinin çekilmesi esnasında periferik kan kültürü örneğinin de yollanmasının; KİKDE etkenlerinin doğru tanımlanması, kateter kolonizanlarının belirlenmesi ve hastanın gereksiz antimikrobiyal kullanımının önlenmesi açısından önemli olduğu görüşündeyiz.

2. Toplam 210 suşun 74'ü (%35.23) *S. epidermidis*, 58'i (%27.61) *S. haemolyticus*, 52'si (%24.76) *S. hominis*, 13'ü (%6.19) *S. capitis*, 8'i (%3.8) *S. warnerii*, 2'si

% (0.95) *S. lugdunensis*, 2'si % (0.95) *S. saprophyticus*, 1'i (%0.47) *S. sciuri* olarak tiplendirilmiştir.

3. İndüklenebilir klindamisin direnci 13 *S. epidermidis* suşunda (%17.57), 8 *S. haemolyticus* suşunda (%13.79), 17 *S. hominis* suşunda (%32.69), 3 *S. capitis*'de (%23.08) bulunmuştur. İstatistiksel olarak türler arasında indüklenebilir klindamisin direnci açısından anlamlı fark saptanamamıştır ($p>0.05$).
4. *S. haemolyticus*'ta sefoksitin (%91.8), sefazolin (%91.8), amoksisilin-klavulonat (%91.8), siprofloksasin (%84.48), trimetoprim-sülfametoksazol (%84.48), rifampisin (%51.72) ve gentamisine (%81.03) karşı direnç oranlarının diğer türlere göre anlamlı oranda yüksek olduğu ve klindamisine karşı direnç oranının da (%34.48) diğer türlere göre anlamlı oranda düşük olduğu saptanırken ($p<0.05$); eritromisin ve tetrasikline karşı olan direnç oranlarında türler arasında istatistiksel olarak farklılık saptanamamıştır.
5. Suşların vankomisin için MİK değerleri CLSI (2014) verilerine göre değerlendirilmiş, hepsi ≤ 4 µg/ml olarak bulunmuş ve duyarlı kabul edilmiştir. Suşların büyük bir bölümünün MİK değerinin 1 µg/ml [90 (%42,85)] ve 2 µg/ml [76 (%36,19)] olduğu görülmüştür. Çalışmamızda vankomisine karşı dirençli suş tespit edilmemiştir. Bu veri vankomisinin planktonik formdaki KNS suşlarında güvenle kullanımının uygun olduğu yönünde yorumlanmıştır. Biyofilm oluşturan KNS suşlarında daha yüksek vankomisin dozlarına ihtiyaç olabileceği, aşağıda açıklandığı üzere, çalışmamızın biyofilm deneyleri sonucunda ortaya konulmuştur.
6. Suşların *mecA* geni varlığına PZR yöntemiyle bakılmıştır. Toplam 210 KNS suşunun 159'unda (%78.09) *mecA* geni varlığı saptanmıştır. Bu oran KNS suşlarında metisilin direncinin yüksekliğine işaret etmekte ve uygun antimikrobiyal seçiminin önemini vurgulamaktadır.

7. Suşların metisilin direnç oranlarını saptamak amacıyla rutin uygulamada kullanılmakta olan ve CLSI (2014) tarafından önerilen, fenotipik bir yöntem olan sefoksitin diski kullanarak yapılan Kirby-Bauer disk difüzyon yönteminde; PZR yöntemi ile *mecA* geni taşıdığı gösterilen 159 suşun 144'ü (%90.57) metisilin dirençli olarak saptanırken, 15'i (%9.43) metisilin duyarlı bulunmuştur. *mecA* geni taşıdığı halde fenotipik olarak duyarlı bulunan 15 suşun, 13'ü invaziv olmayan örneklerden izole edilen suşlar iken (3 el, 8 burun, 2 kateter kolonizasyon örneği), 2'si periferik kan kültüründen izole edilen KNS suşlarıdır.
8. PZR yöntemi ile *mecA* geni negatif olarak bulunan toplam 51 suşun, sefoksitin diski kullanılarak uygulanan Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle saptanan direnç oranlarına bakıldığında, kateter kolonizasyonu etkeni olan bir *S. hominis* suşunda disk difüzyon yöntemiyle direnç saptandığı görülmüştür. Buna göre metisilin direnci saptanmasında *mecA* geni bulunması altın standart olarak kabul edildiğinde, sefoksitin disk difüzyon testiyle metisilin direnci saptanması yönteminin duyarlılığı %91 (testin güven aralığı: %85-94), özgüllüğü %98, (testin güven aralığı: %89-99), negatif prediktif değeri %76.92 (testin güven aralığı: %71-82), pozitif prediktif değeri %99.31 (testin güven aralığı: %97-99) olarak saptanmıştır. Çalışmamızda saptanan bu değerler yapılan bazı çalışmalar ile uyum göstermektedir:
9. Swenson ve arkadaşları, 62 *S. aureus* ve 53 KNS suşunda metisilin direncini tespit etmek için sefoksitin diski kullanılarak yapılan Kirby-Bauer disk difüzyon yönteminin *mecA* PZR ile karşılaştırmışlar ve sonuçta Kirby-Bauer disk difüzyon yönteminin duyarlılık ve özgüllüğünü; *S. aureus* suşları için %98 ve % 100, KNS suşları için %99 ve %96 olarak bulmuşlardır (Swenson ve ark., 2005). Palazzo ve arkadaşları, 58 *S. aureus* ve 58 KNS suşunda oksasilin agar dilüsyon, Kirby-Bauer disk difüzyon yönteminin (oksasilin ve sefoksitin diskleri kullanarak), ve *mecA* PZR ile metisilin direncini araştırmışlardır. Rutin laboratuvarlarda disk difüzyon testi yöntemlerinin yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olmaları ve ucuz olmaları nedeniyle tercih edilebileceğini buna karşın düşük düzey ya da heterojen dirence sahip KNS'lerde fenotipik

yöntemlerin metisilin direncini belirlemede yeterli olmadığını vurgulamışlardır (Palazzo ve ark., 2007). Metisilin direncinin doğru olarak belirlenememesi, 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. Çalışmamızın sonucunda; KNS suşlarında metisilin direncinin belirlenmesinde sefoksitin diski kullanılarak yapılan Kirby-Bauer disk difüzyon yönteminin özgüllüğünün %98 bulunması, CLSI önerileri doğrultusunda rutin laboratuvarlarda kullanılmasının uygun olacağı görüşünü desteklemektedir. Bununla birlikte verilerimiz, surveyans çalışmalarında *mecA* geni araştırılarak metisilin direnci takibinin önemine dikkat çekmektedir.

10. Tiplendirimi yapılan 154 suşun 38'inin SCCmec tip I (%24.68), 27'sinin SCCmec tip II (%17.53), 3'ünün SCCmec tip III (%1.89), 59'unun SCCmec tip V (% 38.31), 15'inin SCCmec tip VI (%9.74), 5'inin SCCmec tip I + V (%3.25), 2'sinin SCCmec tip I + II (%1.30), 2'sinin SCCmec tip I + III (%1.30), 2'sinin SCCmec tip II + V (%1.30) ve 1'inin SCCmec tip III + VI (% 0.63) olduğu saptanmıştır. SCC mec tipV ve SCCmec tip VI'da *S. haemolyticus* oranları sırasıyla %85 ve %54.7 olarak bulunmuş ve bu tiplerde *S. haemolyticus* bulunma olasılığı diğer türlere göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek kabul edilmiştir ($p<0.001$). Ülkemizde yapılan bir başka çalışmada, toplam 261 metisilin dirençli KNS'nin SCCmec tiplendirilmesi yapılan bir çalışmada; SCCmec tip I; 61 (%23.3) SCCmec tip II 0 (%0), SCCmec tip III; 31 (%11.8), SCCmec tip IV 65 (%24.9), SCCmec tip V 37 (%14.1), SCCmec tip VI 46 (%17.6) olarak bulunmuştur (Mert ve ark., 2011). Aynı çalışmada tiplendirilemeyen 21 (%18.2) suş bulunmaktadır. KNS suşlarının SCCmec tiplerinin, türlerine, izole edildikleri klinik örneğe ya da coğrafi bölgeye göre değişkenlik gösterip göstermediğini ve virülans faktörleri ile ilgili olup olmadıklarını ortaya koymak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu görüşündeyiz.

- 11.** KNS suşlarında biyofilm oluşumlarının incelenmesi amacıyla mikropalak yöntemi uygulanmıştır. Değerlendirme aşamasında sadece besiyeri içeren ve negatif kontrol içeren kuyucukların optik dansitelerinden yola çıkılarak yapılan istatistiksel hesaplama sonucunda bir cut off değeri hesaplanmış ve bu cut off (OD_C) kullanılarak pozitif ve negatif değerler belirlenmiştir. OD_C değeri 0.28'in altında değer veren kuyucukta biyofilm oluşmadığı; 0.28–0.56 değerleri arasındaki kuyucuklarda zayıf (+ kuvvetinde) biyofilm oluştuğu; 0.57-1.12 değerleri arasındaki kuyucuklarda orta (++) kuvvetinde) düzeyde biyofilm oluştuğu; 1.13 ve üzerinde değer veren kuyucuklarda biyofilm oluşumunun kuvvetli (+++) olduğu kabul edilmiştir. Bunun sonucunda; suşların, 136'sının (%64.76) biyofilm oluşturduğu, 74'ünün (%35.23) ise oluşturmadığı görülmüştür. Biyofilm oluşturmayan suşların 43'ü (43/74; %58.11) invaziv örneklerle ait iken, biyofilm oluşturanların 76'sının (76/136; %55.88) invaziv örneklerle ait olduğu saptanmıştır. Mikropalak yöntemiyle biyofilm oluşumu açısından incelendiğinde, invaziv olan ve invaziv olmayan örneklerden izole edilen KNS suşları arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). Farklılık ortaya çıkmamasındaki sebeplerden birincisi periferik kan kültüründen elde edilen tüm KNS suşlarını (etken olan ve kontaminant olan) çalışmaya dâhil etmiş olmamız olarak yorumlanmıştır. İkinci sebep ise hastane çalışanların burunlarından izole edilen KNS suşlarında biyofilm oluşumunun beklenenden yüksek oluşudur ki bu da hastane çalışanlarının, gerek hastane ortamından gerek hastalardan kaynaklanan çok çeşitli suşlarla etkileşmesi olarak düşünülebilir.
- 12.** Toplam 210 suşun 48'i (%22.86) zayıf; 55'i (%26.19) orta; 33'ü (%15.71) kuvvetli biyofilm oluşturmuşlardır.
- 13.** İzole edildikleri yerlere göre incelendiğinde KİKDE etkeni olan ve kateter kolonizasyonu yapan KNS suşlarında mikropalak yönteminde biyofilm oluşturma oranının diğerlerine göre daha yüksek saptanması istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p< 0.001$). KİKDE etkenleri, çalışmanın son basamağı olan PFGE ile aynı hastaların SVK'larından alınan örneklerde üreyen KNS suşları ile birebir aynı çıkmışlardır. Bu da bize bu hastalardaki kan dolaşım

enfeksiyonu etkenlerinin kateter kaynaklı olduğunu epidemiyolojik yolla ispatlamaktadır. KİKDE olan hastalardan izole edilen SVK kaynaklı KNS'lerin biri hariç hepsinin mikropakta biyofilm oluşturduğu ve yine bir başkası hariç hepsinin biyofilm genlerinin düzenlenmesinde rol üstlenen IS256 genine sahip olduğu saptanmıştır. Bu bulgular da KİKDE suşlarının neden diğer suşlara göre daha yüksek biyofilm oluşturma oranına sahip olduğunu açıklamaktadır. Kateter kolonizasyonu olarak izole edilen KNS suşlarında biyofilm oluşumlarının yüksek olması ise, bu mikroorganizmaların genellikle biyomateryaller üzerinde biyofilm tabakası oluşturmalarıyla ilişkili bulunmuştur.

14. Periferik kan kültürlerinden ve ellerden izole edilen KNS'lerin ise mikropak yönteminde biyofilm oluşturmama oranı diğerlerine göre anlamlı oranda yüksektir ($p < 0.001$). Hastane çalışanı olmayan kişilerin ellerinden alınan örneklerden ve periferik kan kültürlerinden (kontaminantlar ve etkenlerin hepsi çalışmaya alınmıştır) izole edilen KNS'lerde biyofilm oluşumun düşük olması beklenen bir sonuçtur. Periferik kan kültürlerinden izole edilen KDE etkeni ile kontaminantlar ayrıldığında; KDE olan KNS'lerin (11/13; %84.62) mikropakta biyofilm oluşturma oranlarının kontaminantlara (36/74; %48.65) göre anlamlı derecede fazla olduğu ortaya çıkmıştır ($p < 0.001$).
15. Suşların slime faktör oluşumu KRA yöntemi ile araştırılmıştır. Buna göre toplam 210 suşun 68'i (%32.38) slime faktör pozitif, 142'si (%67.62) slime faktör negatif olarak değerlendirilmiştir. Mikropak yöntemi ile karşılaştırıldığında oran çok düşüktür ki fenotipik bir yöntem olması ve değerlendirmenin subjektif olması gibi yöntemin dezavantajları mevcuttur. Bu durum, zayıf biyofilm üreten suşların, KRA yöntemi ile değerlendirilmesinin zor olmasına ve sonuçlarının yorumlanmasındaki güçlüğü bağlanabilir.
16. Çalışmadaki tüm suşlarda *icaA*, *icaD* ve IS256 genleri araştırılmıştır. *icaA*, *icaD* ve IS256 gen pozitiflikleri saptanan suş sayıları sırasıyla; 47 (%22.38), 75 (%35.71) ve 100 (%47.62) olarak bulunmuştur. Genlerin tek tek pozitiflikleri durumunda, mikropakta biyofilm oluşumunun da pozitif olarak saptanması

anlamalı bulunmuştur ($p<0.001$). Stafilokok suşlarının biyofilm oluşumları üzerine etkili çok fazla sayıda gen bulunmaktadır. Çalışmamızda en sık rastlanan gen bölgeleri seçilmiştir. Çalışmamızda her bir genin tek başına varlığı ile mikropakta biyofilm oluşumu arasında doğru orantı kurulmuş olsa da, ilerideki çalışmalarda diğer gen bölgelerinin de seçilmesi ve araştırılmasının daha açıklayıcı olabileceği görüşündeyiz.

17. El Azizi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada metisilin dirençli ve duyarlı *S. aureus* ve *S. epidermidis* suşlarının vankomisin, linezolid, dalfopristin, quinopristin ve dalfopristin-quinopristine olan MİK değerleri ve biyofilm oluşturmuş suşlar üzerine MBK değerleri araştırılmıştır. Araştırmacılar, biyofilm bakterilerinin, planktonik bakterilere oranla 8-12 kat daha fazla dirençli olduğunu, biyofilm oluşturmuş bakterilerin eradikasyonunun zor olduğunu ve bu bakterilere karşı antimikrobiyal kullanırken MİK değerlerinin çok daha üstünde dozlarda kullanılması gerekliliğini vurgulamışlardır [El Azizi ve ark., 2005].
18. Tüm suşlar ele alındığında; vankomisin için MBK ortanca değerinin 4 µg/ml (1–128) olduğu saptanmıştır. Mikropak yönteminde biyofilm oluşturduğu gösterilen KNS'lerin MBK/MİK oranlarının ortanca değeri 4 (1–128), negatif bulunan KNS'lerin MBK/MİK oranlarının ortanca değeri 1 (1–4) olarak saptanmıştır. Biyofilm kuvvet dereceleriyle birlikte ele alındığında; zayıf biyofilm oluşturan suşlarda MBK / MİK oranı düşükken, suşların biyofilm oluşturma gücü arttıkça bu oranın yükselmesi istatistiksel açıdan da anlamalı bulunmuştur ($p<0.001$). Bu da biyofilm tabakasının kuvveti arttıkça antimikrobiyale karşı geçirgenliğin azalması ve en üst tabaka antimikrobiyalden etkilense bile aşağı indikçe etkilenen suş sayısının azalması sonucunda beklenen bir bulgudur. Bu veri biyofilm oluşturan suşlarda daha yüksek dozlarda vankomisin kullanıma ihtiyaç duyulabileceği şeklinde, önemli bir bulgu olarak yorumlanmıştır.

ÖZET

Santral Venöz Kateterlerden İzole Edilen Koagülaz Negatif Stafilokokların Antimikrobiyal Direnç Profilleri ve Biyofilm Oluşturma Özelliklerinin Konvansiyonel ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması

Kateter ile ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonları (KİKDE), hayatı tehdit edici durumlara yol açabilmeleri nedeniyle önem taşırlar. Koagülaz negatif stafilokoklar (KNS), KİKDE etkenleri arasında ilk sıralarda yer alırlar. Bu enfeksiyonlarda, bakterilerin biyofilm oluşturabilme potansiyelleri kateter üzerindeki kolonizasyonlarını sağlayarak önemli bir virülans faktörü olarak karşımıza çıkmakta ve tedaviyi güçleştirmektedir.

Çalışmamızda 30'u sağlıklı hastane çalışanı olmayan bireylerin ellerinden, 26'sı sağlıklı hastane çalışanı gönüllülerin burunlarından, 35'i kateter kolonizasyonu etkeni, 15'i KİKDE etkeni (15 santral venöz kateterden + 15 bu hastaların periferik kan kültürlerinden izole), 89 kateter takılı olmayan hastaların periferik kan kültürlerinden izole edilen toplam 210 KNS suşu kullanılmıştır. Toplam 210 suşun 74'ü (%35,23) *S. epidermidis*, 58'i (%27,61) *S. haemolyticus*, 52'si (%24,76) *S. hominis*, 13'ü (%6,19) *S. capitis*, 8'i (%3,8) *S. warnerii*, 2'si (%0,95) *S. lugdunensis*, 2'si (%0,95) *S. saprophyticus*, 1'i (%0,47) *S. sciuri* olarak tiplendirilmiştir. Periferik kan kültürlerinden izole edilen KNS suşları arasında; dahili bölümlerden izole edilenlerde *S. epidermidis* oranının, reanimasyon ve yoğun bakım ünitelerinden izole edilenlerde ise *S. haemolyticus*'un oranının yüksek olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

Tüm suşların antimikrobiyal direnç profilleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile çalışılmış ve hiçbirisinin teikoplanin ve linezolid dirençli olmadıkları saptanmıştır. İndüklenebilir klindamisin direnci 13 *S. epidermidis* suşunda (%17.57), 8 *S. haemolyticus*'da (%13.79), 17 *S. hominis*'de (%32.69), 3 *S. capitis*'de (%23.08) bulunmuştur. *S. haemolyticus*'ta sefoksitin (%91.8), sefazolin (%91,8), amoksisilin-klavulonat (%91.8), siprofloksasin (%84.48), trimetoprim-sülfametoksazol (%84.48), rifampisin (%51.72) ve gentamisine (%81.03) karşı direnç oranlarının diğer türlere

göre anlamlı oranda yüksek olduğu ve klindamisine karşı direnç oranının da (%34.48) diğer türlere göre anlamlı oranda düşük olduğu saptanmıştır (p<0.05).

Suşların vankomisin için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri CLSI (2014) verilerine göre değerlendirilmiş, hepsi ≤ 4 µg/ml olarak bulunmuş ve duyarlı kabul edilmiştir. Suşların izole edildikleri bölgelere vankomisin MİK değerleri karşılaştırıldığında; burundan ve periferik kan kültürlerinden izole edilen KNS'lerde MİK değeri istatistiksel olarak anlamlı oranda daha yüksek saptanmıştır (p<0.001).

Suşların metisilin direncine *mecA* geni araştırılarak PZR yöntemiyle bakılmıştır. Toplam 210 KNS suşunun 159'unda (%78.09) *mecA* geni varlığı saptanmıştır. İstatistiksel olarak invaziv suşlardame*mecA* geninin yüksek oranda pozitif, invaziv olmayan suşlarda ise *mecA* geninin yüksek oranda negatif olarak saptanması anlamlı bulunmuştur (p<0.001). Suşlar izole edildikleri örneklerle göre gruplandırılarak birbirleriyle karşılaştırıldıklarında, ellerden izole edilen 30 suşun 19 (%63.3)'unda *mecA* geninin negatif olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.001). Fischer exact testi ile suşlar türlerine göre incelendiğinde *S. haemolyticus*'ta *mecA* geninin yüksek oranda pozitif, *S. warnerii*'de ise yüksek oranda negatif saptanması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.001).

mecA geni pozitif bulunan 159 suşun 144'ü (%90.57) CLSI (2014) tarafından önerilen fenotipik yöntem olan sefoksitin disk difüzyon testi ile de metisilin dirençli olarak saptanırken, 15'i (%9.43) bu yöntem ile metisilin duyarlı bulunmuştur. Buna göre metisilin direnci saptanmasında *mecA* geni bulunması altın standart olarak kabul edilirse, sefoksitin disk difüzyon testiyle metisilin direnci saptanması yönteminin duyarlılığı %91 (testin güven aralığı: %85–94), özgüllüğü %98, (testin güven aralığı: %89-99), negatif prediktif değeri %76.92 (testin güven aralığı: %71-82), pozitif prediktif değeri % 99.31(testin güven aralığı: %97-99) olarak saptanmıştır.

mecA geni pozitif bulunan 159 olan suşa SCC*mec* tiplendirimi amacıyla M-PZR protokolü uygulanmıştır. Tiplendirimi yapılabilen 154 suşun 38'inin tip I (%24.68),

27'sinin tip II (%17.53), 3'ünün tip III (%1.89), 59'unun tip V (% 38.31), 15'inin tip VI (%9.74), 5'inin tip I + V (%3.25), 2'sinin tip I + II (%1.30), 2'sinin tip I + III (%1.30), 2'sinin tip II + V (%1.30) ve 1'inin tip III + VI (% 0.63) olduğu saptanmıştır. SCCmec tipV ve tipVI'da *S. haemolyticus* oranları sırasıyla %85 ve %54,7 olarak bulunmuştur ($p<0.001$).

Suşların biyofilm oluşturma yetenekleri mikropalak yöntemi ile kantitatif olarak gösterilirken, slime faktör oluşumlarına da Kongo red agar (KRA) yöntemi ile fenotipik olarak bakılmıştır. Mikropalakta suşların 136'sının (%64.76) biyofilm oluşturduğu, 74'ünün (%35.23) ise oluşturmadığı görülmüştür. Mikropalak yöntemiyle biyofilm oluşumu açısından incelendiğinde, invaziv olan ve invaziv olmayan örneklerden izole edilen KNS suşları arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır ($p>0.05$). İzole edildikleri yerlere göre incelendiğinde KİKDE etkeni olan ve kateter kolonizasyonu yapan KNS suşlarında mikropalak yönteminde biyofilm oluşturma oranının diğerlerine göre daha yüksek saptanması istatistiksel açıdan anlamlı olarak yüksek bulunmuştur ($p<0.001$). KRA yönteminde toplam 210 suşun 68'i (%32.38'i) slime faktör pozitif, 142'si (%67.62) slime faktör negatif olarak değerlendirilmiştir. Mikropalak yönteminde biyofilm oluşturma gücü (pozitiflik derecesi) arttıkça KRA yönteminin de pozitif olanları saptama olasılığının arttığı görülmektedir (ilişki katsayısı, Cramer's V= 0.608).

Çalışmadaki tüm suşlarda *icaA*, *icaD* ve IS256 genleri araştırılmış, pozitiflik saptanan suş sayıları sırasıyla; 47 (%22.38), 75 (%35.71) ve 100 (%47.62) olarak bulunmuştur. Genlerin herhangi birinin pozitifliği durumunda, mikropalakta biyofilm oluşumunun da pozitif olarak saptanması anlamlı bulunmuştur ($p<0.001$).

Mikropalak yöntemiyle biyofilm oluşturduğu gösterilen (zayıf, orta ya da kuvvetli düzeyde) toplam 136 suş [*S.epidermidis* (n:57), *S. hominis* (n:36), *S. haemolyticus* (n:33), *S.capitis* (n:7), *S. lugdunensis* (n:1), *S. saprophyticus* (n:1) ve *S. sciuri* (n:1)] minimum biyofilm eradike edici konsantrasyon (MBEK) değerlerinin hesaplanması için test edilmişlerdir. Türler arasında *S. warnerii*'nin diğer suşlara göre MBEK değeri anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($p<0.001$). Ellerden izole edilen KNS

suşlarının MBEK değerleri diğer suşlara göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ($p<0.001$).

KİKDE etkeni 15 adet suş izole edilmiştir; bunların 7'si *S.epidermidis*, 5'i *S. haemolyticus*, 3'ü *S. hominis* olarak tiplendirilmiştir. KİKDE etkeni olan suşlara, kateterden izole edilen suşlar ile olan benzerliklerini ortaya koymak amacıyla Değişken Alanlı Jel Elektroforezi (Pulsed Field Gel Electrophoresis-PFGE) uygulanmıştır. PFGE'de aynı hastaların kateter örnekleri ve kanlarından KİKDE etkeni olarak izole edilen suşların %100 benzer profil oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bununla birlikte farklı hastaların KİKDE etkenleri arasında epidemiyolojik benzerliğe rastlanmamıştır.

Çalışmamızda hastanemizdeki kateter ile ilişkili kan dolaşımı etkenlerinin epidemiyolojik özellikleri ve antimikrobiyal direnç profilleri hakkında bilgi edinilmesini sağlayarak, tedavi protokollerine ışık tutulması hedeflenmiştir.

Çalışma rutin mikrobiyolojik inceleme için gönderilen hasta kültürlerinden elde edilen suşlar üzerinden yürütülmüştür. Sağlıklı kontrollerden örnek alınması için “bilgilendirilmiş gönüllü olur formu” hazırlanmış ve çalışma etik kurul onayı almıştır.

Anahtar Kelime: Koagülaz negatif stafilokok, biyofilm, kateter, vankomisin, *mecA*

SUMMARY

Investigation of Antimicrobial Resistance Patterns and Biofilm Generation Properties of Coagulase Negative Staphylococci That Were Isolated From Central Venous Catheters by Conventional and Molecular Methods

Catheter related blood stream infections (CRBSI) are important because they may cause life threatening situations. Coagulase negative staphylococci (CoNS) are one of the first factors of CRBSI. In these infections, biofilm generation potential of the bacteria appears as an important virulence factor and makes the treatment harder by facilitating their colonization on the catheters.

In our study, a total of 210 CoNS strains, 30 of them were obtained from the hands of individuals who do not work at the hospital, 26 of them were obtained from the noses of healthy volunteer hospital workers, 35 of them are catheter colonization factors, 15 of them are CRBSI factors (15 isolated from the central venous catheter + 15 isolated from these patients' peripheral blood culture), 89 of them were isolated from peripheral blood cultures of patients who do not have catheters, were used. From these 210 strains, 74 of them (35.23%) were classified as *S. epidermidis*, 58 of them (27.61%) as *S. haemolyticus*, 52 of them (24.76%) as *S. hominis*, 13 of them (6.19%) as *S. capitis*, 8 of them (3.8%) as *S. warnerii*, 2 of them (0.95%) as *S. lugdunensis*, 2 of them (0.95%) as *S. saprophyticus*, and 1 of them (0.47%) was classified as *S. sciuri*. Among the CoNS strains that were isolated from peripheral blood cultures, it is statistically significant that in the ones that were isolated from internal medicine clinics *S. epidermidis* ratio is high and in the ones that were isolated from reanimation and intensive care units *S. haemolyticus* ratio is high ($p < 0.05$).

Antimicrobial resistance profiles of all strains was studied by Kirby-Bauer disc diffusion method and it was determined that none of them is resistant to teicoplanin and linezolid. Inducible clindamycin resistance was found in 13 *S. epidermidis* strain (17.57%), 8 *S. haemolyticus* strain (13.79%), 17 *S. hominis* strain (32.69%), and 3 *S. capitis* strain (23.08%). It was determined that in *S. haemolyticus*, the ratio of the

resistance to cefoxitin (91.8%), cefazolin (91.8%), amoxicillin - clavulanate (91.8%), ciprofloxacin (84.48%), trimethoprim/sulfamethoxazole (84.48%), rifampicin (51.72%) and gentamicin (81.03%) is significantly higher and the ratio of resistance to clindamycin is significantly lower than the others ($p<0.05$).

Minimum inhibitor concentrations (MIC) of the strains for vancomycin were evaluated according to the CLSI (2014) data, all of them were found as ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$ and were accepted sensitive. When the vancomycin MIC values were compared, the MIC value of CoNS those were isolated from nose and peripheral blood cultures was detected significantly higher than the others ($p<0.001$).

Methicilline resistance of the strains was investigated with PCR method by searching *mecA* gene. The presence of *mecA* gene was detected in 159 of 210 (78.09%) CoNS strain. It is statistically significant that *mecA* gene in invasive strains is highly positive and in noninvasive strains it is highly negative ($p<0.001$). When the strains are compared to each other by their isolation sites, it is statistically significant that in 19 of 30 (63.3%) strains that were isolated from hands, *mecA* gene were negative ($p<0.001$). When the strains were investigated according to their species by the Fischer exact test, it is statistically significant that in *S. haemolyticus* *mecA* gene is highly positive and in *S. warnerii* it is highly negative ($p<0.001$).

While the 144 of 159 (90.57%) strains which have positive *mecA* gene were found resistant to methicilline by cefoxitin disk diffusion test which is a phenotypic method recommended by CLSI (2014), 15 (9.43%) of them were found sensitive to methicilline. If the presence of *mecA* gene is accepted as a gold standard for determining methicilline resistance, sensitivity of the cefoxitin disk diffusion test is 91% (confidence interval 85-94%), specificity 98% (confidence interval 89-99%), negative predictive value 76.92% (confidence interval 71-82%), positive predictive value 99.31% (confidence interval 97-99%).

M-PCR protocol was applied to 159 strains which have *mecA* gene for identification of SCC*mec*. From the 154 strains which could be identified, 38 of them are type I

(24.68%), 27 of them are type II (17.53%), 3 of them are type III (1.89%), 59 of them are type V (38.31%), 15 of them are type VI (9.74%), 5 of them are type I + V (3.25%), 2 of them are type I + II (1.30%), 2 of them are type I + III (1.30%), 2 of them are type II + V (1.30%) and 1 of them is type III + VI (0.63%). *S.haemolyticus* ratios were found as 85% and 54.7% in SCCmec type V and type VI respectively ($p<0.001$).

While the ability of biofilm generation of the strains was shown quantitatively by microplate method, the formation of slime factor was observed phenotypically by Congo Red Agar (CRA) method. It was observed that in the microplate, 136 (64.76%) of the strains formed biofilm, 74 (35.23%) of them did not. When investigated in terms of biofilm generation by microplate method, there were not any significant differences determined between the CoNS strains which were isolated from invasive and non-invasive samples ($p>0.05$). When investigated according to their isolated regions, biofilm generation ratios of the CoNS strains that are CRBSI factors and make catheter colonization were found significantly higher than the others ($p<0.001$). In CRA method from the 210 strains 68 of them (32.38%) were evaluated as slime factor positive and 42 of them (67.62%) were evaluated as slime factor negative. As the biofilm generation power in microplate method increases, it is observed that the possibility of the CRA method to determine the positive ones also increases (relation coefficient, Cramer's $V=0.608$).

In all the strains in the study, *icaA*, *icaD* and IS256 genes were investigated, positivity rates were found as 47 (22.38%), 75 (35.71%) and 100 (47.62%) respectively. In the case of gene positivity, it was found significant that the formation of biofilm in microplate is also positive ($p<0.001$).

A total of 136 strains that were proved to form biofilm by microplate method [*S.epidermidis* (n:57), *S. hominis* (n:36), *S. haemolyticus* (n:33), *S.capitis* (n:7), *S. lugdunensis* (n:1), *S. saprophyticus* (n:1)ve *S. sciuri* (n:1)] were tested to calculate the minimum biofilm eradication concentrations (MBEC). The MBEC value of *S.warnerii* were found significantly lower when compared to other strains ($p<0.001$).

The MBEC values of CoNS strains that were isolated from hands were found significantly lower than the others ($p < 0.001$).

A total of 15 CRBSI strains were isolated; 7 of them were identified as *S.epidermidis*, 5 of them as *S.haemolyticus*, 3 of them as *S.hominis*. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) was applied to CRBSI strains to show their similarities with the strains that were isolated from catheters. In the PFGE, it was observed that the CRBSI strains and the catheter strains of the same patients show 100% similar profiles. In addition, epidemiological similarity was not observed between CRBSI strains of different patients.

Our aim is to get information about the epidemiological properties and antimicrobial resistance profiles of CRBSI strains isolated from our hospital and by this way to guide the treatment protocols.

The study was performed with the strains that were obtained from routine patient cultures. To take samples from healthy control group, “informed volunteer consent form” was prepared and the study was approved by the ethical committee.

Key Words: Coagulase negative staphylococci, biofilm, catheter, vancomycin, *mecA*

KAYNAKLAR

- Allignet, J., Aubert, S., Dyke, K.G., El Solh, N. (2001). *Staphylococcus caprae* strains carry determinants known to be involved in pathogenicity: a gene encoding an autolysin-binding fibronectin and the *ica* operon involved in biofilm formation. *Infection and Immunity* **69**(2): 712–718.
- Altun, H.U., Şener, B. (2008). Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci. *Hacettepe Tıp Dergisi* **39**: 82–88.
- Andes, D., Nett, J., Oschel, P., Albrecht, R., Marchillo, K., Pitula, A. (2004). Development and characterization of an in vivo central venous catheter *Candida albicans* biofilm model. *Infection and Immunity* **72**(10): 6023–6031.
- Andrei, A., Zervos, M.J. (2006). The Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* **130**(5): 662–668.
- Aktaş, E., Sarı, E.N., Keskin, A.S., Pişkin, N., Külâh, C., Cömert, F. (2011). Damar İçi Kateter ile İlişkili Enfeksiyon Etkenleri ve Antibiyotik Duyarlılıkları. *Mikrobiyoloji Bülteni* **45**(1): 86–92.
- Antunes, A.L., Bonfanti, J.W., Perez, L.R., Pinto, C.C., Freitas, A.L., Macedo, A.J., Barth, A.L. (2011). High vancomycin resistance among biofilms produced by *Staphylococcus* species isolated from central venous catheters. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **106**(1): 51–55.
- Arciola, C.R., Baldassarri, L., Montanaro, L. (2001). Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. *Journal of Clinical Microbiology* **39**(6): 2151–2156.

- Arciola, C.R., Collamati, S., Donati, E., Montanaro, L. (2001). A rapid PCR method for the detection of slime-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* and *S.aureus* in periprostheses infections. *Diagnostic Molecular Pathology* **10**(2): 130–137.
- Arciola, C.R., Campoccia, D., Gamberini, S., Donati, M.E., Montanaro, L. (2004). Presence of fibrinogen-binding adhesin gene in *Staphylococcus epidermidis* isolates from central venous catheters-associated and orthopaedic implant-associated infections. *Biomaterials* **25**(19): 4825–4829.
- Arciola, C.R., Campoccia, D., Speziale, P., Montanaro, L., Costerton, J.W. (2012). Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm resistant materials. *Biomaterials* **33**(26): 5967–5982.
- Bal, Ç., Aydın, M.D., Ang, Ö. (1997). Tıp personelinde stafilokok kolonizasyonu. *İnfeksiyon Dergisi* **11**: 237–242.
- Barber, M. (1961). Methicillin-resistant staphylococci. *Journal of Clinical Pathology* **14**: 385–393.
- Barrosa, E.M., Ceottob, H., Bastosb, M.C.F., Santos, K.R.N., Giambiagide Marval, M. (2012). *Staphylococcus haemolyticus* as an important hospital pathogen and carrier of methicillin resistance genes. *Journal of Clinical Microbiology* **50**(1): 166–168.
- Bayraktar, B., Borsa, B., Bulut, E. (2007). Kateter ile ilişkili enfeksiyonlarda kateter uçlarından izole edilen mikroorganizmlar ve antibiyotiklere dirençleri. *ANKEM Dergisi* **21**(1): 46–49.

- Bhargava, K., Zhang, Y. (2014). Characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRCoNS) in retail meat. *Food Microbiology* **42**: 56–60.
- Bignardi, G.E., Woodford, N., Chapman, A., Johnson, A.P., Speller, D.C. (1996). Detection of the *mecA* gene and phenotypic detection of resistance in *Staphylococcus aureus* isolates with borderline or low-level methicillin resistance. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **37**(1): 53–63.
- Bouchami, O., Hassen, A.B., Lencastre, H., Miragaia, M. (2012). High prevalence of *mec* complex C and *ccrC* is independent of SCC*mec* type V in *Staphylococcus haemolyticus*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **31**(4): 605–614.
- Boutiba-Ben Boubaker, I., Ben Abbes, R., Ben Abdallah, H., Mamlouk, K., Mahjoubi, F., Kammoun, A., Hammami, A., Ben Redjeb, S. (2004). Evaluation of cefoxitin disk diffusion test for the routine detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection* **10**(8): 762–765.
- Büttner, H., Mack, D., Rohde, H. (2015). Structural basis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation: mechanisms and molecular interactions. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **5** (14): 1-15.
- Can, B., Aydın, S., Öngen, B., Gürler, N. (2005). Kateter örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antimikrobik maddelere direnç durumları. *ANKEM Dergisi* **19**(1): 22–24.
- Cargill, S.J., Upton, M. (2009). Low concentrations of vancomycin stimulate biofilm formation in some clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Journal Clinical of Pathology* **62**: 1112–1116.

- Cauwelier, B., Gordts, B., Descheemaeker, P., Van Landuyt, H. (2004). Evaluation of disk diffusion method with cefoxitin (30 microgram) for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **23**: 389–392.
- Cavassini, M., Wenger, A., Jaton, K., Blanc, D.S., Bille, J. (1999). Evaluation of MRSA-screen, a simple anti-PBP2a slide latex agglutination kit, for rapid detection of methicillin resistance *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* **37**(5): 1591–1594.
- Ceri, H., Olson, M.E., Stremick, C., Read, R.R., Morck, D., Buret, A. (1999). The Calgary Biofilm Device: a new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *Journal of Clinical Microbiology* **37**(6): 1771–1776.
- Chambers, H.F. (1997). Methicillin resistance in staphylococci: Molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clinical Microbiology Reviews* **10**: 781–791.
- Chandra, J., Kuhn, D.M., Mukherjee, P.K., Hoyer, L.L., McCormick, T., Ghannoum, M.A. (2001). Biofilm Formation by the Fungal Pathogen *Candida albicans*: Development, Architectur, and Drug Resistance. *Journal of Bacteriology* **183**(18): 5385–5394.
- Christensen, G.D., Simpson, W.A., Bisno, A.L., Beachey, E.H. (1982). Adherence of slime producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surfaces. *Infection and Immunity* **37**(1): 318–326.
- Cleri, D., Corrado, M., Seligman, S. (1980). Quantitative culture of intravenous catheters and other intravascular inserts. *The Journal of Infectious Diseases* **14** (Suppl 6): 781–786.

- Clinical and Laboratory Standards Institute (2014). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twenty-fourth Informational Supplement, CLSI Document M100-S24, CLSI, Wayne PA.
- Coenye, T., De Prijck, K., Nailis, H., Nelis, H.J. Prevention of *Candida albicans* Biofilm Formation. (2011). *The Open Mycology Journal* **5**: 9–20.
- Costa, A.R., Henriques, M., Oliveira, R., Azeredo, J. (2009). The role of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) in *Staphylococcus epidermidis* adhesion to host tissues and subsequent antibiotic tolerance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **28**(6): 623–629.
- Costerton, J.W., Geesey, G.G., Cheng, K.J. (1978). How bacteria stick. *Scientific American* **238**(1): 86–95.
- Costerton, J.W., Lewondowski Z., Coldwell D.E., Korber, D.R, Lappin-Scoott, H.M. (1995). Microbial biofilms. *Annual review of microbiology* **49**: 711–745.
- Costerton, J.W., Montanaro L, Arciola CR. (2005). Biofilm in implant infections: its production and regulation. *The International journal of artificial organs* **28**(11): 1062–1068.
- Costerton, J.W., DeMeo, P. (2011). Discussion. The role of biofilms: are we hitting the right target? *Plastic and Reconstructive Surgery* **127** Suppl 1: 36S-37S.
- Cramton, S.E., Gerke, C., Schnell, N.F., Nicholson, W.W., Götz, F. (1999). The intercellular adhesion (*ica*) locus is present in *Staphylococcus aureus* and is required for biofilm formation. *Infection and Immunity* **67**(10): 5427–5433.

Çelik, İ., Cihangiroğlu, M., Sevim E., Çabalakü M., Akbulut, A. (2005). Sağlık çalışanlarının burunlarından izole edilen koagülaz pozitif ve negatif stafilocoklarda metisilin direnci ve slime pozitifliği. *Fırat Tıp Dergisi* **10**(3): 123–126.

Damar içi kateter enfeksiyonlarının önlenmesi ve kontrolü. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitim Etkinlikleri (2008). Hastane Enfeksiyonları: Koruma ve Kontrol sempozyum dizisi no: 6079-6088.

Davenport, D.S., Masanari, K.M., Pfaller, M.A., Bae, M.J., Streed, S.A., Hierholzer, W.S. (1986). Usefulness of a test for slime production as a marker for clinically significant infections with coagulase negative staphylococci. *The Journal of Infectious Diseases* **153** (2): 332–339.

Delialioğlu, N., Aslan G., Öztürk, C., Vildan, B., Şen, S., Emekdaş, G. (2005). Inducible clindamycin resistance in staphylococci isolated from clinical samples. *Japanese Journal of Infectious Disease*, **58** (2): 104- 106.

Derbentli, Ş. (2002). Hastane infeksiyonlarının epidemiyolojisinde moleküler yöntemlerin yeri. *İnfeksiyon Hastalıklarının Laboratuvar Tanısında Moleküler Yöntemleri Kitabı*'nda (ed. A. Ağaçfıdan, S. Badur, S. Türkoğlu). s: 6–13, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti yayın: İstanbul

Diemond-Hernández, B., Solórzano-Santos, F., Leños-Miranda, B., Peregrino-Bejarano, L., Miranda-Novales, G. (2010). Production of *icaADBC*-encoded polysaccharide intercellular adhesin and therapeutic failure in pediatric patients with Staphylococcal device-related infections. *BMC Infectious Disease* **10**: 68.

Donlan, R.M., Costerton, J.W. (2002). 'Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* **15**(2): 167–193.

- Donlan, R.M. (2002). "Biofilms: Microbial life on surfaces". *Emerging Infectious Disease* **8**: 881–890.
- Dubrovin, E.V., Fedyunika, G.N., Kraevsky, S.V., Ignatyuk, T.E., Yaminsky, I.V., Ignatov S.G. (2012). AFM Specific Identification of Bacterial Cell Fragments on Biofunctional Surfaces. *The Open Microbiology Journal* **6**: 22–28.
- Dündar, V., Dündar, D.Ö. (2008). Stafilokok enfeksiyonları. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi (3. Baskı) kitabında. (ed AW. Topçu, G. Söyletir, M. Doğanay). s: 2065–2077, Nobel Tıp Kitabevi: İstanbul.
- Eggimann, P., Pittet, D. (2002). Overview of catheter-related infections with special emphasis on prevention based on educational programs. *Clinical Microbiology and Infection* **8**(5): 295–309.
- Ehrlich, G.D., Ahmed, A., Earl, J., Hiller, N.L., Costerton, J.W., Stodley, P., Post, J.C., Demeo, P., Hu F.Z.(2010). The Distributed Genome Hypothesis as a Rubric for Understanding Evolution in situ During Chronic Infectious Processes. *FEMS immunology and medical microbiology* **59**(3): 269–279.
- El-Azizi, M., Rao, S., Kanchanapoom, T., Khardori, N. (2005). In vitro activity of vancomycin, quinupristin/dalfopristin and linezolid against intact and disrupted biyofilms of staphylococci. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials* **4**: (2) 1-9.
- Favre, B., Hugonnet, S., Correa, L., Sax, H., Rohner, P., Pittet, D. (2005). Nosocomial bacteremia: Clinical significance of a single blood culture positive for coagulase negative staphylococci. *Infection Control Hospital and Epidemiology* **26**(8): 697–702.

- Felten, A., Grandy, B., Lagrange, P.H., Casin, I. (2002). 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. *Journal of Clinical Microbiology* **40**(8): 2766–2771.
- Ferreira, R.B.R., Iorio, N.L.P., Malvar, K.L., Nunes, A.P.F., Fonseca, L.S., Bastos C.C.R, Santos, K.R.N. (2003). Coagulase-negative staphylococci: Comparison of phenotypic and genotypic oxacillin susceptibility tests and evaluation of the agar screening test by using different concentrations of oxacillin. *Clinical Microbiology*, **41**(8): 3609–3614.
- Fiebelkorn, K.R., Crawford, S.A., Elmeel, M.L., Jorgensen, J.H. (2003). Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative Staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology* **41**(10): 4740- 4744.
- Flowers, R.H., Schwenzer, K.J., Kopel, R.F., Fisch, M.J., Tucker, S.I., Farr, B.M. (1989). Efficacy of an attachable subcutaneous cuff for the prevention of intravascular catheter-related infection. A randomized, controlled trial. *Journal of the American Medical Association (JAMA)* **261**(6): 878–883.
- Francois, P., Vaudaux, P., Foster, T.J., Lew, D.P. (1996). Host–bacteria interactions in foreign body infections. *Infection Control and Hospital Epidemiology* **17**(8): 514–520.
- Francois, P., Renzi, G., Pittet, D., Bento, M., Lew, D., Harbarth, S., Vausaux, P., Schrenzel, J. (2004). A novel multiplex real-time PCR assay for rapid typing of major staphylococcal cassette chromosome mec elements. *Journal of Clinical Microbiology* **42**(7): 3309–3312.

- Frank, K.L., Patel, R. (2007). Poly-N-acetylglucosamine is not a major component of the extracellular matrix in biofilms formed by *icaADBC*-positive *Staphylococcus lugdunensis* isolates. *Infection and Immunity* **75**(10): 4728–4724.
- Frank, K.L., Reichert, E.J., Piper, K.E., Patel, R. (2007). In vitro effects of antimicrobial agents on planktonic and biofilm forms on *Staphylococcus lugdunensis* clinical isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51**(3): 888–895.
- Freeman, D.J., Falkiner, F.R., Keane, C.T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology* **42**: 872–874.
- Gad, G.F., El-Feky, M.A., El-Rehewy, M.S., Hassan, M.A., Abolella, H., El-Baky, R.M. (2009). Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. *Journal of Infection in Developing Countries* **3**(5): 352–351.
- Gardiner, K. (1991). Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Analytical Chemistry* **63**(7): 658–665.
- Gatermann, S.G., Koschinski, T., Friedrich, S. (2007). Distribution and expression of macrolide resistance genes in coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology and Infection* **13**(8): 777–781.
- Geffers, C., Gastmeier, P. (2011). Nosocomial infections and multidrug-resistant organisms in Germany: epidemiological data from KISS (the Hospital Infection Surveillance System). *Deutsches Ärzteblatt international* **108**(6): 87–93.

- Geha, D.J., Uhl, J.R., Gustaferrero, C.A., Persing, D.H. (1994). Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology* **32**(7): 1768–1772.
- Gerke, C., Kraft, A., Süssmuth, R., Schweitzer, O., Götz, F. (1998). Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the *Staphylococcus epidermidis* polysaccharide intercellular adhesin. *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 18586–18593.
- Goering, R.V., Tenover, F.C. (1997). Epidemiological interpretation of chromosomal macro-restriction fragment patterns analyzed by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* **35**(9): 2432–2433.
- Goering, R.V. (2006). Pulsed Field Gel Electroforesis: Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamaları kitabında. (ed. DH. Persing, FC. Tenover, J. Versalovic, Y. Tang, E. Unger, DA. Relman, TJ. White; çeviri ed. A. Tekeli ve Ş. Ustaçelebi) s. 185–223. Palme Yayıncılık: Ankara.
- Gönüllü, N., Karaköse, A.R., Çatal, F., Küçükbaşmacı, Ö., Altinkum, S., Torun, M.M. (2009). Klinik örneklerden izole edilen stafilocok suşlarının makrolid ve linkozamid direnç fenotipleri. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* **39** (1-2): 12-15
- Götz, F. (2002). Staphylococcus and biofilms. *Molecular Microbiology* **43**(6): 1367–1378.
- Gür, D. (2008). Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi kitabında (ed. AW. Topçu, G. Söyletir, M. Doğanay) s. 243–257 Nobel Tıp Kitabevleri: İstanbul.
- Hanssen, A.M., Ericson Sollid, J.U. (2006). SCCmec in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **46**(1):8–20.

- Hiramatsu, K., Katayama, Y., Yuzawa, H., Ito, T. (2002). Molecular genetics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology* **292**(2): 67–74.
- Hatipoğlu Ataman, Ç., İpekkan, K., Oral, B., Önde, U., Bulut, C., Demiröz, A. (2011). Yoğun bakım ünitelerinde gelişen kateter ile ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarının tanısında kullanılan yöntemlerin değerlendirilmesi. *Mikrobiyoloji Bülteni* **45**(1): 75–85.
- Hawser, S.P., Douglas, L.J. (1994). Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infection and Immunity* **62**(3): 915–921.
- Heilmann, C., Schweitzer, O., Gerke, C., Vanittanakom, N., Mack, D., Götz, F. (1996). Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Molecular Microbiology* **20**(5): 1083–1091.
- Henderson DK. (2005). Infections caused by percutaneous intravascular devices. In: Principles and Practice of Infectious Diseases 6th ed. (ed. GL. Mandell, JE. Bennett, R. Dolin). pp.3347–62, Churchill-Livingstone Inc: Philadelphia.
- Hidron, A.I., Edwards, J.R., Patel, J., Horan, T.C., Sievert, D.M., Pollock, D.A., Fridkin, S.K. (2008). National Healthcare Safety Network Team; Participating National Healthcare Safety Network Facilities. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. *Infection Control and Hospital Epidemiology* **29**(11): 996–1011.
- Hood, S.K., Zottola, E.A. (1997). Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model food systems. *International Journal Food of Microbiology* **37**(2–3): 145–153.

- Hoyle, B.D., Jass, J., Costerton, J.W. (1990). The biofilm glycocalyx as a resistance factor. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **26**(1): 1–5.
- Hussain, M., Wilcox, M.H., White, P.J. (1993). The slime of coagulase-negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiology Letters* **10** (3–4): 191–207.
- Ibrahim, S., Salmenlinna, S., Virolainen, A., Kerttula, A.M., Lyytikäinen, O., Jägerroos, H., Broas, M., Vuopio-Varkila, J. (2009). Carriage of methicillin-resistant Staphylococci and their SCCmec types in a long-term-care facility. *Journal of Clinical Microbiology* **47**(1): 32–37.
- International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC) (2009). Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53**(12):4961–4967.
- Ito, T., Katayama, Y., Asada, K., Mori, N., Tsutsumimoto, K., Tiensasitorn, C., Hiramatsu, K. (2001). Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome in methicillin resistant *Staphylococcus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45**: 1323–1336.
- Ito, T., Okuma, K., Ma, X.X., Yuzawa, H., Hiramatsu, K. (2003). Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy* **6**(1): 41–52.
- Ito, T., Ma, X.X., Takeuchi, F., Okuma, K., Yuzawa, H., Hiramatsu, K. (2004). Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, *ccrC*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 2637–2651.

- Jukes, L., Mikhail, J., Bome-Mannathoko, N., Hadfield, S.J., Harris, L.G., El-Bouri, K., Davies, A.P., Mack, D. (2010). Rapid differentiation of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci and meticillin susceptibility testing directly from growth-positive blood cultures by multiplex real-time PCR. *Journal of medical microbiology* **59**: 1456–1461.
- Kitao, T., Ishimaru, M., Nishihara, S. (2010). Detection of biofilm-producing and methicillin resistance genes in *Staphylococcus epidermidis* isolated from healthy humans and in blood culture tests. *Journal of Infection and Chemotherapy: Official Journal of The Japan Society of Chemotherapy* **16**(3): 170–173.
- Knobloch, J.K., Horstkotte, M.A., Rohde, H., Mack, D. (2002). Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Medical Microbiology and Immunology* **191**(2): 101–106.
- Kondo, Y., Ito T., Ma, X.X., Watanabe, S., Kreiswirth, B.N., Etienne, J., Hiramatsu, K. (2007). Combination of multiplex PCRs for Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr* and major differences in junkyard regions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51**(1): 264–274.
- Kozitskaya, S., Seung-Hak, C.H., Dietrich, K., Marre, R., Naber, K., Ziebuhr, W. (2004). The bacterial insertion sequence element IS256 occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* isolates: association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides. *Infection and Immunity* **72**(2): 1210–1215.
- Köksal, F., Yaşar, H., Samasti, M. (2009). Antibiotic resistance patterns of coagulase-negative staphylococcus strains isolated from blood cultures of septicemic patients in Turkey. *Microbiological Research* **164**(4): 404–410.

- Labbate, M., Queck, S.Y., Koh, K.S., Rice S.A., Givskov M., Kjelleberg S. (2004). Quorum Sensing-Controlled Biofilm Development in *Serratia liquefaciens* MG1 Maurizio. *Journal of Bacteriology* **186**(3): 692–698.
- Lappin-Scott, H., Bass, C. (2001). Biofilm formation: attachment, growth, and detachment of microbes from surfaces. *American Journal of Infection Control* **29**(4): 250–251.
- Lencestre, H., Figueiredo, A.M.S., Urban, C., Rahal, J., Tomasz, A. (1991). Multiple mechanisms of methicillin resistance and improved methods for detection in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35**(4): 632–639.
- Lerbech, A.M., Opintan, J.A., Bekoe, S.O., Ahiabu, M.A., Tersbøl, B.P., Hansen, M., Brightson, K.T., Ametepeh, S., Frimodt-Møller, N., Styrihave, B. (2014). Antibiotic exposure in a low-income country: screening urine samples for presence of antibiotics and antibiotic resistance in coagulase negative staphylococcal contaminants. *PloS One* **2**;9(12):1-18.
- Liberto, M.C., Matera, G., Quirino, A., Lamberti, A.G., Capicotto, R., Puccio, R., Barreca, G.S., Focà, E., Cascio, A., Barreca, G.S., Focà, A. (2009). Phenotypic and genotypic evaluation of slime production by conventional and molecular microbiological techniques. *Microbiological Research* **164**(5): 522–528.
- Loulergue J., de Gialluly, C., Morange, V., Holstein, A., van der Mee-Marquet, N., Quentin, R. (2006). Evaluation of a new chromogenic medium for isolation and presumptive identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from human clinical specimens. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **25**(6): 407–409.

- Ma, X.X., Ito, T., Tiensasitorn, C., Jamklang, M., Chongtrakool, P., Vavra, S.B., Daum, R.S., Hiramatsu, K. (2002). Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* identified in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**: 1147–1152.
- Mack, D., Davies, A.P., Harris, L.G., Knobloch, J.K., Rohde, H. (2009). *Staphylococcus epidermidis* biofilms: functional molecules, relation to virulence, and vaccine potential. *Topics in Current Chemistry* **288**: 157–182.
- Mack, D., Siemssen, N., Laufs, R. (1992). Parallel induction by glucose of adherence and a polysaccharide antigen specific for plastic-adherent *Staphylococcus epidermidis*: evidence for functional relation to intercellular adhesion. *Infection and Immunity* **60**(5): 2048–2057.
- Mack, D., Nedelmann, M., Krokotsch, A., Schwarzkopf, A., Heesemann, J., Laufs, R. (1994). Characterization of transposon mutants of biofilm-producing *Staphylococcus epidermidis* impaired in the accumulative phase of biofilm production: genetic identification of a hexosamine-containing polysaccharide intercellular adhesin. *Infection and Immunity* **62**(8): 3244–3245.
- Mack, D., Haeder, M., Siemssen, N., Laufs, R. (1996). Association of biofilm production of coagulase-negative staphylococci with expression of a specific polysaccharide intercellular adhesin. *The Journal of Infectious Diseases* **174**(4): 881–884.
- Maki, D.G., Weise, C.E., Sarafin, H.W. (1977). A semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *The New England Journal of Medicine* **296**(23): 1305–1309.

- Maki, D.G., Kluger, D.M., Crnich, C.J. (2006). The risk of bloodstream infection in adults with different intravascular devices: a systematic review of 200 published prospective studies. *Mayo Clinic Proceedings* **81**(9): 1159–1171.
- Maki, D.G. (1994). Infections caused by intravascular devices used for infusion therapy: pathogenesis, prevention, and management. In *Infections associated with indwelling medical devices*, 2nd. (ed.. AL. Bisno and FA. Waldovogel). pp. 155–212, American Society for Microbiology, Washington, D.C. ASM Pres: United States.
- Martins, A., Cunha, M.R.S. (2007). Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. *Microbiology and Immunology* **51**(9):787–795.
- Marsik, F.J. Antimicrobial susceptibility testing in *Textbook of Diagnostic Microbiology* 4th. (ed. Mahon, C.R., Lehman, D.C., Manuselis, G.) pp. 272-315. W.B. Saunders Company, China.
- Mathur, T., Bhateja, P., Pandya, M., Fatma, T., Rattan, A. (2004). In vitro activity of RBx 7644 (ranbezolid) on biofilm producing bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents* **24**(4): 369–373.
- McKenney, D., Pouliot, K.L., Wang, Y., Murthy, V., Ulrich M., Döring G., Lee J.C., Goldmann D.A., Pier, G.B. (1999). Broadly protective vaccine for *Staphylococcus aureus* based on an in vivo expressed antigen. *Science* **284**(5419): 1523–1527.
- Melchior, M.B., Fink-Gremmels, J., Gaastra, W. (2006). Comparative assessment of the antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in biofilm versus planktonic culture. *Journal of Veterinary Medicine Series B* **53**(7): 326–332.

- Mermel, L.A., Farr, B.M., Sherertz, R.J., Raad, I.I., O'Grady, N., Harris, J.S., Craven, D.E. (2001). Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections. *Clinical Infectious Disease* **32**: 1249–1272.
- Mermel, L.A., Allon, M., Bouza, E., Craven, D.E., Flynn, P., O'Grady, N., Issam, I., Raad, I.I., Rijnders, B.J.A., Sherertz, R.J., Warren, D.K. (2009). Clinical practise guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infections: 2009 update by the Infectious Disease Society of America. *Clinical Infectious Disease* **49**(1): 1–45.
- Mermel, L.A. (2011). What is the predominant source of intravascular catheter infections? *Clinical Infectious Disease* **52**(2): 211–212.
- Mert, G., Kılıç, A., Bedir, O., Başustaoglu, A.C. (2011). Clinical significance and staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures. *Turkish Journal of Medical Sciences* **41** (5): 859–865.
- Mombach Pinheiro Machado, A.B., Reiter, K.C., Paiva, R.M., Barth, A.L. (2007). Distribution of staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) types I, II, III and IV in coagulase-negative staphylococci from patients attending a tertiary hospital in southern Brazil. *Journal of Medical Microbiology* **56** (Pt 10): 1328–1333.
- Montanaro, L., Campoccia, D., Pirini, V. (2007). Antibiotic multiresistance strictly associated with IS256 and *ica* genes in *Staphylococcus epidermidis* strains from implant orthopedic infections. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **83**(3): 813–818.

- Moretro, T., Hermansen, L., Holck, A.L., Sidhu, M.S., Rudi, K., Langsrud, S. (2003). Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among staphylococci from food and food processing environments. *Applied and Environmental Microbiology* **69**(9): 5648–5655.
- National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992-April 2000, issued June 2000. (2000). *American Journal of Infection Control* **28**: 429–48.
- Noble, M.A., Grant, S.K., Hasen, E. (1990). Characterization of a neutrophil inhibitory factor from clinically significant *Staphylococcus epidermidis*. *The Journal of Infectious Diseases* **162**(4): 909–913.
- Novick, R.P., Muir, W.M. (1999). Virulence gene regulation by peptides in staphylococci and other Gram-positive bacteria. *Current Opinion in Microbiology* **2**(1): 40–45.
- O’Gara, J.P., Humphreys, H. (2001). *Staphylococcus epidermidis* biofilms: importance and implications. *Journal of Medical Microbiology* **50**(7): 582–587.
- O’Grady, N.P., Alexander, M., Dellinger, E.P., Gerberding, J.L., Heard, S.O., Maki, D.G., Masur, H., McCormick, R.D., Mermel, L.A., Pearson, M.L., Raad, I.I., Randolph, A., Weinstein, R.A. (2011). CDC Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *Morbidity and Mortality Weekly Report Recommendations and Reports* **14**: 1–29.
- Onurdağ F.K., Özgen, S., Abbasoğlu, U., Gürcan, İ.S. (2010). *Candida* türlerinin biyofilm oluşturan ve planktonik formlarının antifungal ajanlara karşı duyarlılıklarının araştırılmasında iki farklı yöntemin karşılaştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni* **44**(4): 619–631.

- Oufriid, S., Ghazlane, Z., Jamali, L., Otmani, F.E., Talmi, M., Elmdaghri, N., Zerouali, K., Timinouni, M. (2015). Correlation between staphylococcal biofilm formation in vitro and potential for catheter-related infections. *The Journal of Infection in Developing Countries* 9(4): 368–372.
- Özel, G., Aslan, V., Bahar Erdem, G., Çağatay, M., Sencan, I., Mert, A. (2011). Comparison of oxacillin, cefoxitin, ceftizoxime, and moxalactam disk diffusion methods for detection of methicillin susceptibility in staphylococci. *Mikrobiyoloji Bülteni* 45(2): 258–265.
- Özen, N.S., Dağlar, D., Özhak Baysan, B., Yıldırım, Ç., Yazısız, H., Ögünç, D., Öngüt, G., Çolak, D., Gültekin, M. (2011). Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının saptanmasında MRSA ID kromojenik besiyerinin değerlendirilmesi. *Ankem Dergisi* 25(1): 31–34.
- Öztürk, R. (2003). Damar içi kateterlere bağlı infeksiyonlar ve korunma. In: Doğanay M, Ünal S, eds. Hastane infeksiyonları. *Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi* 489–517.
- Palazzo, I.C.V., Rehder, A., Darini, A.L.C. (2007). Quantitative disk diffusion as a convenient method for determining minimum inhibitory concentrations of oxacillin for staphylococci strains. *Journal of Microbiological Methods* 71(3): 186–190.
- Pantenella, F., Valenti, P., Frioni, A., Natalizi, T., Coltella, L., Berlutti, F. (2008). BioTimer Assay, a new method for counting *Staphylococcus* spp. in biofilm without sample manipulation applied to evaluate antibiotic susceptibility of biofilm. *Journal of microbiological methods* 75(3): 478–484.

- Pantenella, F., Valenti, P., Natalizi, T., Passeri, D., Berlutti, F. (2013). Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Annali di Igiene: Medicina Preventiva e di Comunità* **25**(1): 31–42.
- Peacock, S.J., Paterson, G.K. (2015). Mechanisms of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annual Review of Biochemistry* **84**: 577–601.
- Peeters, E., Nelis, H.J., Coenye, T. (2008). Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *Journal of Microbiological Methods* **72**(2): 157–165.
- Penel, N., Neu, J.C., Clisant, S., Hoppe, H., Devos, P., Yazdanpanah, Y. (2007). Risk factors for early catheter-related infections in cancer patients. *Cancer* **110**(7): 1586–1592.
- Pişkin, N., Aydemir, H., Akduman, D., Çelebi, G., Öztoprak, N., Akkoyunlu, Y., Külâh, C. (2008). İntravasküler kateter ilişkili kan dolaşım enfeksiyonlarının incelenmesi. *ANKEM Dergisi* **22**(1): 10–13.
- Pittet, D., Li, N., Woolson, F., Wenzel, R.P. (1997). Microbiological factors influencing the outcome of nosocomial bloodstream infections: A 6-year validated population based model. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* **24**(6): 1068–1078.
- Polderman, K.H, Girbes, A.R. (2002). Central venous catheter use. Part 2. Infectious complications. *Intensive Care Medicine* **28**(1): 18–28.
- Post, J.C., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., Ehrlich, G.D. (2004). The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery* **12**(3): 185–190.

- Raad, I., Luna, M., Khalil, S.A., Costerton, J.W., Lam C., Bodey, G.P. (1994). The relationship between the thrombotic and infectious complications of central venous catheters. *Journal of the American Medical Association (JAMA)* **271**(13): 1014–1016.
- Raad, I., Hana, H., Maki, D. (2007). Intravascular catheter-related infections: Advances in diagnosis, prevention and management. *The Lancet Infectious Disease* **7**(10): 645–657.
- Rachid, S., Ohlsen, K., Witte, W., Hacker, J., Ziebuhr, W. (2000). Effect of Subinhibitory Antibiotic Concentrations on Polysaccharide Intercellular Adhesin Expression in Biofilm-Forming *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**(12): 3357–3363.
- Raffa, R.B., Iannuzzo, J.R., Levine, D.R., Saeid, K.K., Schwartz, R.C., Sucic, N.T., Terleckyj, O.D., Young, J.M. (2005). Bacterial communication ("Quorum Sensing") via ligands and receptors: a novel pharmacologic target for the design of antibiotic drugs. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **312**(2): 417–423.
- Rasmussen, T.B., Givskov, M. (2006). Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM* **296** (2–3):149–161.
- Reiter, K.C., Da Silva Paim, T.G., Oliveira, C.F., D’azevedo, P.A. (2011). High biofilm production by invasive multiresistant staphylococci. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* **119**(11): 776–781.

- Riboli, D.F., Lyra, J.C., Silva, E.P., Valadão, L.L., Bentlin, M.R., Corrente, J.E., Rugolo, L.M., da CunhaMde, L. (2014). Diagnostic accuracy of semi-quantitative and quantitative culture techniques for the diagnosis of catheter related infections in new born and molecular typing of isolated microorganisms. *BMC Infectious Disease* **22**(14): 283.
- Rice, L.B., Sahm, D., Bonomo, R.A. (2003). Mechanism of resistance to antimicrobial agents. In: Manual of Clinical Microbiology 8th Ed. (ed. PR. Murray, EJ. Baron, JH. Jorgensen, MA. Pfaller, RH. Tenover, PC. Tenover) pp. 1074–1101. Washington DC, ASM Pres: United States.
- Rice, L.B. (2006). Antimicrobial resistance in gram-positive bacteria. *The American journal of medicine* **119** (6; Suppl 1): S11–19.
- Rijnarts, H.M., Norde, W., Bouwer, E.J., Lyklema, J., Zehnder, A.B. (1993). Bacterial adhesion under static and dynamic conditions. *Applied and Environmental Microbiology* **59** (10): 3255- 3265.
- Rosenthal, V.D., Maki, D.G., Mehta, Y., Leblebicioglu, H., Memish, Z.A., Al-Mousa H.H., Balkhy, H., Hu, B., Alvarez-Moreno, C., Medeiros, E.A., Apisarnthanarak, A., Raka L., Cuellar, L.E., Ahmed, A., Navoa-Ng, J.A., El-Kholy, A.A., Kanj, S.S., Bat-Erdene, I., Duszynska, W., Van Truong, N., Pazmino, L.N., See-Lum, L.C., Fernández-Hidalgo, R., Di-Silvestre, G., Zand, F., Hlinkova, S., Belskiy, V., Al-Rahma, H., Luque-Torres, M.T., Bayraktar, N., Mitrev, Z., Gurskis, V., Fisher, D., Abu-Khader, I.B., Berechid, K., Rodríguez-Sánchez, A., Horhat F.G., Requejo-Pino, O., Hadjieva, N., Ben-Jaballah, N., García-Mayorca, E., Kushner-Dávalos, L., Pasic, S., Pedrozo-Ortiz, L.E., Apostolopoulou, E., Mejía, N., Gamar-Elanbya, M.O., Jayatilleke, K., de Lourdes-Dueñas, M., Aguirre-Avalos, G. (2014). International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary of 43 countries for 2007–2012. Device-associated module. *American Journal of Infection Control* **42**(9): 942–956.

- Rupee, E., Barbier, F., Mesli, Y., Maiga, A., Cojocaru, R., Benkhalfat, M., Benchouk, S., Hassaine, H., Maiga, I., Diallo, A., Koumare, A.K., Outtara, K., Soumare, S., Dufourcq, J.B., Nareth, C., Sarthou, J.L., Antoine Andremont, A., Ruimy, R. (2009). Diversity of staphylococcal cassette chromosome *mec* structures in methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus* strains among outpatients from four countries. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53**(2): 442–449.
- Ruzicka, F., Hola, V., Votava, M., Tejkalova, R., Horvat, R., Heroldova, M., Woznicova, V. (2004). Biofilm detection and the clinical significance of *Staphylococcus epidermidis* isolates. *Folia Microbiologica* **49**: 596–600.
- Saraçlı, M.A. (2006). "Quorum sensing": mikroorganizmalar iletişim mi kuruyor? *Gülhane Tıp Dergisi* **48**: 244–250.
- Seifert, H., Jansen, B., Widmer, A.F., Farr, B.M. (2005). Central-Venous Catheters. In: Catheter-Related Infections. 2th (ed H. Seifert, B. Jansen, B.M. Farr), pp:293–326. Marcel Dekker: New York.
- Schmitz, F.J., Petridou, A.C., Fluit, U., Hadding, G.P., Von, E.C. (2000). Distribution of macrolide-resistance genes in *Staphylococcus aureus* blood-culture isolates from fifteen German university hospitals. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of The European Society of Clinical Microbiology* **19**(5): 385- 387.
- Shuford, J.A., Piper, K.E., Steckelberg, J.M., Patel, R. (2007). In vitro biofilm characterization and activity of antifungal agents alone and in combination against sessile and planktonic clinical *Candida albicans* isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **57**(3): 277–281.

- Siegman-Igra, Y., Anglim, A.M., Shapiro, D.E., Adal, K.A., Strain, B.A., Farr, B.M. (1997). Diagnosis of catheter-related bloodstream infection: a meta-analysis. *Journal of Clinical Microbiology* **35**(4): 928–936.
- Silva, G.D.I., Kantzanou, M., Justice, A., Massey, R.C., Wilkinson, A.R., Day, N.P.J., Peacock, S.J. (2002). The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *Journal of Clinical Microbiology* **40**(2): 382–388.
- Singh, A., Goering, R.V., Simjee, S., Foley, S.L., Zervos, M.J. (2006). Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. *Journal of Clinical Microbiology* **19**(3): 512–30.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Hola, V., Bonaventura, G., Djukic, S., Cirkovic, I., Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS: Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica* **115**(8): 891–899.
- Stewart, P.S., Hamilton, M.A., Goldstein, B.R., Schneider, B.T. (1996). Modeling biocide action against biofilms. *Biotechnology and Bioengineering* **49**(4):445–455.
- Stewart, P.S. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International Journal of Medical Microbiology: IJMM* **292**(2): 107–113.
- Stoakes, L., Reyes, R., Daniel, J., Lennox, G., John, M.A., Lannigan, R., Hussain, Z.(2006). Prospective comparison of a new chromogenic medium, MRSA Select, to CHROMagar MRSA and mannitol-salt medium supplemented with oxacillin or cefoxitin for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* **44**(2): 637–639.

- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology* **56**: 187–209.
- Stoodley, P., Ehrlich, G.D., Sedghizadeh, P.P., Hall-Stoodley, L., Baratz, M.E., Altman, D.T., Sotereanos, N.G., Costerton, J.W., Demeo, P. (2011). Orthopaedic biofilm infections. *Current Orthopaedic Practice* **22**(6): 558–563.
- Sutherland, I. (2001). Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework. *Microbiology* **147** (Pt 1): 3–9.
- Swenson, J.M., Lonsway, D., McAllister, S., Thompson, A., Jevitt, L., Zhu, W., Patel, J.B.(2007). Detection of *mecA*-mediated resistance using reference and commercial testing methods in a collection of *Staphylococcus aureus* expressing borderline oxacillin MICs. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **58**(1): 33–39.
- Swenson, J.M., Tenover, F.C. Cefoxitin Disk Study Group.(2005). Result of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. *Journal of Clinical Microbiology* **43**(8): 3818–3823.
- Swenson, J.M., Tenover, F.C. Cefoxitin Disk Study Group. (2005). Result of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. *Journal of Clinical Microbiology* **43**(8): 3818–3823.
- Swenson, J.M., Patel, J.B., Jorgensen, J.H. (2011) Special phenotypic methods for detecting antibacterial resistance. In: Manual of Clinical Microbiology 10 ed., vol 1, chapter 70 (ed. J.Versalovic, KC. Carroll, G. Funke, JH. Jorgensen, ML. Landry), 1155-1179. ASM Press: Washington DC.

- Swenson, J.M., Lonsway, D., McAllister, S., Thompson, A., Jevitt, L., Zhu, W., Patel, J.B. (2007). Detection of *mecA*-mediated resistance using reference and commercial testing methods in a collection of *Staphylococcus aureus* expressing borderline oxacillin MICs. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **58**(1): 33–39.
- Szczuka, E., Urbańska, K., Pietryka, M., Kaznowski, A. (2013). Biofilm density and detection of biofilm-producing genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Folia Microbiol (Praha)* **58**(1): 47–52.
- Tacconelli, E., Smith, G., Hieke, K., Lafuma, A., Bastide, P. (2009). Epidemiology, medical outcomes and costs of catheter-related bloodstream infections in intensive care units of four European countries: literature and registrybased estimates. *The Journal of Hospital Infection* **72**(2): 97-103.
- Tak, V., Mathur, P., Lalwani, S., Misra, M.C. (2013). Staphylococcal blood stream infections: epidemiology, resistance pattern and outcome at a level 1 Indian trauma care center. *Journal of Laboratory Physicians* **5**(1): 46–50.
- Tekeli, A., Koyuncu, E., Dolapçı, İ., Akın, A.A. ve Karahan, Z.C. (2009). Ankara Üniversitesi Hastanesinde 2002–2005 yılları arasında kan kültürlerinden izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının moleküler özellikleri. *Mikrobiyoloji Bülteni* **43**(1): 1–10.
- Telli, M., Sümerkan, B., Eşel, D. (2006). *Staphylococcus aureus*'ta metisilin direncinin belirlenmesinde sefoksitin disk, oksasilin disk, oksasilin agar tarama ve PBP2a lateks testlerinin karşılaştırılması, *İnfeksiyon Dergisi* **20**(2): 93–96.

- Uncu, H., Turunç, T., Torun, D., Demiroğlu, Y.Z., Arslan, H. (2004). *Aeromonas hydrophila*'nın neden olduğu katetere bağlı bir bakteriyemi. Olgu sunumu. *Flora* **9**(2): 150–153.
- Ünal, S. (2004). *Staphylococcus aureus*: Direnç mekanizmaları. Gram pozitif bakteri infeksiyonları Kitabı'nda (ed. S. Ulusoy, G. Usluer, S. Ünal). s. 23–38, Bilimsel Tıp Yayınevi: Ankara.
- Van Griethuysen, A., Pouw, M., van Leeuwen, N., Heck, M., Willemse, P., Buiting, A., Kluytmans, J. (1999). Rapid slide latex agglutination test for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* **37**(9): 2789–2792.
- Van Pett, K., Schurman, D.J., Smith, R.L. (1990). Quantitation and relative distribution of extracellular matrix in *Staphylococcus epidermidis* biofilm. *Journal of Orthopaedic Research* **8**(3): 321–327.
- Vasudevan, P., Nair, M.K., Annamalai, T., Venkitanarayanan, K.S. (2003). Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. *Veterinary Microbiology* **92**(1–2): 179–185.
- Velasco, D., del Mar Tomas, M., Cartelle, M., Beceiro, A., Perez, A., Molina, F., Moure, R., Villanueva, R., Bou, G. (2005). Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **55**(3): 379–382.
- Vincent, J.L., Bihari, D.J., Sutter, P.M., Bruining, H.A., White, J., Nicolas-Chanoin, M.H., Wolff, M., Spencer, R.C., Hemmer, M. (1995). The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) study. *Journal of the American Medical Association (JAMA)* **274**(8): 639–644.

- Vuong, C., Kocianova, S., Voyich, J.M., Yao, Y., Fischer, E.R., Deleo, F.R., Otto, M. (2004). A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion, and virulence. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 54881–54886.
- Watnick, P., Kolter, R. (2000). “Biofilm city of microbes”. *Journal of Bacteriology* **182** (10): 2675–2679.
- Wicox, M.H., Kite, P., Mills, K., Sugden, S. (2001). In situ measurement of linezolid and vancomycin concentrations in intravascular catheter-associated biofilm. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **47**(2): 171–175.
- Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S.M., Seifert, H., Wenzel, R.P., Edmond, M.B. (2004). Nosocomial blood stream infections in US hospitals: analysis of 24179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Diseases* **39**(3): 309–317.
- Wolcott, R., Dowd, S. (2011). The role of biofilms: are we hitting the right target? *Plastic and Reconstructive Surgery* **127** Suppl 1:28S-35S.
- Xu, Z., Shi, L., Alam, M.J., Lin, L., Yamasaki, S. (2008). Integron-bearing methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci in South China, 2001–2004. *FEMS Microbiology Letters* **278**(2): 223–230.
- Zhang, K., McClure, J.A., Elsayed, S., Louie, T., Conly, J.M. (2005). Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology* **43**(10): 5026–5033.

- Zhang, K., McClure, J.A., Elsayed, S., Conly, J.M. (2009). Novel staphylococcal cassette chromosome mec type, tentatively designated type VIII, harboring class A mec and type 4 ccr gene complexes in a Canadian epidemic strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53**(2):531–540.
- Ziebuhr, W., Heilmann, C., Götz, F., Meyer, P., Wilms, K., Straube, E., Hacker, J. (1997). Detection of the intercellular adhesion gene cluster (*ica*) and phase variation in *Staphylococcus epidermidis* blood culture strains and mucosal isolates. *Infection and Immunity* **65**(3):890–896.
- Ziebuhr, W., Krimmer, V., Rachid, S., Lössner, I., Götz, F., Hacker, J. (1999). A novel mechanism of phase variation of virulence in *Staphylococcus epidermidis*: evidence for control of the polysaccharide intercellular adhesin synthesis by alternating insertion and excision of the insertion sequence element IS256. *Molecular Microbiology*, **32**(2): 345–356.
- Zmantar, T., Kouidhi, B., Miladi, H., Mahdouani, K., Bakhrouf, A. (2010). A microtiter plate assay for *Staphylococcus aureus* biofilm quantification at various pH levels and hydrogen peroxide supplementation. *New Microbiologica*, **33**(2): 137–145.