



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**KOAGÜLAZ NEGATİF STAFİLOKOKLARDA
DEZENFEKTAN DİRENÇ GENLERİNİN
SIKLIĞININ TESPİTİ VE FENOTİPİK
DİRENÇ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sarmad Wahab Shahab SHAHAB

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

HAZİRAN 2014



**KOAGÜLAZ NEGATİF STAFİLOKOKLARDA
DEZENFEKTAN DİRENÇ GENLERİNİN SIKLIĞININ TESPİTİ VE
FENOTİPİK DİRENÇ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Sarmad Wahab Shahab SHAHAB

**DOKTORA TEZİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Haziran 2014

Sarmad Wahab Shahab SHAHAB tarafından hazırlanan “ KOAGÜLAZ NEGATİF STAFİLOKOKLARDA DEZENFEKTAN DİRENÇ GENLERİNİN SIKLIĞININ TESPİTİ VE FENOTİPİK DİRENÇ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Kayhan ÇAĞLAR

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

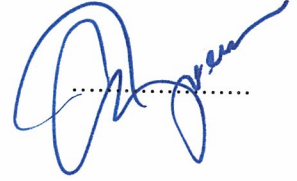
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak DOKTORA TEZİ olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Başkan: Prof. Dr. Meltem YALINAY ÇIRAK

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

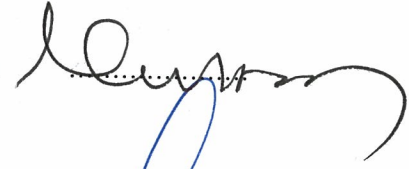
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak DOKTORA TEZİ olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye: Prof. Dr. Nedim SULTAN

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak DOKTORA TEZİ olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye: Prof. Dr. Ayşe KALKANCI

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak DOKTORA TEZİ olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Üye: Prof. Dr. Ali Murat AKSOY

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak DOKTORA TEZİ olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~



Tez Savunma Tarihi: 30/06/2014

Jüri tarafından Kabul edilen bu tezin Doktora Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....
Prof. Dr. Mustafa KEREM
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Sarmad Wahab Shahab SHAHAB

30/06/2014

KOAGÜLAZ NEGATİF STAFİLOKOKLARDA DEZENFEKTAN DİRENÇ GENLERİNİN SIKLIĞININ TESPİTİ VE FENOTİPİK DİRENÇ İLE İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI

(Doktora Tezi)

Sarmad Wahab Shahab SHAHAB

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2014

ÖZET

Koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) hastane enfeksiyonu etkeni olarak çeşitli enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Bu bakteriler dezenfektan ve antiseptik maddelere karşı direnç geliştirebilmektedirler. *qacA/B* dezenfektan direnç genleri bazı dezenfektanlara dirençli KNS suşlarında bulunabilmektedir. Bu çalışmada KNS'lerin klorheksidin diglukonat ve benzalkonyum klorür gibi dezenfektanlara duyarlılığı, *qacA/B* direnç genlerinin sıklığı ve bu genlerin varlığı ile fenotipik direnç (minimal inhibitör konsantrasyon testi ve klinik direnci gösteren bir bakterisidal test olan kantitatif süspansiyon testi) arasında ilişki bulunup bulunmadığı araştırılmıştır. Bakteriye izolatlar Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Ekim 2010 - Ağustos 2011 tarihleri arasında yatan hastalardan gönderilen kan kültürü ve kateter içi kan kültürü örneklerinden izole edildi. *qacA/B* gen pozitifliği KNS suşlarının %84'ünde (42/50) tespit edildi. İzolatlardaki klorheksidin diglukonat ve benzalkonyum klorür duyarlılığı minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) testi ile belirlendi. Klorheksidin diglukonat için MİK değerleri 0.03125-4 µg/ml arasında bulunurken, benzalkonyum klorür için MİK değerleri ise 0.015625-8 µg/ml arasında bulundu. Kantitatif süspansiyon testi sonuçlarına göre, dezenfektanların önerilen kullanım konsantrasyonları (%4 klorheksidin diglukonat ve %1 benzalkonyum klorürün 1/1'lik konsantrasyonları) tüm KNS izolatlarına karşı bakterisidal etkili bulundu. Bu sonuçlara göre, klorheksidin diglukonatın 1/10'luk konsantrasyonu 1. dakika temas sonrasında izolatların 29'una (%58), 5. dakika temas sonrasında 46'sına (%92) ve 30. dakika temas sonrasında ise izolatların 49'una (%98) bakterisidal etkili bulundu. Klorheksidin diglukonatın 1/100'lük konsantrasyonun 1. dakika temas sonrası tüm izolatlara bakterisidal etkisiz bulunurken, 5. dakika temas sonrası suşların %10'una ve 30. dakika temas sonrası ise izolatların %44'üne bakterisidal etkili bulundu. Benzalkonyum klorürün 1/10'luk konsantrasyonu 1. dakika temas sonrası izolatların %98'ine, 5. ve 30. dakika temas sonrası tüm izolatlara bakterisidal etkili bulunurken, 1/100'lük konsantrasyonunun 1. dakika sonrası izolatların %58'ine, 5. dakika temas sonrası %80'ine ve 30. dakika temas sonrası %88'ine bakterisidal etkili bulunduğu gözlemlendi. Sonuç olarak, *qacA/B* dezenfektan direnç geni pozitif bulunan KNS izolatlarında dezenfektanların klinik kullanım konsantrasyonlarına direnç bulunmadığı gözlemlendi.

Bilim Kodu : 139.1.010

Anahtar Kelimeler : Koagülaz negatif stafilokoklar, dezenfektan direnci, *qacA/B* genleri

Sayfa Adedi : 117

Danışman : Prof. Dr. Kayhan ÇAĞLAR

DETECTION OF DISINFECTANT RESISTANCE GENES AND THEIR ASSOCIATION WITH PHENOTYPIC RESISTANCE IN COAGULASE NEGATIVE STAPHYLOCOCCUS ISOLATES

(Ph. D. Thesis)

Sarmad Wahab Shahab SHAHAB

GAZİ UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

June 2014

ABSTRACT

Coagulase negative staphylococcus (CoNS) are responsible for different nosocomial infections in some hospitalized patients. These bacteria can develop resistance against various disinfectant and antiseptic biocidal agents. *qacA/B* disinfectant resistance genes can be detected in some disinfectant resistant CoNS strains. The aim of this study is to research the sensitivity of CoNS isolates against some disinfectants such as chlorhexidine digluconate and benzalkonium chloride, to determine the frequency of *qacA/B* resistance genes, and to determine the association of these genes with phenotypic resistance (minimum inhibition concentration test and the European Standard prEN bactericidal quantitative suspension test method). Bacterial strains were isolated from the peripheral and catheter-drawn blood samples of the patients that were submitted to the Clinical Microbiology Laboratory of Gazi University Medical Faculty Hospital between October 2010 and August 2011. *qacA/B* genes were detected in 84% (42/50) of the CoNS strains. The sensitivities of the isolates against chlorhexidine digluconate and benzalkonium chloride were detected using minimum inhibitory concentration (MIC) method. The MIC values were found between 0.03125-4 µg/ml for chlorhexidine digluconate, and between 0.015625-8 µg/ml for benzalkonium chloride. According to the quantitative suspension tests results, the disinfectant solutions, at the concentration of 4% of chlorhexidine digluconate and at the concentration of 1% of benzalkonium chloride, were found bactericidal against all CoNS isolates. 58% of the isolates were killed by 1/10 concentrations of chlorhexidine digluconate following 1 minute contact, 92% were killed in 5 min contact and 98% were killed in 30 min contact. At a concentration of 1/100, chlorhexidine digluconate was not bactericidal for any of the isolates following 1 minute contact, while 10% of the isolates were killed in 5 minute contact, and 44% were killed in 30 min contact. On the other hand, 98% of the isolates were killed by 1/10 concentrations of benzalkonium chloride following 1 minute contact, while it was found bactericidal for all of the isolates following 5 and 30 min at this concentrations. At a concentration of 1/100 solution of benzalkonium chloride, 58% of the isolates were killed following 1 min contact, 80% were killed in 5 min contact, and 88% were killed following 30 min contact. In conclusion, no resistance was observed in the bacterial isolates with *qacA/B* resistance genes for the clinical use concentrations of the disinfectant solutions.

Science Code : 139.1.010

Key Words : Coagulase negative staphylococcus, disinfectant resistance, *qacA/B* genes

Page Number : 117

Supervisor : Prof. Dr. Kayhan ÇAĞLAR

TEŞEKKÜR

Doktora eğitim süresi boyunca bilgi, tecrübe ve çalışma disiplinleri ile her zaman bana örnek olan ve bu tezin ortaya çıkmasında bana yardımlarını hiç esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Kayhan ÇAĞLAR'a, yetişmemde büyük emekleri geçen değerli hocalarıma ve manevi desteği ile her zaman yanımda olan sevgili aileme ve arkadaşlarıma Yasemin IŞIK KOÇ, Sinem SOLMAZ ve Mohammed Qasim MUSTAFA'ya çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	x
RESİMLERİN LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Stafilokoklar	5
2.1.1. Tarihçesi.....	5
2.1.2. Taksonomi.....	6
2.1.3. Morfolojik ve biyokimyasal özellikleri.....	9
2.1.4. Virulans ve patojeniteleri	10
2.1.5. Epidemiyoloji.....	19
2.1.6. Patogenez	20
2.1.7. Klinik	23
2.1.8. Tanı yöntemleri	26
2.1.9. Koagülaz negatif stafilokok enfeksiyonlarının tedavisi.....	32
2.2. Dezenfektan Maddeler ve Çalışmada Kullanılan Dezenfektan Maddelerin Özellikleri.....	33
2.2.1. Klorheksidin.....	35
2.2.2. Benzalkonyum klorür.....	36
2.3. Bakterilerde Dezenfektan ve Antiseptik Maddelere Direnç.....	37
2.3.1. Doğal direnç	38
2.3.2. Kazanılmış direnç	41
3. GEREÇ VE YÖNTEM	47
3.1. Örneklerin Toplanması	47
3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	47
3.2.1. Kullanılan cihazlar	47
3.2.2. Kullanılan besiyerleri ve ticari kitler	48
3.2.3. Kullanılan kimyasal maddeler	48
3.3. Yöntemler.....	49
3.3.1. Besiyerlerinin hazırlanması	49

Sayfa

3.4. Dezenfektan Duyarlılığının Araştırılması.....	50
3.4.1. Kantitatif süspansiyon test yöntemi	51
3.4.2. Mikrodilüsyon yöntemi ile minimal inhibisyon konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi.....	58
3.5. <i>qacA/B</i> Dezenfektan Direnç Genlerinin Saptanması	60
3.5.1. DNA izolasyonu için kullanılan solüsyonlar	60
3.5.2. Elektroforez için kullanılan solüsyonlar	60
3.5.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR).....	61
4.BULGULAR	65
4.1. Minimal İnhibisyon Konsantrasyonunun (MİK) Sonuçları	69
4.2. Koagülaz Negatif Stafilokoklarda Dezenfektan Duyarlılık Testlerinin Sonuçları	73
4.2.1 Kontrol deneylerinin sonuçları	73
4.2.2. Dezenfektan duyarlılık testlerinin sonuçları	76
4.3. PZR Sonuçları	80
5. TARTIŞMA.....	83
6. SONUÇ	95
KAYNAKLAR	97
EKLER	113
EK 1. Etik Kurul toplantı kararları sayfası.....	114
EK 2. Gazi Üniversitesi (girişimsel olmayan) klinik araştırmalar Etik Kurulu değerlendirme formu	115
ÖZGEÇMİŞ	117

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Tanımlanmış stafilokok tür ve alt türleri .	7
Çizelge 2.2. Yaygın izole edilen stafilokok türlerinin tanımlanmasında kullanılan fenotipik özellikler	28
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan primerlerin dizileri	62
Çizelge 3.2. PZR reaksiyon karışımı	63
Çizelge 3.3. <i>qacA/B</i> gen bölgelerinin amplifikasyonu için reaksiyon şartları	63
Çizelge 4.1. Hastaların cinsiyet ve yaşlarına göre dağılımları	65
Çizelge 4.2. Koagülaz negatif stafilokok kökenlerinin yaş, cinsiyet, materyal ve bölüme göre dağılımları	66
Çizelge 4.3. Koagülaz negatif stafilokok kökenlerinin API 20 NE tanımlama kiti ve microscan walkaway tanımlama sistemin sonuçlarına göre dağılımı	67
Çizelge 4.4. Koagülaz negatif stafilokok kökenlerinin izole edilen hastaların bölümlere göre dağılımı	68
Çizelge 4.5. Koagülaz negatif stafilokok kökenlerinin klorheksidin diglukonat ve benzalkonyum klorür MİK değerleri	69
Çizelge 4.6. Koagülaz negatif stafilokok kökenlerinin benzalkonyum klorür ve klorheksidin diglukonat MİK değerlerinin dağılımı	71
Çizelge 4.7. <i>qacA/B</i> dezenfektan direnç geni bulunan hastane suşu KNS'lerde klorheksidin diglukonat ve benzalkonyum klorür için MİK değerlerinin dağılımı	71
Çizelge 4.8. <i>qacA/B</i> dezenfektan direnç geni bulunmayan hastane suşu KNS'lerde klorheksidin diglukonat ve benzalkonyum klorür için MİK değerlerinin dağılımı	72
Çizelge 4.9. Benzalkonyum klorür ve klorheksidin diglukonatın MİK ₅₀ ve MİK ₉₀ değerleri	72
Çizelge 4.10. Klorheksidin diglukonat için yapılan validasyon deneylerinin sonuçları	73
Çizelge 4.11. Benzalkonyum klorür için yapılan validasyon deneylerinin sonuçları	75
Çizelge 4.12. Klorheksidin diglukonat için dezenfektan duyarlılık deneylerinin sonuçları	78
Çizelge 4.13. Benzalkonyum klorür için dezenfektan duyarlılık deneylerinin sonuçları	79

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Stafilokoklarda biyofilm oluşum modeli	15
Şekil 2.2. Çoklu ilaç dışarı atılım sistemlerinin örnekleri	42

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. 1-12 numaralı kökenlerin <i>qacAB</i> -f/r primer çifti ile yapılan PZR sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü	80
Resim 4.2. 13-24 numaralı kökenlerin <i>qacAB</i> -f/r primer çifti ile yapılan PZR sonrası agaroz elektroforez görüntüsü	80
Resim 4.3. 25-36 numaralı kökenlerin <i>qacAB</i> -f/r primer çifti ile yapılan PZR sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	81
Resim 4.4. 37-43 numaralı kökenlerin <i>qacAB</i> -f/r primer çifti ile yapılan PZR sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü	81
Resim 4.5. 44-50 numaralı kökenlerin <i>qacAB</i> -f/r primer çifti ile yapılan PZR sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	82

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklama

°C	Santigrat
g/L	Gram/Litre
kDa	Kilodalton
µl	Mikrolitre
ml	Mililitre
µg/ml	Mikrogram/Mililitre

Kısaltmalar

Açıklama

CDC	Central of Disease Control and Prevention
CFU/ml	Colony Formation Unit (Koloni Oluşturan Birim)/mililitre
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
FAME	Yağ Asidi Modifiye Eden Enzim
KNS	Koagülaz Negatif Stafilokoklar
KAB	Kuaterner Amonyum Bileşikleri
LPS	Lipopolisakkarit
MDR	Multidrug Efflux Sistemleri
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
NAMA	N-Asetil Muramik Asit
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rRNA	ribozomal Ribonükleik Asit
TRİS	(Hydroxymethyl) Aminometan
TSA	Triptik Soy Agar

1.GİRİŞ

Stafilokoklar, insan normal florasında bulunmakla birlikte ciddi enfeksiyona da neden olabilen bakterilerdir. Stafilokoklar nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarının önde gelen etkenlerindendir. Bu enfeksiyonlardan hem *Staphylococcus aureus* hem de koagülaz negatif stafilokoklar sorumludur.

Geçmişte koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) çok az sayıda hastalığa neden oldukları düşünülmüştür, ancak 1980'lerden bu yana KNS'lar fırsatçı patojenler arasında ilk sırada yer alan etkenler olarak karşımıza çıkmaktadır [1].

Koagülaz negatif stafilokoklar, hastane enfeksiyonu etkeni olarak bazı enfeksiyonlara yol açmaktadır. Kan dolaşımı enfeksiyonları, damar içi kateter enfeksiyonları, yara yeri, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, yabancı cisim-şant enfeksiyonları, septik artrit, protez ve endokardite uzanan geniş bir enfeksiyonlara sahiptirler [2].

Son yıllarda çoğul dirençli KNS'lar tüm dünyada yaygın olarak görülmektedir ve bu dirençli suşlar hastanelerde problem teşkil etmektedir [1].

Dezenfektanlar hastanelerde patojenlerin yayılmasını önlemek için dezenfeksiyon ve antisepsi amacıyla sık olarak kullanılmaktadır. Bu dezenfektanlar arasında; özellikle kuaterner amonyum bileşikler (KAB) ve klorheksidin sık olarak kullanılmaktadır [3].

Antibiyotiklerin yaygın olarak kullanılmasının antibiyotiklere çoğul dirençli bakterilerin yaygınlaşmasına yol açtığı bilinmektedir. Dezenfektanların hastanelerde yaygın olarak kullanılmasının da seçici bir baskı oluşturduğu ve bu çevrelerde dezenfektanlara dirençli bakterilerin seçilerek kolonize olmasına yol açtığı çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmektedir. Bazı araştırmacılar antibiyotik direnciyle dezenfektan direncinin birlikte bulunabileceğini de bildirmişlerdir. Yapılan bir çalışmada, stafilokoklarda antibiyotik direncinin dezenfektanlara dirençli izolatlarda daha yüksek bir sıklıkta görüldüğü bildirilmiştir. Bunun nedeni olarak da yaygın antibiyotik ve dezenfektan kullanımının seçici yönde baskı oluşturduğu ve dirençli suşların hastanelerde seçildiğini ileri sürmüşlerdir [1].

Yapılan bir başka çalışmada, klorheksidin yaygın kullanımı ile *S. aureus* izolatlarında klorheksidin direnci arasında ilişki olduğu belirtilmiştir [4].

Dezenfektan direnç genleri birçok bakteride araştırılmış olmasına rağmen, en bariz olarak stafilokoklarda gösterilmiştir [2]. Stafilokoklarda genellikle plazmid aracılığı ve diğer stafilokok suşlarına aktarılabilen direnç genlerinin varlığı çeşitli araştırmacılar tarafından saptanmıştır. Çeşitli çalışmalarda *qac* ve *smr* dezenfektan direnç genlerinin stafilokoklarda bulunduğu gösterilmiştir. *qac* direnç genleri hem kromozomlarda, hem de plazmid ve transpozon gibi aktarılabilen genetik elemanlar üzerinde bulunmaktadır ve bu nedenle türler arasında aktarılabilmektedir [1].

qac gen ailesinde *qacA* ve *qacB* genleri antiseptiklere yüksek düzeyde direnç gösterirken *qacC*, *qacD*, *ebr* ve *smr* genleri antiseptik ve dezenfektanlara düşük düzeyde direnç kodlamaktadır.

Nükleotid dizi analizleri *qacA* geninin *qacB* geni ile yüksek derecede benzer olduğunu göstermiştir, bu nedenle *qac* genetik direnci *qacA/B* ve *smr* olarak da belirtilebilmektedir. En önemlileri *qacA/B* genleridir [5].

Bu genler (*qac* ve *smr*) enerjiye bağımlı eflüks pompası aracılığı ile birçok yapısal olarak birbirine benzer ilaca, kimyasal maddeye, boya ve bazı ağır metallere dirence yol açmaktadır. Bunlara örnek olarak KAB, klorheksidin, diamidinler, akridinler, etidyum bromür verilebilir [4, 6].

Tanımlanmış olan bazı plazmidler (pST6, pSK4, pSK41) üzerinde *qac* direnç genleri gentamisin, penisilin, trimetoprim, kanamisin, tobramisin direnç genleriyle birlikte bulunabilmektedir [1].

qac direnç genlerini belirlemeye yönelik çalışmalar daha çok *S. aureus*'lar ile yapılmıştır. Bu genlerinin *S. aureus*'lardaki sıklığı değişik ülkelerde farklı oranlarda bildirilmektedir. Örneğin Brezilya'da %80 olarak bulunmuştur. Avrupa ülkelerinde ve Japonya'da da farklı oranlarda bildirilmektedir. Türkiye'de ise *S. aureus*'larda *qac* ve *smr* direnç genlerinin varlığını araştıran az sayıda çalışma mevcuttur.

Dünyada KNS'larda bu genlerin varlığını saptamaya yönelik çalışmalar azdır. Bu çalışmalarda KNS'larda da *qac* direnç genleri saptanmıştır. Türkiye'de ise bildiğimiz kadarıyla KNS'larda *qac* direnç genlerinin varlığına bakılmamıştır.

Stafilokoklardaki bu çalışmalarda genellikle *qac* direnç genlerinin varlığı araştırılmış ve birlikte KAB bileşikleri ile klorheksidinin minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyonun (MBC) değerlerine bakılmıştır. Bu araştırmalarda, dezenfektan maddenin klinik kullanım konsantrasyonundaki etkinliğini gösteren ve klinik direncin esas göstergesi olan bakterisidal test (süspansiyon testi) genellikle çalışılmamıştır.

Biz de bu çalışmada, koagülaz negatif stafilokokların yabancı cisim ve damar içi kateter enfeksiyonlarındaki önemli rolü ve klorheksidinin kateter bakımında sık kullanılması sebebiyle, KNS'lardaki klorheksidin direncini araştırmayı planladık. Çalışmamızda KNS'lerde klorheksidin ve benzalkonyum klorür gibi dezenfektanlara duyarlılığı, *qacA/B* direnç genlerinin sıklığı ve bu genlerin varlığı ile MİK testi ve klinik direnci gösteren bir bakterisidal test olan kantitatif süspansiyon testi arasında korelasyon bulunup bulunmadığını araştırmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Stafilocoklar

Stafilokoklar *Micrococcaceae* ailesi içerisinde yer alan, doğada yaygın olarak bulunan Gram pozitif koklardır. İnsan deri ve muköz membranlarında normal flora elemanlarıdır. Stafilocoklar genelde bulundukları yerde konakla iyi huylu ve simbiyotik bir ilişkiye sahiptirler, ancak deri ve mukozal travma, enjeksiyon veya cerrahi müdahaleler ile dokuya girmesi sonucu patojen olabilirler [7]. Yıllar boyu ürettiği kültür ortamlarında sıklıkla deri kontaminantı olarak değerlendirilseler de 80’li yılların ortasından itibaren klinik önemleri anlaşılmağa başlanmıştır [8].

2.1.1. Tarihçesi

Stafilokokları ilk olarak 1878’de Robert Koch ışık mikroskopunda tanımlamış ve 1880’de Louis Pasteur tarafından sıvı besiyerinde üretebilmiştir. İskoçyalı cerrah Alexander Ogston 1881 de stafilocokların fareler ve kobaylar için patojen olduğunu gösterirken bu mikroorganizmalara; üremeleri sırasında birbirlerinden ayrılmayıp, üzüm salkımına benzeyen düzensiz kümeler oluşturmaları sonucu “*Staphylococcus*” (Staphyle: üzüm salkımı) adını vermiştir. Rosenbach 1884’de ilk kez insan hastalık örneklerinden stafilocokları izole etmiştir ve kolonilerin kültür ortamlarında oluşturduğu renge göre iki gruba ayırmıştır: *Staphylococcus aureus* (aureus: sarı) ve *Staphylococcus albus* (albus: beyaz). *S. albus* olarak adlandırılan bakteri grubunun birden fazla alt tür içerdiği ve 1970’lerden itibaren *S. epidermidis* dışındaki diğer KNS türleri de tanınmağa başlamıştır [7, 9-11].

Genel anlamda biyosidler, antiseptik, dezenfektan ve koruyucu maddeleri kapsayan, dezenfeksiyon, sterilizasyon ve sanitasyon amacıyla kullanılan inorganik ya da organik sentetik moleküllerdir. Dezenfeksiyon işlemiyle cansız nesneler üzerindeki potansiyel patojenlerin miktarı sağlığa zarar vermeyecek bir düzeye düşürmektedir [12].

Biyosidler ve diğer antimikrobiyal ajanlar yüzyıllar boyunca kullanılmaktadır. İgnaz Semmelweis tarafından 150 yıl önce klorlu el yıkamanın ilk kullanımından beri bu ajanlar enfeksiyon kontrol programlarında vazgeçilmez olmuşlardır. Ancak 1950 ve 1960’larda

bakteriyel dezenfektan direnci tanımlamaya başlanmıştır ve zamanla bu direncin artması bildirilmiştir [13, 14].

2.1.2. Taksonomi

Bergey'in 1986'da yaptığı sistematik bakteriyoloji sınıflamasına göre, *Micrococcaceae* ailesi içerisinde *Stomatococcus* ve *Planococcus* ile birlikte yer alan *Staphylococcus* ve *Micrococcus* türleri Gram pozitif, katalaz pozitif koklardır [15]. Bununla birlikte Deoksiribonükleik Asit (DNA) dizi analizi, DNA-ribozomal Ribonükleik Asit (rRNA) hibridizasyonu ve 16S rRNA analizleri *Staphylococcus* ve *Micrococcus* türlerinin yakın ilişkili olmadığını göstermektedir [15].

Staphylococcus türleri aynı zamanda *Bacillus*, *Brochothrix*, *Gemella*, *Listeria* ve *Planococcus* ile de nispeten yakın ilişkili bulunmuştur. Bu türler geçici olarak stafilocoklar ile *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* kümesinin *Bacillaceae* ailesindeki diğer türler ile birlikte sınıflandırılmıştır [7, 10].

Sonraki çalışmalar, mikrokokların oksidaz pozitif olduğunu, G+C oranının (%63-73 mol) yüksek olduğunu, laboratuvar koşullarında stafilocokların tersine furazolidon (100 mg/ml) ve lizostafine (200 mg/ml) dirençli iken, basitrasine (0,04 mg/ml) duyarlı olduklarını göstermiştir [7, 10].

Staphylococcus cinsi içinde 60'ın üzerinde tür tanımlanmış olup bunlardan 32 tanesi klinik insan örneklerinden izole edilmiştir [15, 16]. Stafilocoklar arasında en patojen tür *S. aureus* olup, diğer stafilocok türlerinden koagülaz üretme özelliği ile ayrılmaktadır [15]. *S. aureus* dışındaki tüm stafilocok türleri genel olarak KNS olarak anılmakta ve giderek yaygınlaşan sıklıklarda klinik örneklerinden izole edilmektedir. KNS'ler içerisinde klinik örneklerden en sık izole edilen tür bir deri flora üyesi olan *S. epidermidis*'tir. Bunu genç kadınlarda idrar yolu enfeksiyonlarından izole edilebilen *Staphylococcus saprophyticus* izler. Daha nadir olarak *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. saccharolyticus*, *S. cohnii*, *S. simulans*, *S. capitis*, *S. sciuri*, *S. lugdunensis*, *S. caprae* de fırsatçı enfeksiyonlar oluşturabilmektedir [16].

KNS türleri, genellikle hastane enfeksiyonu etkeni olarak; deri-yumuşak doku, kan dolaşımı enfeksiyonları ve vücuda uygulanan yabancı cisim-biyomedikal cihaz taşıyan kişilerde oluşan enfeksiyonlarda karşımıza çıkmaktadır. Hastalığın seyrinin genel ve lokal bağışıklık yanıtının kısıtlı olduğu hastalarda daha kötü seyrettiği ve mortalitesinin de yüksek olduğu bilinmektedir [17].

Çizelge 2.1. Tanımlanmış stafilokok tür ve alt türleri [10, 15, 16].

TÜR	ALT TÜR	REFERANS
<i>S. arlettae</i> ¥		Schleifer et al. 1984
<i>S. aureus</i>	Anaerobius	De la Fuente et al. 1985
<i>S. aureus</i> *	Aureus	Rosenbach 1884
<i>S. auricularis</i> *		Kloos and Schleifer 1983
<i>S. capitis</i> *	Capitis	Kloos and Schleifer 1975
<i>S. capitis</i> *	Ureolyticus	Bannerman and Kloos 1991
<i>S. caprae</i> *		Devriese et al. 1983
<i>S. carnosus</i> ¥	Carnosus	Schleifer and Fischer 1982
<i>S. carnosus</i> ¥	Utilis	Probst et al. 1998
<i>S. chromogenes</i> §		(Devriese et al. 1978), Hajek et al. 1986
<i>S. cohnii</i> *	Cohnii	Schleifer and Kloos 1975
<i>S. cohnii</i> *	Urealyticum	Kloos and Wolfshohl 1991
<i>S. condimenti</i>		Probst et al. 1998
<i>S. delphini</i> §		Varaldo et al. 1988
<i>S. epidermidis</i> *		Winslow and Winslow 1908; Evans 1916
<i>S. equorum</i> §	Equorum	Schleifer et al. 1984
<i>S. equorum</i> §	Linens	Place et al. 2003
<i>S. felis</i> §		Igimi et al. 1989
<i>S. felis</i> §		Igimi et al. 1989
<i>S. gallinarum</i> §		Devriese et al. 1978
<i>S. haemolyticus</i> *		Schleifer and Kloos 1975
<i>S. hominis</i> *	Hominis	Kloos and Schleifer 1975
<i>S. hominis</i> *	Novobiosepticus	Kloos et al. 1998
<i>S. hyicus</i> §		(Sompolinski 1953), Devriese et al. 1978
<i>S. hyicus</i>	Chromogenes	Devriese et al. 1978

Çizelge 2.1. (devam) Tanımlanmış stafilokok tür ve alt türleri [10, 15, 16].

<i>S. intermedius</i>		Hajek 1976
<i>S. kloosii</i> ¥		Schleifer et al.1984
<i>S. lentus</i> §		Kloos et al.1976, Schleifer et al 1983
<i>S. lugdunensis</i> *		Freney et al. 1988
<i>S. lutrae</i>		Foster et al.1997
<i>S. muscae</i> §		Hajek et al. 1992
<i>S. pasteurii</i> *		Chesneau et al.1993
<i>S. piscifermentans</i> §		Tanasupawat et al.1992
<i>S. saccharolyticus</i> *		Kilpper-Balz and Schleifer 1981
<i>S. saprophyticus</i>	Bovis	Hajek et al. 1996
<i>S. saprophyticus</i> *	Saprophyticus	Shaw et al.1951
<i>S. schleiferi</i> *	Coagulans	Igimi et al. 1990
<i>S. schleiferi</i>	Schleiferi	Freney et al.1988
<i>S. sciuri</i>	Carnaticus	Kloos et al. 1997
<i>S. sciuri</i> §	Lentus	Kloos et al 1976
<i>S. sciuri</i> §	Rodentium	Kloos et al 1997
<i>S. sciuri</i> §	Sciuri	Kloos et al 1976
<i>S. simulans</i> *		Kloos and Schleifer 1975
<i>S. succinus</i>	Casei	Place et al. 2003
<i>S. succinus</i>	Succinus	Lambert et al. 1998
<i>S. vitulinus</i> §		Webster et al. 1994
<i>S. warneri</i> *		Kloos and Schleifer 1975
<i>S. xylosum</i> *		Schleifer and Kloos 1975

* İnsanlarda ve insan dışı primatlarda bulunanlar

¥ Diğer hayvanlarda bulunanlar

§ Daha çok doğa ve toprakta bulunanlar

2.1.3. Morfolojik ve biyokimyasal özellikleri

Görünüm ve boyanma

Stafilokoklar 0,5-1,5 mm çapında hareketsiz, yuvarlak, spor oluşturmeyen, katalaz pozitif ve gram pozitif mikroorganizmalardır [18].

Zorunlu anaerop olan *S. saccharolyticus* ve *S. aureus* subsp. *anaerobius* dışında fakültatif anaerop olup çoğunlukla aerop üremeyi tercih ederler. Genellikle katalaz pozitif (*S. saccharolyticus* ve *S. aureus* subsp. *anaerobius* hariç), oksidaz negatif (*S. sciuri*, *S. lentus* ve *S. vitulinus* hariç), kapsülsüz mikroorganizmalardır. Katı besiyerinde bölünebilme özellikleri nedeni ile mikroskopta çoğunlukla düzensiz kümeler (üzüm salkımı) oluştururlar. Pürülan örnek içinde, enfekte vücut sıvılarında veya sıvı besiyerlerinde morfolojik özellikleri üçlü-dörtlü kısa zincir yapan koklar şeklinde değişebilir. Bu görünümleri ile streptokoklara benzeyen stafilokoklar, katalaz testinin pozitif olması ile ayırt edilirler [7, 10, 15].

Üreme ve kültür özellikleri

Stafilokokların, sporsuz olmalarına rağmen kuruluğa dayanıklılıkları fazladır. Kapsülsüzdürler ve en tipik üremeleri kanlı agardadır. Kanlı agarın yanı sıra nutrient agar, triptik soy agar veya beyin kalp infüzyon agar gibi besiyerlerinden stafilokok türleri izole edilmektedir [7, 10, 19].

KNS kolonileri genellikle 24 saatlik inkübasyonda 1-2 mm çaplı düz, S tipi ve hafif konveks kabarık koloniler oluştururlar. Kuvvetli slime tabakası oluşturan nadir türler mukoid koloni morfolojisi gösterirler. Sarı/sarı-turuncu pigmentli *S. aureus* kolonilerinin aksine, KNS türleri beyaz-gri renkte koloniler oluştururlar. Ancak KNS kolonilerinin incelenmesinde en iyi yöntem ekim yapılan plaklara 35-37 °C'de 48-72 saat tutulduktan sonra inkübasyon iki gün daha oda ısısında devam edilmesidir. Değişik kolonilerin % 90'dan fazlası 72 saatten sonra ve oda ısısında devam edilen inkübasyonlarda belirginleşmektedir. Bazı *S. aureus* ve KNS suşlarında puslu veya farklı beta-hemoliz zonları bulunur ve inkübasyon süresi uzatılırsa beta-hemoliz belirginleşmektedir [7, 15].

Biyokimyasal özellikleri

Stafilokoklar, %10 ve daha az NaCl içeren ortamlarda üreyebilirler. Başta glikoz olmak üzere birçok karbonhidratı fermentatif olarak parçalar ve son ürün olarak laktik asit meydana getirirler. Gaz oluşturmazlar. Lizozime dirençli, lizostafine duyarlıdırlar [20].

Plazmayı pıhtılaştırma yeteneği gösteren koagülaz testi, *S. aureus*'u diğer Stafilokoklardan ayırt etmede en yaygın olarak kullanılan, en çok önem taşıyan ve genel olarak kabul gören identifikasyon kriteridir. *S. aureus* koagülaz pozitifdir. İki farklı yöntemle koagülaz testi yapılabilir. Birincisi stafilokokların besiyerine saldıkları serbest koagülazın araştırıldığı tüp testidir. İkincisi ise kümeleştirme faktörü olarak da bilinen bağlı koagülazın araştırıldığı lam deneyidir. Lam deneyi hızlı sonuç vermekle birlikte, *S. aureus* suşlarının %10-15'i bu yöntemle negatif sonuç verebilir. Mannitolü yalnız *S. aureus* parçaladığı halde koagülaz negatif olanlar parçalamazlar. Mannitole etki deneyi, koagülaz testinden sonra *S. aureus*'u diğer stafilokoklardan ayırt etmede en yararlı deneydir. Diğer karbonhidratlardan trehaloz, mannoz, maltoz, sukroz ve laktozu parçalarlar, ksiloz, sellobioz, arabinoz ve rafinozu parçalamazlar. Nitratları nitritlere indirgerler. Oksidaz olumsuzdurlar [19, 21].

Stafilokoklar dezenfektan ve antiseptiklere duyarlıdırlar. Kuaterner amonyum klorür bileşikleri ile etkin bir şekilde dezenfekte edilebilirler ayrıca alkol ve iyot gibi antiseptiklere de oldukça duyarlıdırlar [15].

2.1.4. Virulans ve patojeniteleri

Genom

Bakteri genomu yaklaşık 2000-3000 baz çiftli sirküler bir kromozom ile profajlar, plazmidler ve transpozonlardan oluşmaktadır. Stafilokokların DNA'larındaki G+C oranı % 30-39 moldür [10, 22].

S. aureus genomu, 2500 yakın geni kodladığı düşünülen 2800 kbp uzunluğunda tek bir kromozomdan oluşup, G+C içeriği yaklaşık %32 moldür. *S. epidermidis*'in genomu, 2500 kbp uzunluğundaki bir kromozom ve çeşitli sayıdaki plazmidlerden (*S. epiermidis*

ATCC12228 altı plazmid ve RP62A suşu tek plazmid içerir) oluşur. Bu türler %32'lik G+C içeriğine sahiptir ve 2400-2500 kodlanmış sekans içermektedir [7, 10, 23, 24].

Hücre duvarı

Hücre duvarı, bakteri hücrelerine şekil veren ve hücre içi yüksek ozmotik basıncına karşı bakterinin parçalanmasını önleyen önemli bir yapıdır [19, 25].

Peptidoglikan tabakası

Hücre duvarının esas yapısını oluşturan, hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilerde bulunan karmaşık bir makromoleküldür. Stafilokoklarda peptidoglikan tabakası hücre duvarının kuru ağırlığının yaklaşık %50-60'ını oluşturur. İnsan hücrelerinde bulunmayıp bakteri hücrelerinde bulunduğundan antibakteriyel ilaçlar için iyi bir hedef oluşturmaktadır. Bu tabaka üç bölümden oluşur. Bunların ilki β 1-4 glikozid bağları ile bağlanan N-asetil glukozamin (NAG) ve N-asetil muramik asit (NAMA) alt gruplarından oluşan disakkarid yapısıdır. İkinci tabaka N-asetil muramik asite bağlı D ve L aminoasitlerinden oluşmuş pentapeptid zinciridir. NAMA'de bağlanan pentapeptid yapısı sırası ile; L-alanin, D-glutamik asit, L-lizin, D-alanin, D-alanin şeklindedir. Son tabaka da ise NAMA'ye bağlı olan pentapeptid yan zincirleri, pentaglisin köprüleri ile bir zincirde D-alanin ile diğer zincirdeki L-lizin arasında olacak şekilde birbirlerine çapraz bağlanır. Çapraz bağlar hücre duvarının sağlamlılığı ile yakından ilişkilidir ve bu bağların yapısı türler arasında farklılık gösterir. *S. aureus*'da çapraz bağlantı oranı yüksektir ve bu özellik bakterinin lizozim enzimine karşı dirençli olmasını sağlar [10, 15, 26-28].

Stafilokoklar için vücudun önemli savunma mekanizmalarından biri olan lizozim (muramidaz) enziminin hedefi, hücre duvarındaki peptidoglikan tabakasıdır. Bu tabakayı oluşturan pentaglisin köprülerinin lizostafin enzimine özgül bir duyarlılık paterni olduğu için, bu enzim stafilokok alt gruplarını tanımlamak amacıyla da kullanılmaktadır [15, 19, 29].

Stafilokokların peptidoglikan tabakası; makrofajlardan sitokin salınımını uyarır, komplemanın aktivasyonuna yol açar ve trombosit agregasyonuna neden olur. Ayrıca monositlerden IL-1 salınımını uyarak polimorfonükleer lökositlerin enfeksiyon bölgesine

toplanmalarına ve sonuçta apse oluşumuna da yol açar. Gözyaşı, ter ve lökositlerde bulunan lizozim (muramidaz) enziminin hedefi stafilokok ve diğer gram pozitif bakterilerin peptidoglikan tabakasının β 1-4 bağlarıdır. Stafilokoklardaki pentaglisin köprülerinin lizostafin enzimine özgül bir duyarlılığı vardır [10, 15, 26-28].

Teikoik asit

Hücre duvarında bulunan teikoik asit, mukozalarda bulunan özgül reseptörleri (fibronektin, fibrinojen, laminin, trombospondin, elastin, kollajen, vitronektin ve sialoprotein) ile birleşerek stafilokokların enfeksiyon bölgesine yapışmasını sağlar. Teikoik asit, peptidoglikan tabakaya ya da lipofilik zincir arasından sitoplazmik membrana kovalan olarak bağlanmış, türe özgü fosfat içeren polimerlerden oluşur. Kalınlığı, bakteri türüne göre değişmekle birlikte 10–12 nm arasındadır. Teikoik asitler bulundukları yere göre 2 kısma ayrılır. Bunlar; hücre duvarı ve membran teikoik asitleridir. Duvar teikoik asitlerinden N-asetil glukozamin (GlcNAc) rezidüleri içeren ve polisakkarit A olarak da adlandırılan ribitol teikoik asit *S. aureus*'ta, glikozil rezidüleri içeren ve polisakkarit B olarak da adlandırılan gliserol teikoik asit ise *S. epidermidis*'te bulunur [19].

Yüzey proteinleri

Stafilokoklar enfeksiyon başlangıcında doku ekstrasellüler komponentlerine yapışırlar. Aderans “microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules” (MSCRAMM) isimli yüzey protein adezinleri ile ilişkilidirler. MSCRAMM'ların çoğu hücre duvarındaki peptidoglikanlara kovalen olarak bağlanırlar. Bununla beraber hücre duvarı ile kovalen olmayan bağlanma görülen MSCRAMM'larda vardır [30-32].

Stafilokok yüzey proteinlerinin çoğunun genel özellikleri belirlenmiştir. Bu bilinen özelliklere N-terminalinden salınan sinyal dizileri, sitoplazmaya uzanan amino asitler, hidrofobik membranın genişlemiş bölgesi, hücre duvarına yerleşmiş bölgesi ve C (karboksil) terminalinin tamamı dahildir [29].

Protein A, elastin, kollajen, fibronektin bağlayan proteinler ile kümeleşme faktörü (clumping faktör), kimyasal yapıları ve hücre duvarı yerleşimleri birbirlerine benzeyen

stafilokoksik yüzey proteinleridir. Bu proteinler stafilokokların konak dokularında kolonize olmasında en önemli faktörlerdir [10, 15, 21, 22].

Bu proteinlerin prototipi olan protein A 42 kilodalton ağırlığındadır. İlk olarak 1940'ta Wervey tarafından tanımlanmıştır. Stafilokoklarda; üreme sırasında ortama salınan serbest, hücreye bağlı ve hücre dışına salgılanan olmak üzere 3 tip protein A bulunmuştur. Bu proteinin en önemli özelliği IgG3 dışındaki tüm IgG ve IgA2 ile bazı IgM'lerin Fc reseptörleri ile birleşebilmesidir. Bu nedenle üreme sırasında ortama salınan serbest protein A, immünglobulinlerin Fc reseptörlerine bağlanarak antikora bağlı fagositozdan, ayrıca hücre dışına salgılanan protein A da aynı reseptörlere bağlanarak komplemana bağlı vücut savunmasından bakteriyi korumaktadır [10, 15, 21, 33].

Ayrıca “kemik sialoprotein-bağlayıcı protein”(Bbp), “fibrinojen bağlayıcı protein” (fib), “kollajen bağlayıcı protein” (cna), “elastin bağlayıcı protein” (ebpS) ve “laminin bağlayıcı protein” (eno) bakteriyel yüzey proteinleri içerisindedir [32].

Biyofilm

Bakterilerin planktonik formdan çok, bir yüzeye tutunarak ve biyofilm adı verilen bir yapı oluşturarak hayatlarını devam ettirdiğine dair kanıtların ortaya konduğu birçok çalışma gerçekleştirilmiştir [34, 35].

Modern tıp her geçen gün biraz daha fazla biyofilmler ve biyofilm enfeksiyonları ile karşı karşıya kalmaktadır. Biyofilm, canlı veya cansız bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri organik bir ekzopolisakkarid matriks içine gömülü ve hareketsiz olarak birbirine, bir katı yüzeye veya bir ara yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunmuş halde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluktur.

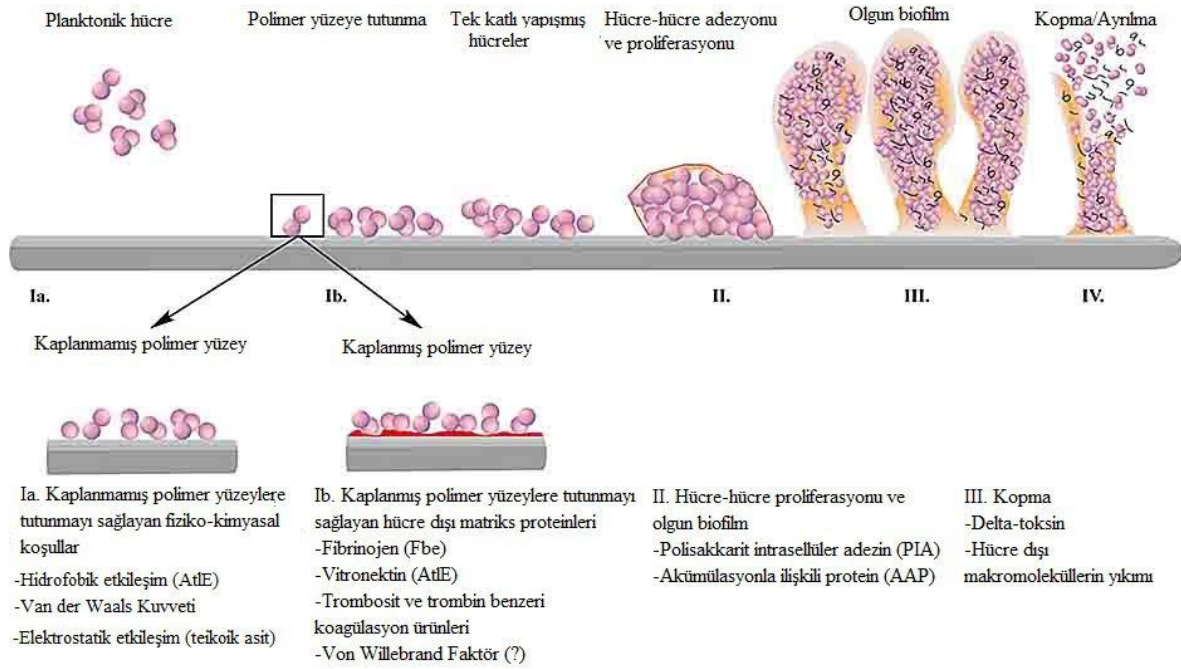
Biyofilm tabakası, bakterileri başta klor olmak üzere dezenfektanlardan, besinsizlikten, kuraklıktan, pH dalgalanmalarından ve toksinlerden korur. Bu cansız yüzeylerin yanı sıra biyofilm canlı organizmada da çeşitli koşullarda, çeşitli dokularda oluşmaktadır. Biyofilmlerin bir kısmı organizma açısından koruyucu bir rol üstlenirken, özellikle immün baskılanmış hastalarda ve kalıcı tıbbi araç veya kateteri olan hastalarda ciddi enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Biyofilmler insan vücudunda kateterler, kontakt lens,

protez kalp kapakçıkları ve kalp pilleri, rahim içi araç, böbrek taşı, akciğer dokusu gibi canlı ve cansız birçok yüzeyde bulunabilmektedir [36].

Biyofilm oluşumu basamaklar halinde gelişen bir olaydır:

- A. Mikroorganizmanın yüzeye tutunması: Yüzeye organik ve/veya inorganik maddelerin yapışmasını takiben mikroorganizmalar bu yüzeye geri dönüşür özellikte tutunur. Bakterinin hareketi veya bakteri yüzeyi ile tutunulan yüzey arasındaki elektrostatik veya fiziksel etkileşimler bu evrede rol oynamaktadır.
- B. Geri dönüşümsüz tutunma: Yüzeye tutunan hücreler bakteri hücre zarındaki proteinlerin uyarımı sonucunda ekzopolisakkarid yapıda materyal sentezlemeye başlar ve bu da hücrelerin birbirine ve yüzeye tutunmasını sağlar. Ekzopolisakkarid aynı zamanda bakterinin olumsuz çevre koşullarından korunmasını da sağlamaktadır.
- C. Kolonizasyon: Yüzeye tutunan bakteriler bölünüp çoğalarak biyofilmin en küçük organizasyon birimi olan mikrokolonileri oluşturur. Bu mikrokolonilerin üzerine ortamdaki planktonik bakteriler de yapışarak kolonizasyon sağlanır.
- D. Kopma: Biyofilmin üst kısımlarından kopan hücreler yeni odaklarda biyofilm oluşturabilir. Biyofilm oluştuktan sonra bakteride genetik düzenlenme sonrasında hareketi sağlayacak olan flajeller sentezlenir, üst tabakadan kopmalar gerçekleşir ve kopan planktonik hücreler yeni biyofilm odaklarını oluşturmak üzere ayrılır. Bu süreç bir dengeye oturunca süreklileşir [37].

Stafilokoklarda biyofilm oluşum evreleri şekil 2.1.'de gösterilmiştir [38].



şekil 2.1. Stafilokoklarda Biyofilm Oluşum Modeli (Kaynak 38'den düzenlenmiştir)

Toksik şok sendrom toksin-1

S. aureus tarafından salgılanan en önemli süperantijen, toksik şok sendromundan sorumlu olan TSST-1'dir. Toksik şok sendromu, ateş, arteriyel hipertansiyon, deri döküntüsü ve deride soyulma ile karakterize akut sistemik bir hastalıktır. Daha önceleri toksik şok sendromu, vajinal tampon kullanımı ile ilişkili olduğu dşnlmştir, ancak toksik şok sendromu TSST-1 üreten herhangi bir stafilokok enfeksiyonu sonrası oluşabilmektedir ve en çok *S. aureus*'un neden olduğu bildirilmiştir. Çeşitli çalışmalarda, koagülaz negatif stafilokokların TSST-1 ürettiği saptanmıştır [39].

Stafilokokal enterotoksin

Stafilokokal enterotoksinler lizin, aspartik asit, glutamik asit ve sisteinden zengin molekül ağırlığı 26000-29000 dalton arasında değişen suda çözülebilir proteinlerdir. Bunlar ısıya ve tripsin, pepsin ve renin gibi proteolitik enzimlere dirençlidirler. Serolojik olarak 18 farklı enterotoksin (SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER, SEU) bulunmaktadır [40]. Stafilokokal intoksikasyon enterotoksin üreten Stafilokoklar ile kontamine gıdanın alımıyla oluşmaktadır ve *S. aureus* ana etkindir.

S. intermedius ve *S. hyicus* gibi koagülaz pozitif diğer türlerin ve aynı zamanda *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. warneri*, *S. chromogenes* ve *S. lentus* gibi koagülaz negatif türlerinde intoksikasyona neden olduğu bildirilmiştir [39].

Kuveyt'te restaurant çalışanlarında yapılan bir çalışmada, 155 örneğin %14,1'inde toksijenik koagülaz negatif stafilocok saptandığı, kökenlerin *S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. haemolyticus* ve *S. schleiferi* olduğu ve enterotoksin SEA, SEB, SEC ve TSST-1 ürettikleri bildirilmiştir [41].

Lipaz

Lipazların insan ve memeli derisindeki yağ asidi sekresyonunu ve T hücrelerin fagositozunu engelleyerek stafilocokların virulansına katkı sağladığı düşünülmektedir. *S. epidermidis*'in GehC, GehD ve Geh-1 olmak üzere 3 adet lipaz ürettiği ve *S. epidermidis*'in lipaz üretiminin quorum sensing sistemi agr tarafından düzenlendiği bildirilmektedir [42]. *S. haemolyticus*, *S. hyicus*, *S. warneri* ve *S. xylosus*'un da lipaz ürettiği saptanmıştır [43].

Proteaz

S. epidermidis'te etki mekanizmaları ve substrat özellikleri farklı 3 proteaz saptanmıştır. Bunlar; Zn^{+2} bağımlı 32 kDa'luk metalloproteaz, 41kDa'luk sistein proteaz ve 27 kDa'lık serine proteaz. Proteazların biyofilm oluşumunda olası bir rolü olduğu düşünülmektedir [42].

Yapılan bir başka çalışmada ise proteazların fibrinojeni, kompleman C5 proteinini ve diğer proteinleri degrade ettiği ve bağışıklık sisteminden kaçışta bir rolü olduğu bildirilmiştir [44].

Yağ asiti modifiye eden enzim (FAME)

Yağ asiti modifiye eden enzim, (FAME) ilk kez *S. aureus*'ta tespit edilmiştir ve *S. epidermidis*'lerin %88'inde saptanmaktadır [45]. FAME, bakteriyel yağ asitlerini kolesterole esterleyerek inaktive etmektedir. Ciltte bulunan bakteriyel lipidleri inaktive ederek *S. epidermidis*'i korumaktadır. Bu enzimin hangi gen ile ilişkili olduğu

bilinmemektedir. *S. lugdunensis*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. capitis*, *S. hominis*, *S. cohnii* gibi koagülaz negatif stafilokok türlerinin FAME aktivitesine sahip olduğu bildirilmiştir [42].

Lantibiyotik üretimi

Lantibiyotikler; *S. epidermidis* ve diğer bazı gram pozitif bakterilerin (ör: *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus*) ürettiği bakteriyosinlerdir. Ancak *S. aureus* tarafından üretilmemektedir. *S. epidermidis*'in deriye kolonize olabilmesinin altında yatan önemli bir neden de lantibiyotik üretimidir. Epidermin, Pep5, epilansin, K7 ve episidin gibi lantibiyotikler, nadir tiyoeter aminoasidi içeren antibiyotik peptitlerdir ve gram pozitif bakterilere karşı etkilidirler. Böylece *S. epidermidis*, lantibiyotiklere duyarlı olan bakteriler karşısında kolonizasyonda üstünlük sağlamaktadır. Lantibiyotik salınımından sorumlu genler genellikle plazmidler üzerinde yer almaktadır [46].

Konak içerisinde demir kazanımı

Her bakteri gibi stafilokoklar da üremek için demire gereksinim duymaktadır. Hücre dışı sıvılarda, yüksek derecede serbest demiri bağlayan transferrin ya da laktotransferrin gibi glikoproteinlerin varlığında stafilokokların üremesi yavaşlamaktadır. Stafilokokların transferrinden nasıl demir sağladıklarının mekanizması henüz açıklık kazanmamıştır [46].

S. epidermidis'in virulans faktörleri

S. epidermidis'te stafilokokal yüzey proteinleri (Staphylococcal surface protein) SSP-1 (280 Kilodalton [kDa]) ve SSP-2 (250 kDa) gösterilmiştir [46].

Biyofilm ilişkili proteinin (Biofilm associated protein) “Bap”; *S. aureus*'ta biyofilm oluşumunda görev aldığı ve *S. epidermidis*'inde aynı görevi gören Bap homolog proteinini “Bhp” ye sahip olduğu bildirilmektedir [47].

S. epidermidis'in yüzey ilişkili otolizini olan AtlE'nin bakterinin yüzeye tutunmasının yanında hücre dışı matriks proteinini olan vitronektine de bağlanmada önemli rol oynadığı gösterilmiştir. *S. epidermidis*'in fibrinojen bağlayan proteinini (Fbe) 119 kDa büyüklüğünde,

serin-aspartat (SD) tekrarları (Sdr) içeren, hücre duvarına bağımlı yüzey proteinleri ailesi üyesidir [48].

Fbe'nin eksik olduğu mutant suşların polietilen materyallere tutunma yeteneklerinin azaldığı gözlenmiştir. *S. epidermidis*'ten izole edilen diğer yüzey ilişkili proteinler SdrG, SdrF ve SdrH'dir [49].

S. epidermidis yabancı cisim yüzeyine yapıştıktan sonra burada çoğalarak hücre yığınları oluşturmaya başlamaktadır. Polisakkarit hücre içi adezinin (PIA) yığılma fazında önemli bir rolü olduğu saptanmıştır [50].

Ayrıca bir başka hücre dışı protein olan 140 kDa büyüklüğündeki yığılma ilişkili proteinin (Accumulation associated protein: AAP) *S. epidermidis*'in biyofilm tabakası oluşumunda yığılma fazında etkili olduğu belirtilmektedir [51].

S. epidermidis'in virulans faktörleri olarak gösterilen grup içerisinde; elastaz aktivitesine sahip olan hücre dışı metalloproteaz, sistin proteaz, serin proteaz, lipaz, yağ asidi modifiye eden enzim (FAME) gibi birçok enzim bulunmaktadır [46].

S.saprophyticus'un virulans faktörleri

Son yıllarda *S. saprophyticus*'un çeşitli virulans faktörleri tespit edilmiştir. *S. saprophyticus*'un diğer KNS'lere göre daha sık idrar yolu enfeksiyonuna yol açmasının nedeni özellikle üroepitelyal hücrelere daha yüksek afinite ile bağlanmasıdır. *S. saprophyticus*'un yüzeyinde bulunan 160 kDa büyüklüğündeki bir protein, hemaglutinin/adezyon özelliğine sahiptir ve *S. saprophyticus*'un üst üriner sisteme kolonizasyonunu sağlamaktadır [52].

Bir başka yüzey ilişkili fibriler protein ise *S. saprophyticus* yüzey ilişkili protein Ssp'dir ve üropatojen *S. saprophyticus*'ların %98'inde tespit edilmiştir. Ayrıca *S. aureus* ve *S. epidermidis*'te bulunan Sdr proteinlerine benzer bir yüzey ilişkili protein olan SdrI de *S. saprophyticus*'ta saptanmıştır [53]. *S. saprophyticus*'un bir diğer virulans faktörü de üreaz enzimidir. Kolonizasyon sağlandıktan sonra *S. saprophyticus* üreaz üretmeye başlamaktadır [46].

S. lugdunensis ve *S. schleiferi*'nin virulans faktörleri

S. lugdunensis ve *S. schleiferi*'nin 1988 yılında tanımlanmalarının ardından her iki bakterinin de birçok nozokomiyal enfeksiyona neden oldukları bildirilmeye başlanmıştır. Çoğu olguda agresif klinik seyire neden olmaları ve özellikle endokardit olgularında diğer KNS'lerden daha ağır klinik çizelgelere yol açmaları nedeniyle diğer KNS'lere oranla daha patojenik oldukları düşünülmektedir [54, 55].

S. lugdunensis ve *S. schleiferi* kümeleştirici faktör oluşturmaları ve termostabil DNaz üretebilmeleri nedeniyle *S. aureus*'a benzerler. Ancak *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi*'nin enfeksiyon oluşturma mekanizmaları henüz açıklığa kavuşmamıştır. *S. lugdunensis* kökenlerinin %25'inin bakteriyel kolonizasyonda ve nötrofillerin fagositoz ilişkili aktivitelerinde önemli rol oynayan hücre dışı slime ya da glikokaliks ürettikleri bildirilmektedir. Ayrıca esteraz, FAME, proteaz, lipaz gibi enzimleri ürettiği ve bunların dokuya invazyonda önemli rol oynadıkları belirtilmektedir. *S. lugdunensis* kollojen, fibronektin, vitronektin, laminin, fibrinojen, trombospondin, plazminojen ve insan IgG gibi birçok moleküle bağlanma kapasitesine sahiptir. Glikokaliks, esteraz, proteaz, FAME, lipaz ve hemolizinler gibi *S. lugdunensis* için tanımlanan virulans faktörlerinin çoğuna son on yılda *S. schleiferi*'nin de sahip olduğu bildirilmektedir [46].

2.1.5. Epidemiyoloji

KNS'ler insan ve hayvanların mukoza ve derisinde kolonize halde bulunan bakterilerdir. Önceleri klinik örneklerin bu bakterilerle kontamine olduğu düşünülmüştür. Yeni tedaviler ve cerrahi müdahaleler gibi ileri tıbbi yöntemlerin gelişmesine paralel olarak son yıllarda koagülaz negatif stafilokoklar önemli nazokomiyal patojenler olarak karşımıza çıkmaktadır.

Brezilya'da bir üniversite hastanesinde yapılan çalışmada çeşitli hasta örnekleri ve klinik malzemelerinden izole edilen mikroorganizmaların %22'si koagülaz negatif stafilokok olduğunu tespit etmişlerdir [56].

1992 ve 1997 yılları arasında Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans (NNIS) Sistemi aracılığıyla toplanan yoğun bakım ünite

sürveyans verilerinin analizi sonucunda kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmaların %36 koagülaz negatif stafilokoklar olduğunu tespit etmişlerdir [57]. Epidemiyolojik önemi olan patojenlerin kontrolü ve sürveyans projesi (SCOPE) kapsamında Amerika Birleşik Devletlerinde 49 hastaneden nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarının verileri toplanmıştır ve nütropenik hastalardan izole edilen mikroorganizmaların %32 koagülaz negatif stafilokok tespit etmişlerdir [58].

Yapılan bir çalışmada Avrupa Birliğine üye olan 12 ülkeden 111 hastane, Avrupa Birliğine üye olmayan 14 ülkeden 40 hastane, toplam 26 ülke ve 151 hastane çalışmaya katılmıştır. Kateter ucu örneklerden izole edilen organizmaların Avrupa Birliğine üye olan ülkelere %50,5 Avrupa Birliğine üye olmayan ülkelere %40 koagülaz negatif stafilokok olduğunu saptamışlardır [59].

Batı Hindistan'da yapılan bir çalışmada üniversite hastanesinde kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmaların %32,2 koagülaz negatif stafilokok olduğu saptanmıştır [60].

Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 2000-2011 yılları arasında gönderilen kan kültürleri incelendiğinde en sık üreyen mikroorganizmaların %48,1 ile koagülaz negatif stafilokoklar oldukları görülmüştür [61]. Ocak 2002- Aralık 2002 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi (EÜTF) Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniğinde Yenidoğan servisi dışında yatırılan ve izlemlerinde hastane enfeksiyonu tanısı alan hastaların çalışmaya alındığı ve hastane enfeksiyonlarından (%16,4) koagülaz negatif stafilokokların sorumlu olduğunu bildirmişlerdir [62].

2.1.6. Patogenez

Koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) klinik mikrobiyoloji laboratuvarında en sık izole edilen bakteriler arasındadır. Özellikle hastane enfeksiyonuna neden olduğu için bu bakteriler giderek daha önemli hale gelmektedir. Bu bakteriler insan deri ve mukozasında normal flora olarak bulunmaktadır. Günlük tanısal çalışmaların en önemli sorunlardan biri klinik olarak anlamlı koagülaz negatif stafilokokların kontaminant kökenlerden ayırt edilmesidir [46].

1972 yılında koagülaz negatif stafilokokların slaym üretiminin enfeksiyonların patogeneğinde önemli bir faktör olduğu tespit edilmiştir [63]. Slaym ya da biyofilm *S. epidermidis*'in en önemli virülans faktördür. Biyofilm oluşumu bakterilerin yabancı maddeler üzerinde bağlanmasını ve kalıcılığını sağlamaktadır. Ayrıca, biyofilm içinde organize olan bakteriler antibiyotik ve bağışıklık sisteminin etkisinden korunmaktadırlar [64, 65].

Biyofilm oluşumunun ilk aşaması adezyondur. Otolizin/adezin AtlE ve Aae gibi stafilokokal bağlanma proteinleri, Fbe/Sdrg fibrinojen bağlayıcı protein, Emp fibrinojen bağlayıcı protein ve GehD lipazı biyofilm oluşumunun ilk aşaması olan adezyonda önemli rol oynamaktadır [65]. AtlE adezyonun en önemli molekülüdür. Birikimi, biyofilm oluşumunda ikinci aşamayı oluşturmaktadır. Biyofilm oluşumunda ikinci aşama birikimdir. *icaADBC* lokusu tarafından kodlanan polisakkarit hücre içi protein PIA en önemli fonksiyonel bileşenidir [46, 65]. *icaADBC* lokusu eksik kökenlerde, biyofilm oluşumu birikim ilişkili protein (Aap) veya biyofilm ilişkili protein (Bap/Bhp) tarafından düzenlenmektedir [66]. Son zamanlarda, PIA, Aap ve Bhp negatif olan ve biyofilm üreten 2 köken tanımlanmıştır [67].

Biyofilm oluşum regülasyonu çok karmaşıktır ve en iyi tanımlanması *S. epidermidis*'te yapılmıştır. Farklı düzenleyici sistemler, örneğin sae, alternatif sigma faktör σB , sar ve quorum sensing sistemi önemli rol oynamaktadır [65, 68].

Staphylococcus epidermidis'te biyofilm oluşumunu baskılayan agr ve luxS/AI-2 olmak üzere iki quorum sensing sistemi bulunmaktadır: luxS sistemi PIA üretimini baskılamak, agr sistemi ise AtlE üretimini baskılamaktadır. Toksinler ekspresyonu, salgılanan virülans faktörleri ve bağışıklık sistemi ile etkileşimini Agr tarafından kontrol edilmektedir [69]. Quorum sensing sistemleri stafilokok enfeksiyonlarının kontrolünde tedavi hedefleri olarak potansiyele sahiptirler [70].

Koagülaz negatif stafilokokların diğer önemli virülans faktörü antibiyotik direncidir. Belirli bir transpozoon insersiyonunun hem biyofilm oluşumunu hemde metisilin direnci ifadesini etkilemesi, biyofilm oluşumunun düzenlenmesi ve metisilin direncinin benzer yolu kullandığını göstermektedir [65].

Metisilin direnci slaym pozitif kökenlerde (%81) slaym negatif kökenlere (%57) göre daha yüksek bulunmuştur [71]. Koagülaz negatif stafilocoklarda, özellikle *S. epidermidis*'te gözlenen fenotipik değişkenlik ve heterojen gen ifadesi değişen çevre koşullarına uyumda avantaj sağlamaktadır [67]. *S. epidermidis*'in diğer virulans faktörlerini ekstraselüler enzimler ve toksinler oluşturmaktadır. Bunlar: elastaz etkinliğine sahip metalloproteaz, sistein proteaz, serin proteaz, lipaz ve yağ asidi modifiye eden enzim (FAME) ve δ -toxin'dir. Ayrıca koagülaz negatif stafilocoklar lantibiyotikler üretmektedir [38, 46]. Bu lantibiyotikler diğer gram-pozitif bakterilere karşı etkili olan epidermin gibi bakteriyosinlerdir. Çeşitli çalışmalarda virulans ilişkili genlerin saptanması yoluyla invaziv ve kommensal *S. epidermidis* kökenlerinin ayırımına çalışmıştır [72-74].

Yapılan bir çalışmada *icaADBC*, *mecA* ve *IS256* gibi virulans genlerinin invaziv kökenlerde oldukça yaygın olduğunu bildirmişlerdir. Sağlıklı bireylerden izole edilen kommensal kökenlerin neredeyse tamamında *icaADBC*, *mecA* ve *IS256*'nın olmadığını saptamışlardır. Ancak hastanede yatan kemik iliği nakli yapılan hastalardan izole edilen kommensal kökenlerin genleri çalışıldığında invaziv kökenlerle aynı dağılım görülmesi, kommensal flora ile hastane kökenlerinin yer değiştirdiğini düşündürmüştür. Bu genlerin invaziv ve kommensal kökenlerin ayırımında kullanılamayacağı sonucuna varılmıştır [74]. *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi* diğer KNS türlerinden daha patojendir. *S. aureus* gibi, kümelenme faktörü (clumping faktör) ve termotabil DNaz üretebildikleri bildirilmiştir [46]. Bu türler değişen oranda ekstraselüler slaym ve glikokaliks, esteraz, FAME, proteaz, lipaz ve hemolizin üretebilmektedir. Aksi ispatlanana kadar *S. lugdunensis* diğer koagülaz negatif stafilocoklardan daha patojen olduğu düşünülmektedir [75, 76].

Staphylococcus lugdunensis lam aglutinasyon testi genellikle pozitif olduğu için sıklıkla *S. aureus* olarak yanlış tanımlanmaktadır. Üriner sistem enfeksiyonlarında *S. saprophyticus*'un temel virulans faktörü, otolizin/adezin Aas, Ssp ve Sdrl gibi yüzey ilişkili proteinlerle üroepitel hücrelere adezyon kapasitesine sahip olmasıdır. kolonizasyon sağlandıktan sonra üreaz, elastaz, lipaz ve FAME gibi çeşitli invazyon faktörleri üretilmektedir [46].

2.1.7. Klinik

Bakteriyemi ve intravasküler kateter enfeksiyonları

KNS'ler kateter ilişkili enfeksiyonların (olguların %50-70) en önemli nedenidir ve nazokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonundan en sık soyutlanan etkenlerdir [63]. Koagülaz negatif stafilokoklara bağlı kan dolaşımı enfeksiyonlarının çoğunluğu intravasküler kateterler ve özellikle uzun süreli kateterlerle ilişkilidir [77]. Koagülaz negatif stafilokoklar aynı zamanda en sık kan kültürü kontaminantıdır ve klinik enfeksiyon ile kontaminasyonu ayırt etmek genellikle zordur. Pozitif kan kültürü sayısının artması, iki veya daha fazla pozitif kan kültüründe üremenin olması gerçek bakteriyemi olasılığını arttırmaktadır [78].

1960'lar ve 1970'ler boyunca nazokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarına en sık gram negatif bakterilerin neden olduğu, 1980'lerde KNS'lere bağlı kan dolaşımı enfeksiyonlarının insidansının arttığı ve KNS'lerin kan dolaşımı enfeksiyonlarının %25'inden daha fazlasına neden olduğu bildirilmiştir. ABD'de 1995 ve 2002 yılları arasında yapılan geniş çaplı surveyans çalışmasında, KNS'lerin nazokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarının %31'inden sorumlu olduğu saptanmıştır. KNS'ler özellikle *S. epidermidis*, bakteriyemiye ek olarak, çıkış yeri enfeksiyonu, tünel enfeksiyonu, enfekte tromboflebit, endokardit ve apselere neden olmaktadır [79].

Kanserli hastalarda KNS bakteriyemisinin kaynağının deriye nazaran mukoza olduğuna dair kanıtlar artmaktadır. Son zamanlarda yapılan bir çalışmada kan kültürleri ve kalıcı santral venöz kateter kültürleri KNS pozitif olan kanser hastalarında, mukozal alanların daha sık KNS'ler ile kolonize olduğu bildirilmiştir. (%86'sında nazal mukoza, %40'ında rektal mukoza) [79].

Vasküler greft enfeksiyonları

KNS'ler vasküler greft enfeksiyonlarının en yaygın nedenidir. Yapılan bir çalışmada, koagülaz negatif stafilokoklara bağlı prostetik greft enfeksiyonlarının insidansını %0,6-3 olarak, 5 yıllık mortalite oranını ise %46 olarak saptamışlardır [80].

Santral sinir sistemi şant enfeksiyonları

Koagülaz negatif stafilokokların, serebrospinal şant enfeksiyonlarının %3-20'sinden sorumlu olduğu bildirilmektedir. Pediatrik yaş grubunda ventrikülo-peritoneal şant uygulanan 820 hastanın %11'inde enfeksiyon geliştiği ve bu enfeksiyonların %53'ünden KNS'lerin izole edildiği bildirilmiştir. Elde edilen KNS'ler içerisinde en sık *S. epidermidis* saptanırken, *S. aureus*'un da tüm şant enfeksiyonlarının %26'sına neden olduğu belirtilmiştir [81]. Düşük dereceli ateş, uyuşukluk, bulantı, kusma ve baş ağrısı gibi klinik semptomlarla ortaya çıkabilir. Olguların çoğunluğunda enfeksiyonun ortadan kalkması için şantın yenilenmesi gerekmektedir [82].

Endokardit

Önceleri koagülaz negatif stafilokokların nadiren doğal kapak endokarditine neden olduğu düşünülürken son yıllarda damar içi araç kullanımının artması nedeniyle KNS'lerin doğal kapakta oluşturdukları endokardit sıklığı da giderek artmaktadır. Uyuşturucu kullanım hikayesi olmayan doğal kapak endokarditlerinin %7-8'inden koagülaz negatif stafilokoklar izole edilmektedir [83]. Olguların çoğunluğuna (%85) *S. epidermidis* neden olduğu, geri kalan %6'sına *S. hominis*, %5'ine de *S. lugdunensis*, *S. capitis*, *S. caprae* ve *S. simulans*'ın neden olduğu bildirilmiştir. KNS'lerin neden olduğu doğal kapak endokarditlerinin kalp yetmezliği ve ölüm oranının *S. aureus*'un neden olduğu endokarditlere benzer olduğu görülmüştür [84]. Koagülaz negatif stafilokokların neden olduğu doğal kapak endokarditlerinin klinik seyri kalp yetmezliği ve yüksek mortalite nedeniyle kötüdür [83].

Koagülaz negatif stafilokoklar prostetik kalp endokarditinin ikinci en önemli etkenidir. Yayınlanan olgu serilerinde *S. epidermidis*'in prostetik kapak endokarditlerinin yaklaşık %40'ından sorumlu olduğu gözlenmektedir. Myokardiyal abse, kalp yetmezliği ve %20'den %70'e kadar değişen oranlarda mortalite gibi komplikasyonlara neden olmaktadır. Enfeksiyonların çoğunluğu ameliyat sonrası 60 gün ile 1 yıl sonra meydana gelmektedir [85].

Kardiyak cihazlar

Kalp pili ilişkili enfeksiyonlarda koagülaz negatif stafilokokların insidansı %0,1-20 arasında değişmektedir. Enfeksiyonların yaklaşık %25'inde ameliyat esnasında etken inoküle edilmektedir [86]. Olguların çoğunda enfeksiyonun başarılı tedavisi için cihazın çıkarılması gerekmektedir [87].

Cerrahi alan enfeksiyonları

S. aureus cerrahi alan enfeksiyonlarından en çok (%20) izole edilen etkindir. Koagülaz negatif stafilokoklar, *S. aureus*'tan sonra cerrahi alan enfeksiyonlarının ikinci en önemli (%14) nedenidir [88]. Bunu Enterokok türleri (%12) takip etmektedir. İkincil bakım hastanesinde, KNS'ler (%10), *S. aureus*'tan (%21) ve Streptokok (%11,2) türlerinden sonra üçüncü en sık izole edilen mikroorganizma olarak saptanmışlardır [89]. Ameliyathane personelinde kaynaklanan enfeksiyon salgınları bildirilmiştir [63].

Endoftalmi

KNSler delici göz yaralanması ve vitrektomi sonrası postoperatif endoftalminin en yaygın nedenidir [90]. KNS'ler endoftalmi olgularında vitreus biyopsilerinden en yaygın izole edilen patojenlerdir. Karacal ve arkadaşları 67 endoftalmi olgusunun %44'ünde KNS'ler patojen olarak bulunmuştur [91]. Endoftalmi olgularının çoğunluğu postoperatif dönemde (%73,5) ve özellikle katarakt cerrahisi sonrası görülmektedir. Diğer olguların %13'ü endojen orijinli, %6'sı intravitreal enjeksiyon, %4'ü keratit ve %3'ü ise travma ile ilişkili bulunmuştur. Tedavide hem sistemik hem de intravitreal antibiyotik kullanılmaktadır [92].

Üriner sistem enfeksiyonları

Staphylococcus saprophyticus kadınlarda *E. coli*'den sonra komplike olmayan üriner sistem enfeksiyonlarının ikinci etkenidir. Tekrarlayan enfeksiyon, akut pyelonefrit, nefrolitiazis, septisemi ve endokardit gibi komplikasyonlarda bildirilmiştir ancak nadirdir [93, 94]. Enfeksiyonların büyük çoğunluğu genç, cinsel aktif kadınlarda görülmektedir. Ayrıca *S. saprophyticus* her yaştaki erkeklerde üriner sistem enfeksiyonuna neden olabilmektedir [93]. *S. saprophyticus* komplike olmayan akut sistin olgularının %3-9'una

neden olmaktadır [95]. Diğer koagülaz negatif türlerden *S. epidermidis*, nadiren üriner sistem enfeksiyonlarına neden olmaktadır. *S. saprophyticus* dışı KNS'lerin oluşturduğu idrar yolu enfeksiyonlarından %80–90 oranında *S. epidermidis* soyutlanmaktadır. *S. epidermidis* daha çok hastanede yatan ve idrar kateteri bulunan hasta grubunda etken olarak karşımıza çıkar. Çoğunlukla yeni üriner sistem operasyonu olan, renal transplantasyon sonrası, nefrolitiazis, ya da obstrüktif üropatisi olan ve üriner kateterli yaşlı hastalardan izole edilmektedir [93].

Pediyatrik enfeksiyonlar

Koagülaz negatif stafilokoklar yenidoğan yoğun bakım ünitesinde nazokomiyal sepsisin en önemli nedenidir ve yeni doğanlarda geç başlangıçlı enfeksiyonların üçte ikisine neden olmaktadır. Yenidoğanlarda en fazla hastalığa neden olan koagülaz negatif stafilokok türü *S. epidermidis*'tir. *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. capitis*, *S. hominis*, *S. warneri* ve *S. saprophyticus*'ta enfeksiyona neden olabilmektedir. Enfeksiyonların çoğunluğu çok düşük doğum ağırlığı (<1500gm), prematüre (<30 haftalık gebelik) ve parenteral beslenme ile ilişkilidir. Koagülaz negatif stafilokoklar ayrıca çocuklarda menenjit ve endokardit ve osteomyelit gibi derin enfeksiyonlara yol açar. Ayrıca ventrikulo-peritoneal şant enfeksiyonlarına ve kateter kullanımı ile ilişkili üriner sistem enfeksiyonlarına neden olabilir. KNS'ler nekrotizan enterokolitle de ilişkili bulunmuştur [96].

Protez eklem enfeksiyonu ve osteomyelit

Protez enfeksiyonlarının %45–55'inden *S. epidermidis* başta olmak üzere KNS'ler soyutlanmaktadır [97]. Sternal osteomyelit; kardiyotorasik cerrahi sonrası gelişen nadir bir komplikasyon olup, olguların %1–4,5'inde gözlenir. *S. epidermidis*'in bu olguların %16–57'sinden sorumlu olduğu belirtilmektedir [98].

2.1.8. Tanı yöntemleri

Koagülaz negatif stafilokokların fenotipik yöntemlerle tanımlanması

Stafilokokların tanımlanması için kullanılan konvansiyonel testler zaman alıcı, emek isteyen yoğun yöntemlerdir ve çok sayıda biyokimyasal teste ihtiyaç duyulmaktadır.

Geleneksel tanımlama yöntemi olarak, nitrat buyyon, üreaz ve Moller'in arjinin dihidrolaz ve ornitin dekarboksilaz buyyon gibi bazı biyokimyasal testler kullanılmaktadır. Biyokimyasal testler ve karbonhidratlardan asit üretimine ek olarak, Polimiksin B (300 ünite) duyarlılığı ve PYR testinin koagülaz negatif stafilocokları tanımlama da faydalı olduğunu bildirilmiştir [99].

Pirolidonil aril amidaz (PYR)Testi

PYR testi koagülaz negatif stafilocokların tanımlanmasında kullanılan yararlı bir testtir. Enterokoklarda olduğu gibi, L-pirolidon- β -naftilamini arilamidaz, L-pirolidon ve β -naftilamini serbest bırakacak şekilde hidroliz eder. β -naftilamin, spesifik renk indikatörü (p-dimetil-aminosinamaldehit) varlığında, kırmızı bir renk oluşturur. Testin avantajı dakikalar içinde yapıp sonuç alınabilmesidir ve testte kullanılan diskler ticari olarak sağlanabilmektedir. *S. aureus* ve *S. epidermidis* PYR testi negatif, *S. haemolyticus*, *S. intermedius*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* ise PYR testi pozitifdir [99].

Polimiksin B duyarlılığı

Polimiksin B duyarlılığının disk difüzyon ile gösterilmesi koagülaz negatif stafilocokların tanımlanmasında yardımcı bir testtir. 0,5 Mc Farland bulanıklığında, süspansiyon hazırlanır ve 300 ünite Polimiksin B ile bir gece inkübasyondan sonra zon çapı değerlendirilir. Zon çapının 10 mm'den küçük olması dirençli olarak kabul edilir. *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. hyicus* ve bazı *S. lugdunensis* kökenleri polimiksin dirençlidir [99].

Ornitin dekarboksilaz testi

Ornitin dekarboksilaz testi, ornitin dekarboksilaz pozitif olan *S. lugdunensis*'in doğrulanmasında kullanılan yararlı bir testtir. Ornitin dekarboksilaz enziminin varlığına bakmak için dekarboksilaz besiyerine ornitin aminoasiti eklenerek besiyeri hazırlanmaktadır. Ornitin dekarboksile olduğunda besiyerinin rengi mor renge dönüşmektedir, ornitin dekarboksile olmadığına besiyeri rengi sarıya dönüşmektedir. Ornitin dekarboksilaz değerlendirilmesinde renk sarıya dönüşürse negatif, mora dönüşürse pozitif olarak değerlendirilir. Ornitin dekarboksilaz testi Stafilocokları tanımlayan

Novobiosin duyarlılığı

Dört insan kökenli stafilokok türü (*S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. hominis* subsp. *novobiosepticus*, *S. xylosus*), yedi hayvan kökenli stafilokok türü (*S. sciuri*, *S. lentus*, *S. gallinarum*, *S. kloosii*, *S. equorum*, *S. arlettae*, *S. vitulinus*) ve bir çevre kökenli tür (*S. succinus*) novobiosine dirençlidir. *S. saprophyticus* dışı novobiosin dirençli türler insan klinik örneklerinden nadiren izole edilmektedir. Novobiosin duyarlılık testi *S. saprophyticus*'un tanımlanmasında yararlı bir testtir [100, 101].

Ticari identifikasyon testleri

Koagülaz negatif Stafilokokların tanısında kullanılan birçok ticari kit bulunmaktadır. Bu testlerin tamamı modifiye edilmiş karbonhidrat testleridir. Standart bakteriyolojik tanımlama testleri (nitrat redüksiyon, üreaz, Voges Proskauer) ve kromojenik enzim-substrate testleri bu testlere uyarlanmıştır [99].

RapiDEC staph

RapiDEC Staph (bioMeriux) 2 saat içinde *S. aureus*, *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus*'u tanımlayan bir kit sistemidir. Bir çalışmada, RapiDEC STAPH'ın 130 *S. aureus* kökeninin %100'ünü, 74 *S. epidermidis* kökeninin %70'ini ve 32 *S. saprophyticus* kökeninin %81'ini doğru tanımladığı bildirilmiştir. 62 diğer koagülaz negatif kökeni ise, dört *S. sciuri* kökenini *S. epidermidis* olarak, diğer 8 kökeni ise (1 *S. hominis*, 3 *S. cohnii* subsp. *urealyticum*, 3 *S. simulans* ve 1 *S. kloosii*) *S. saprophyticus* olarak yanlış tanımlamıştır [102].

API staph

API Staph (bioMeriux) Stafilokok ve Mikrokok türlerini 18-24 saatte tanımlayan bir identifikasyon sistemidir. Bu sistem 19 testten oluşan strip testtir. Veritabanı insan ve hayvan kökenli Stafilokokları, Mikrokok türlerini ve *Rothia mucilaginosa*'dan oluşan 25 takson içermektedir [99].

Vitek gram pozitif identifikasyon (GPI) kartı

Vitek GPI kartları otomatize Vitek bakteriyel tanımlama/duyarlılık testleri sistemi için tasarlanmış gram pozitif tanımlama kartlarıdır. Stafilocok türlerini (11'i insan, 4'ü hayvan kökenli), Streptokok türlerini ve bazı gram pozitif basilleri (*Corynebacterium* türleri, *Erispelothrix rhusiopathiae* ve *Listeria monocytogenes* gibi) tanımlayan kart sistemi 30 kuyucuktan (28'i test ve 2'si kontrol) oluşmaktadır. Koagülaz negatif stafilocoklar bu yöntem ile 10-13 saat arasında tanımlanmaktadır. Yapılan birçok çalışmada GPI kartlarının az karşılaşılan Stafilocok türlerini tanımlamada güvenilir olmadığı ve veritabanının iyileştirilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır [103].

Microscan POS ID panel

Microscan POS ID panel (Dade/Microscan) sistemi, Mikrokok, Stafilocok, Enterokok ve Listeriae dahil gram pozitif bakteriler için tanımlama ve duyarlılık testi kombinasyonuna sahiptir. Panel 27 küçültülmüş konvansiyonel biyokimyasal tanımlama testi içermektedir. Bunlardan 18'i Stafilocoklar ve diğer ilişkili türleri tanımlamak için yararlıdır. Bu panel ile *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus*'un doğru tanımlanabilmesi için 48 saat inkübasyon gereklidir [99].

BBL Cyristal gram pozitif identifikasyon sistemi

Cyristal GP tanımlama sistemi (BD Biosciences) 29 florojenik, kromojenik ve modifiye konvansiyonel testlerden oluşmakta ve *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus* ve *Lactococcus* dahil olmak üzere birçok cinse ait gram pozitif bakterilerin tanımlayabilmektedir. Bu sistem ile 18-24 saatte sonuç alınmaktadır [104].

Koagülaz negatif stafilocokların genotipik yöntemlerle tanımlanması

KNS türlerinin tanımlanmasında Çoğaltılmış Fragment Uzunluk Polimorfizmi (AFLP) analizi, ribotiplendirme, tDNA genler arası bölge uzunluk polimorfizmi (tDNA-ILP) analizi ve DNA dizi analizi yöntemleri, MALDI-TOF MS gibi birçok genotipik yöntem

kullanılmaktadır. Bakterilerin DNA dizi analizi ile tanımlanmasında 16S rRNA gen bölgesi yaygın olarak kullanılmaktadır [105].

Birçok KNS türü birbiri ile yakından ilişkilidir. Bu nedenle 16S DNA dizi analizi yöntemi ile KNS türlerini ayırt etmede yeterli ayrım gücüne sahip olmayabilir [106].

Bu nedenle KNS türlerinin tanımlanmasında *cpn 60* (şaperon veya ısı-şok protein 60), *dnaJ* (ısı-şok protein 40), *rpoB* (RNA polimerazın beta alt ünitesi), *sodA* (süperoksit dismutaz A) ve *tuf* (uzama faktörü Tu) gibi house keeping genler geliştirilmiş ve uygulamaya konmuştur [105].

Genellikle, genotipik yöntemlerin ayrım gücü, tekrarlanabilirliği ve tiplendirme yeteneği fenotipik yöntemlere göre daha yüksektir. Yapılan bir çalışmada insanlardan izole edilen 177 KNS kökeninin 166'sını (%94) otomatize ribotiplendirme yöntemi ile tanımlanmıştır [107].

İnsanlardan, hayvanlardan ve çevreden izole edilen *S. sciuri* grubu 161 kökenin 157'si (%97,5), Belçika'da insanlardan izole edilen 163 klinik kökenin 162'si (%99), ve Kore'de insanlardan izole edilen 122 klinik kökenin 114'ü (%93) tDNA genler arası bölge uzunluk polimorfizmi (tDNA-ILP) analizi ile tanımlanmıştır [105].

Kemik ve eklem enfeksiyonundan izole edilen 212 KNS kökeninin 211'i (%99) DNA dizi analiz yöntemi ile tanımlanmıştır [108].

Heikens ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları çalışmada klinik KNS kökenlerinin tanımlanmasında fenotipik yöntemleri ve genotipik yöntemleri karşılaştırmışlar. 57 KNS kökeninin fenotipik olarak tanımlanmasında API Staph ID testi ve BD Phoenix Otomatize Sistemini kullanırken, genotipik tanımlamada ise 16S rRNA, *tuf* ve *sodA* genlerinin DNA dizi analiz yöntemini kullanmışlardır. KNS türlerinin tanımlanmasında genotipik testlerin fenotipik testlerden üstün olduğunu ve KNS türlerinin tanımlanmasında en iyi yöntemin *tuf* geninin DNA dizi analizi yöntemi olduğunu bildirmişlerdir. API Staph ID testin fenotipik tanımlama için alternatif güvenilir bir test olduğunu belirtmişlerdir [109].

Loonen ve ark'ları 2012 yılında yaptıkları çalışmada, KNS türlerinin tanımlanmasında Vitek 2, ID 32 Staph, 16S rDNA dizi analizi, *tuf* geni dizi analizi ve MALDI-TOF MS

yöntemlerinin etkinliğini karşılaştırmışlar. MALDI-TOF MS yönteminin KNS'lerin tanımlanmasında en hızlı ve doğru tanı yöntemini olduğunu, Vitek 2 ve *tuf* geni DNA dizi analizi yöntemi kombinasyonun alternatif bir tanı yöntemi olabileceğini bildirmişlerdir [110].

Genotipik yöntemler ilk geliştirildiğinde, fenotipik yöntemlere göre daha pahalı ve daha emek isteyen yoğun yöntemlerdi. Ancak bazı yöntemler, örneğin otomatize ribotiplendirme gibi, hala pahalı olmasına rağmen, diğer genotipik yöntemlerin fenotipik yöntemlerden daha pahalı olmadığı bildirilmektedir [105].

2.1.9. Koagülaz negatif stafilokok enfeksiyonlarının tedavisi

KNS'ler de *S. aureus* gibi, *mecA* geni tarafından kodlanan, beta-laktam antibiyotiklere düşük afiniteli bir penisilin bağlayıcı protein olan PBP2a üretmeleri nedeniyle metisiline ve dolayısıyla diğer beta-laktam antibiyotiklere dirençlidirler. Özel bir protein olan ve *mecA* geni tarafından kodlanan PBP2a; Stafilokoklara, semisentetik penisilinlerin yanı sıra, sefalosporinler ve karbapenemlere de direnç kazandırır [111].

Toplum kaynaklı KNS'lerde metisilin direnci %20'lerde iken hastane kökenli enfeksiyonlarda KNS direnci %80'lerin üzerine çıkmış durumdadır. Hastane kaynaklı KNS enfeksiyonlarda gün geçtikçe metisilin direncinin yaygınlaşması nedeniyle KNS'lerin etken olabileceği düşünülen enfeksiyonlarda ampirik tedavide beta-laktam antibiyotiklerin kullanılması riskli bir durumdur [112]. Penisilinaz dirençli penisilinler (örneğin, nafsilin veya oksasilin) yüksek metisilin direnci oranları (%70-%92) nedeniyle tedavi de tercih edilmemektedir [113].

KNS enfeksiyonlarının tedavisinde vankomisin gibi glikopeptid antibiyotikler ilk seçenek olarak kullanılmaktadır. Bir başka glikopeptid antibiyotik olan teikoplaninin vankomisine göre intramuskuler veya intravenöz kullanılabilmesi ve günde tek doz ile yeterli serum düzeylerine ulaşılması gibi çeşitli avantajları vardır. Ancak teikoplanin direnci vankomisine göre daha sık görülmektedir. Hem teikoplanine hem de vankomisine dirençli olan KNS türleri de bildirilmiştir [114].

Glikopeptid direnci gösteren başlıca iki tür *S. epidermidis* ve *S. haemolyticus*'tur. Yapılan in vitro prevalans çalışmalarında *S. epidermidis* için vankomisin direnci %0,03–0,5 arasında bulunmakta iken, *S. haemolyticus* için ise bu oran %5–42'lere kadar ulaşmaktadır [115].

Üçüncü basamak bir yenidoğan ünitesinden 6 ay boyunca toplanan 321 kökeninin dahil edildiği çalışmada, KNS kökenlerinin %3,9'unda azalan vankomisin duyarlılığı saptandığı ve bu kökenlerin %75'inin *S. warneri* olduğu bildirilmiştir [116].

Bir aminoglikozid türevi olan Arbekacin'in KNS türlerine in vitro etkili olduğu kanıtlanmıştır. Yenidoğanlardan izole edilen 180 KNS kökenine karşı Arbekacin'in gentamisin, tobramisin, netilmisin ve amikasin ile karşılaştırıldığında daha iyi in vitro antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu saptanmıştır [117].

Koagülaz negatif stafilokoklarda antibiyotik direnç sorununu çözmek için linezolid, quinupristin/dalfopristin ve tigesiklin gibi yeni antibiyotikler geliştirilmiştir [118].

Tetrasiklinin semi-sentetik türevleri olan ve yeni bir antibiyotik grubu olarak gösterilen, genel olarak bakteriyostatik ajanlar olan oksazolidonlardan linezolidin KNS suşları için etkileri vankomisin ile benzer bulunmuştur. Linezolid, dirençli stafilokok enfeksiyonlarında vankomisine alternatif olarak kullanılmaktadır [118].

Streptogramin olarak adlandırılan quinupristin/dalfopristin kombinasyonu, 50S alt üniteye sinerjistik etki ile protein sentezini inhibe ederler. Bu kombinasyonun *mec-A* pozitif ve negatif KNS'lere karşı in vitro etkinliğinin iyi olduğu saptanmıştır. Ayrıca vankomisin ile kombinasyon tedavilerinin sinerjistik etki gösterdiği belirtilmektedir [119, 120].

2.2. Dezenfektan Maddeler ve Çalışmada Kullanılan Dezenfektan Maddelerin Özellikleri

Biyosid terimi antiseptik, dezenfektan ya da bazı durumlarda koruyucu aktiviteye sahip bileşikler için kullanılmaktadır. Bir bileşiği kullanmak için kapasite gibi sadece tek bir ya da iki veya kullanılan tüm özelliklere sahip olması gerekmektedir [121].

Hastane enfeksiyonlarının önlenmesinde en önemli basamaklardan biri etkin antiseptik ve dezenfektan secimidir. Mikroorganizmaların dezenfektanlara karşı duyarlılıkları ise yapısal özelliklerine bağlı olarak değişmektedir [122].

Kullanılacak dezenfektanın seçimi birçok faktöre bağlıdır. Mikroorganizma türü, dezenfektanın kullanılacağı ortamın kirlilik durumu, dezenfekte edilecek yüzey ve ekipmanın yapısı, dezenfektanın yapısı ve maliyet göz önüne alınarak bu seçim yapılmaktadır. Seçilen bir dezenfektanın da sürekli kullanımı dirençli mikroorganizmaların gelişebilmesine neden olduğundan belli aralıklarla durum değerlendirmesi yapılmalıdır [123].

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

- Sıvı fazlı kimyasal bileşikler; alkoller, aldehidler, fenol ve fenol bileşikleri, halojenler, iyodoforlar, peroksijenler ve kuaterner amonyum bileşikleri gibi.
- Buhar fazlı kimyasal bileşikler; etilen oksid, propilen oksid, formaldehid, β -propiyolakton ve metil bromür gibi [124].

Biyosidlerin etki mekanizmalarına göre sınıflandırılması;

- Elektrofilik olanlar; halojenler, peroksijen bileşikleri, formaldehit, formal salan ajanlar, izotiazolonları, bronopol, bakır, cıva ve gümüş gibi.
- Membrana etkili olanlar; kuaterner amonyum bileşikleri, biguanidler, fenoller, alkoller, parabenler, piritiyon ve zayıf asitler gibi.

Oksidanlar, klor ve peroksitler gibi hızlı öldürücü ajanları içermekte olup organik maddeyi radikal aracılı reaksiyonlar ile doğrudan okside etmektedir [125].

Elektrofilik ajanlar gümüş, bakır ve cıva gibi inorganik iyonlar, formaldehit ve izotiyazoller gibi organik biyosidlerin içermektedir. Bu biyosidler enzimleri inaktive etmek için hücresel nükleofillerle kovalent tepkimeye girerler ve bunun kanıtı olarak hücresel serbest radikallerin oluşumu ölümcül etkiye katkıda bulunmaktadır [126].

Klorheksidin ve kuaterner amonyum bileşikleri gibi katyonik membrana etkin biyosidler ve fenoksietanol gibi alkoller membranları destabilize ederek hızlı hücre parçalamaya yol açmaktadırlar. Sorbik ve benzoik asit gibi zayıf asitler hücre membranının uygun pH dengesini koruma yeteneğine müdahale ederek yaygın metabolizma bozulması ve hücre içi asitleştirilmesiyle sonuçlanmaktadır. Piritiyon da zayıf bir protonofor olarak sınıflandırılmaktadır [126].

2.2.1. Klorheksidin

Klorheksidin diglukonat Kuaterner amonyum yapılı, bis-biguanid bileşiğidir. İlk kez 1954 yılında bir antimikrobiyal ajan olarak tanımlanmıştır. Asetat (diasetat), glukonat ve hidroklorür tuzları olarak bulunmaktadır. Antiseptik amaçlı en yaygın kullanılan biyosidlerden biridir [127, 128].

El yıkama, oral ürünler ve bir koruyucu madde olarak kullanılmaktadır. Klorheksidin diglukonat düşük cilt tahrişi ve geniş spektrumlu aktivitesi ile bakterisidal bir ajandır. Hem bakteriler hem de mayalarda alımı hızlıdır ancak düşük pH ve konsantrasyonda aktivitesi azalmaktadır [129].

Pozitif yükü nedeniyle katyonik özellik taşır ve bakteri hücre duvarı, ekstrasellüler polisakkaritler, hidroksiapatit, pelikül, tükürük müsinleri ve oral mukoza gibi negatif yüklü yüzeylere afinite gösterir. Klorheksidin diglukonat; bağlandığı bu dokulardan yavaşça salınarak uzun süreli etkinlik gösterir. Düşük konsantrasyonda bakteriyostatik, yüksek konsantrasyonda ise hücresel içeriğini irreversible olarak çökelttiğinden bakterisittir. Katyonik yapıdaki klorheksidin diglukonat bakteri yüzeyindeki anyonik yapılara, örneğin gram (+) bakterilerde fosfat gruplarına, gram (-) bakterilerde yüzeydeki lipopolisakkaritlere bağlanır. Bu bağlantı bakteri yüzeyinin bütünlüğünün bozulmasına neden olur. Sitoplazmik membran zarar gördüğünde ilk gözlenen madde potasyum iyonudur. Sitoplazmik membranın geçirgenliğinin değişmesi, sitoplazmik proteinlerin çökmesini artırır, hücresel ozmotik dengeyi değiştirir, metabolizmayı, hücre büyüme ve bölünmesini zarara uğratar [127].

2.2.2. Benzalkonyum klorür

Benzalkonyum klorür 1935 yılından beri klinik kullanımda olan bir Kuaterner amonyum bileşiğidir [130].

Kuaterner amonyum bileşiklerinin CDC (Central of Disease Control and Prevention) tarafından antiseptik değil de dezenfektan olarak kritik olmayan yüzeylerde (zemin, mobilya, duvar gibi) kullanımı önerilmektedir [124].

Benzalkonyum klorür gıda endüstrisinde, gıda işleme hatları ve yüzeylerinin sanitasyonunda dezenfektan ve katyonik yüzey aktif ajan olarak yaygın kullanılan geniş spektrumlu bir antimikrobiyal ajandır. Sağlık kuruluşlarında, evlerde dezenfektan ve antiseptik olarak ayrıca düşük konsantrasyonda ilaçlarda antimikrobiyal koruyucu olarak kullanılmaktadır. Benzalkonyum klorür, benzil klorür ile alkildimetilamin arasında bir nükleofilik yer değiştirme reaksiyonu ürünüdür [131, 132].

Benzalkonyum klorür genel membran geçirgenliğine etki etmektedir. Düşük konsantrasyonlarda sitoplazmik maddelerin sitolitik sızıntısıyla birlikte dış membran hasarına neden olur ve böylece hücre içine alımını ve girişini sağlamaktadır. Yüksek konsantrasyonlarda, karboksilik grupları hedef almakta ve bakteriyel sitoplazmada genel pıhtılaşmaya neden olmaktadır [133, 134].

Bakteri hücrelerinin en dış yüzeyi genellikle iki değerli katyonların varlığı ile stabilize edilmiş negatif yük taşımaktadır. Bu negatif yük gram pozitif bakterilerde teikoik asit ve polisakkarit elemanlar ile ilişkili iken, gram negatif bakterilerde lipopolisakkarit ve stoplazmik membran ile ilişkilidir. Birçok antimikrobiyal ajan katyoniktir ve bu nedenle bakteri hücrelerine yüksek bağlanma afinitesine sahiptir. Genellikle, katyonik antimikrobiyallerin hücre yüzeyi ile etkileşime girebilmeleri ve sitoplazmik membran ile bütünleşebilmeleri için hidrofobik bölgeyle birlikte bir kuvvetli pozitif yük gerekmektedir [135].

Bir antiseptik ajanın uygunluğunu değerlendirmek ve biyouyumlu antibakteriyel ajanı seçmek için hem mikrobisidal aktivite hem de sitotoksik etkisi dikkate alınmalıdır [136].

Benzalkonyum klorür bazlı dezenfektanlar toksik olmayan, bozulmaya yol açmayan ve kullanılan dilüsyonlarda kokusuz, noniyonik ve amfolitik yüzey aktif ajanlardır. Sağlık hizmetleri kaynaklı enfeksiyonların en yaygın nedenlerinden biri çalışanların elleri ile kişiden kişi bulaşmasıdır [135].

Benzalkonyum klorür el dezenfektanı normal el yıkama için en popüler durulanmayan el dezenfektanı formülüdür. Ayrıca koruyucu olarak benzalkonyum klorür içeren intranazal ürünlerin uzun ve kısa vadeli klinik kullanımda güvenli olduğu ve iyi tolare edildiği görülmektedir [132].

2.3. Bakterilerde Dezenfektan ve Antiseptik Maddelere Direnç

Antiseptik ve dezenfektanlar lokal ve sert yüzey uygulamalarında çeşitli hastaneler ve diğer sağlık hizmetleri ortamlarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle, enfeksiyon kontrol uygulamalarının önemli bir parçasıdır ve hastane enfeksiyonlarının önlenmesinde yardımcı olmaktadır [137].

Klinik uygulamada biyosidler antiseptik veya dezenfektan olarak ve ayrıca farmasötik, kozmetik ve diğer koruyucu amaçlar için kullanılmaktadır [138].

Biyosid aktivitesi, özellikle konsantrasyon, temas süresi, pH, sıcaklık, teması engelleyen malzeme varlığı, mikroorganizmanın tipi, sayısı, konumu gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Bazı ajanlar, örneğin klorheksidin tuzları ve kuaterner amonyum bileşikleri, her üç amaç (antisepsi, dezenfeksiyon ve koruma) için kullanılmaktadır [139].

Biyosidlere karşı bakteriyel direncin ortaya çıkması yeni bir fenomen değildir, özellikle katyonik biyosid içeren ürünlere karşı direnç 1950'lerde tanımlanmıştır. Biyosidlerin düşük (inhibitör) konsantrasyonlarına karşı bakteriyel direncin ortaya çıktığı başta laboratuvar çalışmaları olmak üzere çevre araştırmalarında da yaygın olarak bildirilmiştir [140].

Azalmış biyosid duyarlılığı için birkaç olası nedeni vardır, özellikle biosid kalıntılarının ortamda var olması, bakterilerde düşük düzeyde duyarsızlık geliştirebilir. Hastanelerde biyosid solüsyonlarının eksildikçe üzerine ilave edilmesi yetersiz konsantrasyona neden olduğu için istenmeyen bir uygulamadır. Biyosidlerin kirli ortamlarda ve kirletici maddeye karşı yetersiz süre uygulanması biyosidlerin yanlış kullanımına örnektir [139].

Antiseptik ve dezenfektan maddelere bakteriyel adaptasyon ve direnç oluşumu, bu maddelerin hastaneler ve pek çok ortamda yaygın kullanımı ve önerilen kullanım konsantrasyonlarının altında ya da üstünde kullanımına bağlı bilinçsiz ve yanlış uygulamaya bağlı olarak görülebilir [138].

Antiseptik ve dezenfektan maddelerin ya da genel bir ifade ile biyosidlerin antibiyotiklerden farklı olarak bakteri hücresinde spesifik bir hedef bölgeleri yoktur aksine çok sayıda hedef bölgeleri bulunmaktadır [13].

Bakterilerde biyosid direnci antibiyotiklerde de olduğu gibi doğal direnç ve kazanılmış direnç olarak iki şekilde oluşmaktadır [141].

Doğal direnç (doğal duyarsızlık) organizmanın doğal bir özelliğidir. Genellikle antibiyotik ya da biyosid alımında azalma olarak görünür ve geçirmezlik engeller sonucu olarak ortaya çıkmaktadır [139].

Kazanılmış dirençte ise bakterilerin kromozomlarındaki mutasyon ya da plazmid veya transpozonlar aracılığı ile kazandığı direnç tanımlanmaktadır [137, 139].

2.3.1. Doğal direnç

Doğal direnç, kromozomlar tarafından kontrol edilen ve bakteride doğal olarak var olan bir özelliktir. Antiseptik ya da dezenfektan maddeler hedef bölgelerine ulaşabilmek için bakteri dış tabakalarını geçmek zorundadırlar. Bu tabakaların doğası ve bileşimi organizmanın tipine bağlıdır ve bazı biyosidlere karşı bariyer görevi üstlenebilirler, böylece geçirgenliğin azalmasıyla bu maddelere karşı duyarlılıkta azalmaktadır [137, 141, 142].

Doğal direncin diğer ve daha az sıklıkla görülen bir nedeni, burada yapısal olarak bulunan enzimlerin biyosidi parçalayabilmesidir [137].

Diğer bir doğal direnç mekanizması ise biyofilm oluşumudur. Bu aynı zamanda bir fizyolojik (fenotipik) uyumdur. Katı yüzeylerle mikroorganizmanın teması biyofilm oluşumuna neden olur [143].

Biyofilm tabakasında yoğun bir şekilde ekzopolisakkarit polimerleri ve bu polimerler içerisinde bakteriyel hücreler kolonize olmuş durumda bulunur. Biyofilm tabakası içerisinde üreyen bakterilerin fizyolojik özellikleri de etkilenir ve değişime uğrar. Biyofilm içindeki bakteriler, sıvı ortamda serbest halde üreyen bakterilere göre dezenfektanlara ve antibiyotiklere daha dirençlidir [144].

Biyofilm içindeki bakteri azalmış duyarlılığı çeşitli nedenlerle açıklanabilir.

- Biyosidin biyofilm içerisindeki bakteriye ulaşmasının zorlaşması ve bakteri hücrelerine biyosid girişinin azalması,
- Biyofilm ile dezenfektan madde arasında kimyasal etkileşim,
- Besin ve oksijen eksikliğine bağlı olarak mikroçevre değişimi,
- Biyofilm içinde düşük biyosid konsantrasyonlarında etkili yıkıcı enzim üretimi,
- Biyofilm içerisinde nötralizör kimyasal maddelerin bulunması,
- Biyofilm içerisindeki bakteriler arasında genetik bilgi aktarımının oluşabilmesidir [137, 145].

Biyofilm biyosidin girişine engel olurken, mikroorganizma için gerekli gıda maddelerinin geçişine izin vermektedir. Biyofilm üreten bakteriler antiseptik solüsyonlar içinde uzun süre canlı kalabilmektedirler. Biyofilm içindeki bakterilerin yeniden pasajları yapıldığında bunlar dezenfektanlara duyarlı olmaktadır [143].

Gram negatif bakterilerde doğal direnç

Bakteriyel sporlar, mikobakteriler ve değişik gram negatif bakteriler doğal olarak birçok dezenfektana dirençlidir. Genel olarak gram-negatif bakteriler gram-pozitif bakterilere göre dezenfektanlara daha dirençlidir. Gram-negatif bakterilerdeki dış membran tabakası bir fiziksel bariyer olarak rol oynar ve antimikrobiyal maddelerin hücreye girişini kısıtlar. Yapılan bir çalışmada gram negatif ve gram pozitif bakterilerde çeşitli dezenfektanların MİK değerleri araştırılmıştır, bu çalışmada gram negatif bakterilerin MİK değerlerinin gram pozitif bakterilerin MİK değerlerinden daha yüksek olduğu bulunmuştur [137]. Lipopolisakkarit (LPS) molekülleri hidrofobik maddelerin hücre içine girişini engeller. Gram-negatif bakteriler arasında, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*,

Proteus spp. ve *Providencia stuartii* birçok dezenfektanlara en fazla dirençli olan bakterilerdir [144].

P. aeruginosa'nın dezenfektanlara ve antibiyotiklere daha dirençli olmasının nedeni temel olarak dış membranlarının daha az geçirgen olmasına bağlıdır. *P. aeruginosa*'larda hücre duvarının yüksek magnezyum içeriği, LPS kompozisyonundaki farklılık ve küçük porin moleküllerinin varlığı dezenfektan maddenin hücreye difüzyonunu zorlaştırır. *B. cepacia*'nın LPS moleküllerinde yüksek miktarda fosfat-bağlı arabinoz bulunması, dış membran tabakasının polimiksin antibiyotiklere ve katyonik dezenfektanlara afinitesini azaltır. *Proteus* türlerindeki LPS molekülleri klorheksidine karşı intrensek dirençten sorumlu tutulmaktadır [137].

Acinetobacter'ler doğal olarak antimikrobiyal ajanlara karşı direnç geliştirme özelliğine sahiptir. Bu bakteriler aynı zamanda kuru yüzeylerde de uzun süre dayanabildikleri için hastane enfeksiyonlarında önemli rol oynamaktadırlar. *Acinetobacter*'lerin dezenfektanlara azalmış duyarlılığı ve giderek artan MİK değerlerinin bir başka nedeni ise sürekli klorheksidin glukonat gibi bazı dezenfektanların düşük düzey konsantrasyonlarına maruz kalmalarıdır [146].

Gram pozitif bakterilerde doğal direnç

Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı peptidoglikan ve teikoik asitten oluşmaktadır. Bu maddeler antiseptik ve dezenfektanlara karşı etkili bir engel oluşturmazlar. Yüksek moleküler ağırlıklı çeşitli maddeler gram-pozitif bakteri hücre duvarını kolaylıkla geçerek hücre içine ulaşabilmektedir. Bu özellik, klorheksidin ve kuaterner amonyum bileşikleri gibi birçok antibakteriyel ajanın gram-pozitif bakterilere etkili olmasını açıklayabilmektedir, ancak bakteri üreme hızı ve üreme ortamındaki besin kısıtlamaları ile peptidoglikan tabaka kalınlığında ve çapraz bağlanmalarındaki değişimle dezenfektan maddelere karşı duyarlılık değişebilmektedir [137].

Bazı *S. aureus*'ların mukoid oluşturan suşları doğada bulunmaktadır, bu suşlar slaym tabakası ile çevrilidir. Bu yüzden mukoid oluşturan *S. aureus* suşları mukoid oluşturmeyen suşlara göre dezenfektanlara daha dirençlidir [137].

2.3.2. Kazanılmış direnç

Antiseptik ve dezenfektan maddelere direnç kazanımı, kromozomlarda mutasyon, plazmid veya transpozonlar aracılığı ile genetik materyelin kazanım yoluyla oluşmaktadır [137, 139]. Bakterilerde plazmid aracılığıyla kodlanan dezenfektan ve antiseptik direnç mekanizmaları dışarı atım (efflux), azalmış alım (uptake) ve dış membran proteinleri değişimi ile oluşmaktadır. Bakterilerde klorheksidin, KAB (kuaterner amonyum bileşiği), triklozon, diamitler, akridinler ve etityum bromite karşı artmış toleransından plazmitleri sorumlu tutan yayınlar da bulunmaktadır [137].

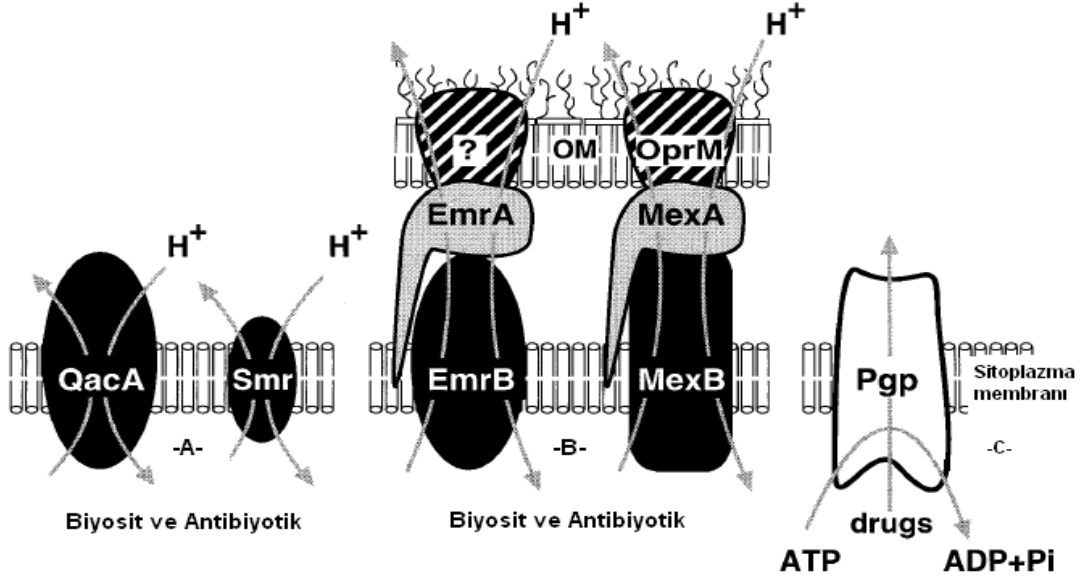
Bakterilerde bulunan bazı “efflux” sistemleri geniş spektrumlu olup, yapısal olarak birbiri ile ilişkisiz olan birçok dezenfektan maddeyi hücre dışına atabilmektedir. Dezenfektan direncinde rol oynayan “efflux” pompaları “multidrug efflux (MDR)” sistemleri olarak bilinmektedir. Bu “efflux” sisteminden sorumlu genler genellikle plazmidler tarafından kodlanmaktadır [144].

Bakteriyel efflux sistemleri genellikle beş sınıfa ayrılmaktadırlar. Bunlar:

- Small multidrug resistance (SMR) family” (günümüzde “drug/metabolite transporter (DMT) superfamily” içerisinde sınıflandırılmakta), örneğin; *Escherichia coli*’de *emrE*, *S. aureus*’da *qacC* ve *qacD*, gram negatif bakterilerde *qacE* gibi.
- MFS (major facilitator superfamily) örneğin; *Bacillus subtilis*’de *bmr*, *E. coli*’de *emrB*, *S. aureus*’da *qacA* ve *qacB*,
- ABC (ATP-binding cassette family),
- RND (resistance-nodulation-division family) örneğin; *Pseudomonas aeruginosa*’da *mexB*, *E. coli*’de *acrB*,
- MATE (multidrug and toxic compound extrusion family) örneğin; *S. aureus*’larda *mepA* gibi [142, 147, 148].

Şekil 2.2.’de çoklu ilaç dışarı atılım sistemleri (multidrug efflux systems MDR) şematize olarak gösterilmektedir.

Çoklu ilaç dışarı atılım sistemlerinden sadece ABC'de (ATP-binding cassette family) gereken enerji kullanılarak ATP hidrolizi ile elde edilmektedir. Diğer sistemlerde ise atılım proton gradyanı ile oluşmaktadır [147].



Şekil 2.2. Çoklu ilaç dışarı atılım sistemlerinin örnekleri [147].

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

Biyosidler, bakteri hücresinden atılımının artması, bakteri hücresine alımının azalması ile hücre içerisinde etkili konsantrasyonuna ulaşamaz ve azalmış duyarlılık ya da direnç oluşmaktadır [134].

Gram negatif bakterilerde kazanılmış direnç

Gram negatif bakterilerin antiseptik ve dezenfektanlara direnci plazmidlerin olası rolünü zaman zaman incelenip raporlanmıştır [137]. Gram negatif bakterilerde plazmid aracılığı ile katyonik biyosidlere direnç genellikle *emrE*, *qacE* ve *qacEΔI* genleri tarafından kodlanmaktadır [149].

RP1 plazmidi, *P. aeruginosa*'nın KAB, klorheksidin, iyot veya klorlanmış fenol bileşiklerine direnci etkilemezken, heksaklorofene karşı direnci artırdığı görülmüştür; ama heksaklorofen gram negatiflerden ziyade gram pozitif bakterilere karşı kullanılmaktadır. Bu plazmidin (karbenisilin, tetrasiklin, neomisin ve kanamisin direnci kodlar) *E. coli* veya *P. aeruginosa*'ya transformasyonu mikroorganizmaların antiseptiklere karşı duyarlılığını artırmamıştır [137, 150].

Providencia stuartii kökenleri, civa, katyonik dezenfektanlar (klorheksidin, KAB) ve antibiyotiklere karşı oldukça toleran olabilir. *P. stuartii*, *Pseudomonas spp* ve *Proteus spp*'deki biyosid ile antibiotik direnci arasındaki ilişkide plazmidlerin rolü olduğuna dair veri yoktur. Diğer hastane izolatlarında saptanan yüksek seviyeli dezenfektan direncinin plazmidik ilişkisi konusunda açık delil yoktur. Klorheksidin ve KAB'ne karşı yüksek seviyeli tolerans intrinsik olabilir veya koromozomal mutasyon sonucu kazanılmış olabilir. Katyonik ajanların yaygın kullanımı biyosid dirençli kökenlerin seleksiyonundan sorumlu olabilirse de bu hükmü doğrulayacak fazla veri yoktur. Yapılan çalışmaların sonucunda normal koşullarda klorheksidin veya KAB direncini transfer etmenin zor olduğunu ve gram negatif bakterilerde biyosidlere karşı plazmid aracılıklı direncin olası olmayan bir durum olduğu görülmüştür. Aksine, R124 plazmidi *E. coli*'de *OmpF* dış membran proteinini değiştirir ve bu plazmidi içeren bakteriler KAB (setrimid) ve diğer maddelere karşı daha dirençli hale gelir. Formaldehit ve endüstriyel biyosidlere karşı bakteri direnci mekanizmaları plazmid tarafından kodlanabilir. Hücre yüzeyindeki değişiklikler (dış membran proteinleri) ve formaldehit dehidrogenaz bu olaydan sorumlu olabilir. Ayrıca TOM plazmidi *Burkholderia cepacia*'da toluen ve fenol degradasyonundan sorumlu enzimleri kodlamaktadır [137, 150].

Gram-negatif bakterilerde kromozomlar tarafından kodlanan “efflux” sistemleri (*marRAB*, *acrAB*, *soxRS* genleri) direnç gelişiminde önemli rol oynar. Enterik bakterilerdeki *acr* geni çoklu ilaç dışarı atılım sistemleri (multidrug efflux systems = MDR) içinde yer alır. MDR sistemine bağlı dezenfektan direnci plazmid aracılı olmayıp kromozomal niteliktedir. *Acr* gen lokusundaki mutasyon, bakteriyi hidrofobik antibiyotiklere, boyalara ve deterjanlara daha duyarlı hale getirebilmektedir [144].

A. baumannii'nin small multidrug resistance (SMR) efluks pompalarını kodlayan *qacE1* geni ve Resistance Nodulation Cell Division (RND) süper ailesinin üyelerinden olan

AdeABC pompa sisteminin ve AdeIJK pompa sisteminin çoklu ilaç direncinde çok önemli rolü olduğu bilinmektedir [151, 152].

Triklozana duyarlı *E. coli* suşlarında, triklozanın enoyl redüktaz enzimini inhibe ettiği saptanmıştır. Ancak triklozana dirençli mutantlarda bu enzim inhibe olmamaktadır. Bu durum nokta mutasyonuna bağlanmaktadır [144].

Gram pozitif bakterilerde kazanılmış direnç

Gram pozitif bakterilerde dezenfektanlara plazmid aracılığı ile gelişen direnç mekanizmalarının net olarak tanımlandığı tek bakteri stafilokoklardır. *S. aureus*'larda plazmid aracılığı ile gelişen direnç mekanizmalarının, en az üç farklı determinant (*qac* genleri) tarafından kodlandığı belirlenmiştir. Bu genler birçok dezenfektana azalmış duyarlılığı kodlamakta olup plazmid üzerinde de bulunabilmeleri nedeniyle önemlidir. Bu genler protona bağımlı “export” proteinlerini kodlamaktadır. Dezenfektanlara karşı artmış MİK değerlerinin *qac* genlerini taşıyan MRSA suşları arasında yaygın bir şekilde görüldüğü bildirilmektedir. Dört ayrı *qac* geni tanımlanmıştır (*qacA*, *qacB*, *qacC*, *qacD* genleri). *qacA/B* gen ailesi en önemlileridir [137, 144].

qacA (çoklu ilaç direnci plazmidlerinin pSK1 ailesi, aynı zamanda beta-laktamaz ve ağır metal direnci ailesi), *qacB* (beta-laktamaz ve ağır metal direnci ailesi), *qacC* (küçük, <3 kilobayt veya büyük konjugatif plazmidler) ve *qacD* (büyük, 50 kilobayt, konjugatif çoklu direnç plazmidleri) çoklu ilaç direnci belirleyicisi genler tarafından kodlanmaktadır [150].

qacA geni kuaterner amonyum bileşiklerine, klorheksidin, diamidinlere, akridinlere ve etidyum bromide direnç ile ilgilidir. *qacB* geni ağır metal direnci ile ilgili plazmidin üzerinde bulunmaktadır, kuaterner amonyum bileşikleri, akridinlere ve etidyum bromid direnci ile ilgilidir. *qacC* ve *qacD* genleri ise bazı kuaterner amonyum bileşiklerine ve etidyum bromide direnci kodlamaktadır. Plazmid aracılı dışarı atılım pompaları gram pozitif bakterilerde metaller, kuaterner amonyum bileşikleri, klorheksidin, diamidinlere ve akridinlere direnç oluşumu için önemlidir [137].

Diğer gram pozitif bakterilerde plazmid aracılı biyosid direnci ise *Corynebacterium jeikeium*'un etidyum bromid ve heksaklorofene diğer korinebakterilerden daha tolerandır; ama bu toleransta plazmidlerin rolü kanıtlanamamıştır. Vankomisin ve yüksek düzey

aminoglikozit direnci gösteren *Enterococcus faecium* kökenlerinin biyosidlere karşı, duyarlı kökenlerden daha dirençli olmadıkları saptanmıştır. Klorheksidin, diş hekimliği alanında yaygın kullanılmasına rağmen *Streptococcus mutans* buna duyarlı kalmıştır. *Listeria* cinsi bakterilerde benzalkonium klorür, hekzamidin dizetionat ve etidyum bromide karşı %6,7 oranında rastlanan çoklu biyosid direncinin stafilokoklardan orijin almış olabileceği belirtilmiştir, ama bu konuda destekleyici çalışma yapılmamıştır. Kısaca stafilokok harici gram pozitif bakterilerde biyosidlere karşı plazmid aracılı bir direncin net bulgusu günümüzde yoktur [137, 150].

Bakterilerde biyosidlere karşı direnç oluşum mekanizmalarından bir diğeri de zamanla biyosid kullanımı sonucu ortamda kalan biyosid kalıntılara bağlı düşük düzeyde duyarsızlık ya da direnç gelişimi olabileceği belirtilmektedir [139].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Örneklerin Toplanması

Çalışmaya Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına Ekim 2010 - Ağustos 2011 tarihleri arasında yatan hastalardan gönderilen kan kültürü ve kateter içi kan kültürü örneklerinden izole edilen 50 koagülaz negatif stafilokok kökeni ile pozitif kontrol amaçlı iki referans köken (*qacA/B* geni pozitif MRSA (Kobayashi, Naguchi) ve *Staphylococcus aureus* ATCC 6538) dahil edilmiştir. Kantitatif süspansiyon testinde ayrıca *Enterococcus hirae* ATCC 10541, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 ve *Escherichia coli* NCTC 10538 standart kökenleri kullanılmıştır.

Laboratuara gelen klinik örneklerin ekimleri %5 koyun kanlı agar ve EMB agara yapılmış, 36°C’de 24-48 saatlik inkübasyonun ardından üreyen koloniler değerlendirmeye alınmıştır. Boyalı mikroskopik incelemede gram pozitif kok morfolojisinde olan, katalaz pozitif ve koagülaz negatif bakterilere API 20 NE (Biomerieux, Fransa) ticari kiti ve MicroScan WalkAway tanımlama sistemi (Siemens, Almanya) ile ileri tiplendirme yapılmış ve koagülaz negatif stafilokok oldukları belirlenmiştir. Kesin tanısı konulan bakterilerin saf kültürlerinden saklama şişelerine (Mikrobank’lere) konularak çalışmaların yapılacağı güne kadar -20 santigratta (°C) muhafaza edildi. Bu çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Kurumsal Araştırma Değerlendirme Komisyonu (Etik Kurul) 15.03.2013 tarih ve 85 no’lu kararı ile kabul edildi.

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.2.1. Kullanılan cihazlar

- Isı döngü cihazı, Gene Amp PZR System 9700 (Applied Biosystems, ABD)
- Elektroforez Güç Kaynağı (Wealtec, Tayvan)
- Elektroforez Tankı (Agagel Mini Biometra, Almanya)
- Jel Görüntüleme Sistemi (Syngene Bio Imaging, Ingenius, İngiltere)
- Soğutmalı Mikrosantrifüj (Hettich, Almanya)
- Mikrodalga Fırın (Arçelik, Türkiye)

- Etüv (Nüve, Türkiye)
- Pastör Fırını (Electro-mag, Türkiye)
- Otoklav (Sanyo, Japonya)
- Vorteks Cihazı (VELP, Scientifica, Almanya)
- pH Metre (Fisher Scientific, ABD)
- Hassas Terazı (Schimadzu, Japonya)
- Mikropipetler (Eppendorf Research, Almanya)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- Derin Dondurucu, -20 °C (Uğur, Türkiye)
- Derin Dondurucu, -80 °C (Nuaire, Japonya)
- Isı Bloğu (Bio TDB100, Boeco, Almanya)
- Mikrosantrifüj (Beckman Coulter, Almanya)
- Dansitometre cihazı (Microcan turbidity meter) (Behring, İngiltere)
- Microscan autoscan 4 (Siemens, Almanya)
- NanoDrop ND 1000 UV-Vis Spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD)

3.2.2. Kullanılan besiyerleri ve ticari kitler

- Triptik Soy Agar (Fluka, Hindistan)
- Mueller Hinton Broth (Fluka, İspanya)
- Mueller Hinton Agar (Himedia, Hindistan)

3.2.3. Kullanılan kimyasal maddeler

- Bovine albümin (Merck, Almanya)
- Tripton (Fluka, İsviçre)
- NaCl (Fluka, İsviçre)
- Tween-80 (Fluka, İsviçre)
- Saponin (Fluka, İsviçre)
- L-histidine (Merck, Almanya)
- Lesitin soya %30 (Himedia, Hindistan)
- Sodyum tiyosülfat (Fluka, İsviçre)
- Magnezyum klorür (Panreac, İspanya)

- Kalsiyum klorür (Riedel- de Haen, Almanya)
- Sodyum bikarbonat (Sigma, ABD)
- 0,45 µm çaplı filtre (Corning, Almanya)
- U tabanlı mikropalak (LP italiana, İtalya)
- Benzalkonyum klorür (Sigma, Danimarka)
- Klorheksidin diglukonat solüsyon (Sigma, İspanya)
- Tris-Hidroklorür (Amresco, Kanada)
- Borik Asit (Applichem, Almanya)
- Etilen Diamin Tetra Asetik Asit (EDTA) (J.T. Baker, Hollanda)
- Agaroz (Sigma, ABD)
- Etidyum Bromid (Sigma, ABD)
- Primerler (İontek, Türkiye)
- MgCl₂ (Bioron, Almanya)
- dNTP (Bioron, Almanya)
- Buffer (Bioron, Almanya)
- Taq Polimeraz (Bioron, Almanya)
- DNase, RNase Free Su
- MgCl₂ (Fermentas, Litvanya)

3.3. Yöntemler

3.3.1. Besiyerlerinin hazırlanması

Triptik Soy Agar'ın (TSA) hazırlanması

Besiyerinin içeriği:

Kazein pepton	15 gram/Litre (g/L)
Soya pepton	5 g/L
Sodyum klorür	5 g/L
Agar	15 g/L
pH	7,3±0,2

Toz besiyerinden 40 g tartılmış ve üzerine 1 L'ye tamamlayacak şekilde distile su eklenerek otoklavda 121°C'de 15 dakika 1 atm basınçta sterilize edilmiştir. Steril petri

kaplarına kalınlığı 4 mm olacak şekilde 25'er mililitre (ml) dökülerek katılaşıncaya kadar bekletilerek ve kullanılıncaya kadar +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

Mueller Hinton Agar'ın hazırlanması

Besiyerinin içeriği

Sığır infüzyonu	300 g/L
Kazein asit hidrolizat	17,50 g/L
Nişasta	1,50 g/L
Agar	17,00 g/L
pH	7,3±0,2

Toz besiyerinden 38 g tartılmış ve üzerine 1 L'ye tamamlayacak şekilde distile su eklenerek otoklavda 121°C'de 15 dakika 1 atm basınçta sterilize edilmiştir. Steril petri kaplarına kalınlığı 4 mm olacak şekilde 25'er ml dökülerek katılaşıncaya kadar bekletildi ve kullanılıncaya kadar +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

Mueller Hinton Broth'ın hazırlanması

Besiyerinin içeriği

Sığır infüzyonu	2 g/L
Nişasta	1,5 g/L
Kazein hidrolizat	17,5 g/L
pH	7,4±0,2

Toz besiyerinden 23 g tartılmış ve üzerine 1 L'ye tamamlayacak şekilde distile su eklenerek otoklavda 121°C'de 15 dakika 1 atm basınçta sterilize edilmiştir ve kullanılıncaya kadar +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

3.4. Dezenfektan Duyarlılığının Araştırılması

Koagülaz negatif stafilokok suşlarının dezenfektan duyarlılıklarının araştırılmasında, Avrupa Birliği ülkelerinde bir kimyasal dezenfektanın ya da bir antiseptiğin bakterisidal

etkinliğini değerlendirmek için belirlenmiş bir protokol olan “kantitatif süspansiyon test yöntemi” (prEN 13727: Nisan 2009) kullanılmıştır.

3.4.1. Kantitatif süspansiyon test yöntemi

Kantitatif süspansiyon test yönteminde, bakteri süspansiyonu hazırlanır ve kirletici madde ile karıştırıldıktan sonra sert su içerisinde dilüe edilmiş dezenfektanla muamele edilir. Belirli temas sürelerinin ardından bu karışımdan belli miktarda alınır ve dezenfektan etkisini durdurmak için nötralizör içine konulur. Farklı konsantrasyondaki dezenfektanlarla muamele edilen bakteri süspansiyonları temas sürelerinin sonunda pasajlanarak inkübasyona bırakılır. 24-48 saat sonra oluşan koloniler sayılır. Örnekte canlı kalan bakteri sayısı belirlenir ve logaritmik azalma hesaplanır. Yüzey dezenfeksiyonunda, dezenfektanın etkili kabul edilmesi için canlı bakteri sayısında en az 5 log.’luk (10^{-5}) azalma olması gerekmektedir. Hijyenik ve cerrahi el yıkamada en az 3 log.’luk (10^{-3}) azalma olması gerekmektedir.

Kantitatif süspansiyon testinde kullanılan solüsyonlar:

Dilüentin hazırlaması

- Tripton	1,0 g.
-Sodyum Klorür	8,5 g.
-Distile Su	1000 ml.

Otoklavda sterilize edilir.

Nötralizörün hazırlaması

-Tween 80	30 g.
-Saponin	30 g.
-L-histidin	1 g.
-Lesitin	3 g.
-Sodyum Tiyosülfat	5 g.

1000 ml dilüent veya 0,0025 mol/L fosfat tamponu içinde hazırlanır.

Sert sunun hazırlaması

Solüsyon A

-MgCl ₂	19,84 g.
-CaCl ₂	46,24 g.
-Distile su	1000 ml.

*Otoklavda sterilize edilir, buzdolabında en fazla 1 ay saklanarak kullanılır.

Solüsyon B

-NaHCO ₃	35,02 g.
-Distile su	1000 ml.

*Filtrasyon ile sterilize edilir, buzdolabında en fazla 1 hafta saklanarak kullanılır.

Sert su çalışma solüsyonu

- Solüsyon A	6 ml.
-Solüsyon B	8 ml.
-Distile su	1000 ml.

pH 7 olmalıdır. Her çalışma öncesi aseptik koşullarda taze olarak hazırlanır ve 12 saat içinde kullanılır.

Yüzey dezenfeksiyonu için zorunlu test mikroorganizmaları:

Bir dezenfektanın bakterisidal aktivitesinin test edilmesinde kullanılması gereken test organizmaları;

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Enterococcus hirae ATCC 10541

Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442

Bu test organizmaları için gerekli inkübasyon sıcaklığı $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$, çalışma sıcaklığı 20°C 'dir.

Test uygulamaları süresince kullanılan tüm KNS'lar için optimum üreme koşulları (sıcaklık, süre, atmosfer basıncı) sağlanmıştır.

Hijyenik el yıkama için zorunlu test mikroorganizmaları:

Bir dezenfektanın bakterisidal aktivitesinin test edilmesinde kullanılması gereken test organizmaları;

Staphylococcus aureus ATCC 6538

Enterococcus hirae ATCC 10541

Pseudomonas aeruginosa ATCC 15442

Escherichia coli NCTC 10538

Bu test organizmaları için gerekli inkübasyon sıcaklığı 36 ± 1 °C, çalışma sıcaklığı 20 °C'dir.

Test uygulamaları süresince kullanılan tüm KNS'lar için optimum üreme koşulları (sıcaklık, süre, atmosfer basıncı) sağlanmıştır.

Zorunlu temas süresi

Yüzey dezenfeksiyonu için zorunlu temas süresi 5 dakika veya 60 dakikadır. Hijyenik el yıkama için 60 saniye; cerrahi el yıkama için 5 dakikadır. Üretici firmanın önerdiği temas sürelerinde de deney yapılabilir ancak süre zorunlu temas süresini aşmamalıdır. Dezenfektan ürün, dezenfeksiyon için kullanıldığı yüzeylerde eğer hasta materyali ile temas edecekse önerilen temas süresi 5 dakikadır, çünkü o zaman ürünün temas süresi pratik nedenlerden dolayı 5 dakikayı aşmamaktadır. Eğer ürün temiz koşullarda kullanılacaksa o zaman zorunlu temas süresi olarak 60 dakika kullanılır.

Deneylerde kullanılan kirletici maddenin hazırlanması

Temiz koşullar için 0,3 gr. sığır albümini 100 ml. dilüent içerisinde çözülerek hazırlanır. Membran filtrasyonu ile sterilize edilir. Buzdolabında 1 ay saklanabilir.

Test kirli koşullarda yapılacaksa 3 gr. sığır albümini 3 ml. yıkanmış insan eritrosit süspansiyonu ile karıştırılır.

Test kirli koşullarda yapılacaksa 3 gr. sığır albümini 97 ml dilüent içinde hazırlanır. Filtre edilir buzdolabında 1 ay saklanır. 8 ml insan eritrosit süspansiyonu hazırlanır, 800 g'de 10 dk santrifüj edilir süpernatant atılır. Süpernatant renksiz olana kadar eritrositleri dilüent içinde resüspanse edilir. Bu işlem 3 kez tekrarlanır. Sonra 3 ml eritrositi 97 ml sığır albümin solüsyonu içinde süspanse edilir. Kontaminasyondan kaçınmak için bunları küçük parçalar halinde buzdolabında maksimum 7 gün saklanır.

Deneylerde kullanılan su

Kullanılan su temiz distile su olmalıdır, demineralize su kullanılmamalıdır.

Ürün test solüsyonu

Dezenfektan ürün solüsyonu sert suda, en az üç farklı konsantrasyonda hazırlanmalıdır. Kullanıma hazır olan dezenfektan ürününü dilüe etmek için normal su kullanılır. Hazırlanan ürün test solüsyonu 2 saat içinde kullanılmalıdır.

Çalışmada kullanılan dezenfektanlar; yüzey dezenfektanı olarak benzalkonyum klorür (Sigma, Danimarka), hijyenik el yıkama için klorheksidin diglukonat solüsyon (Sigma, İspanya) kullanılmıştır. 1 gr benzalkonyum klorür 100 ml steril distile suda çözülmüş ve bu süspansiyon 1/1'lik (%1) temel stok dezenfektan olarak kabul edilmiştir. Bu stok süspansiyondan steril distile su ile 1/10 ve 1/100'lük dilüsyonlar hazırlanmıştır. Deneylerde bu üç farklı konsantrasyon kullanılmıştır.

Klorheksidin diglukonattan 4,24 ml alınarak ve üzeri steril distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır ve bu süspansiyon 1/1'lik (%4) temel stok dezenfektan olarak kabul edilmiştir. Bu stok süspansiyondan steril distile su ile 1/10 ve 1/100'lük dilüsyonlar hazırlanmıştır. Deneylerde bu üç farklı konsantrasyon kullanılmıştır.

Bakteri süspansiyonları

-20°C'de saklanan mikroorganizmalar Mueller Hinton plaklarına pasajlanarak stok kültürleri yapılmıştır. Bu stok kültürden tekrar Mueller Hinton plaklarına pasaj yapılarak

ikinci subkültürler elde edilmiştir. Çalışmada bakterilerin ikinci subkültürleri kullanılmıştır.

Çalışma için her bir bakteriden iki farklı bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır:

- Test süspansiyonu; dezenfektan duyarlılık testlerini yürütmeye kullanılan bakteri süspansiyonudur.
- Validasyon süspansiyonu; kontrol deneylerinde kullanılan bakteri süspansiyonudur.

Test süspansiyonunun hazırlanması (N) :

Mueller Hinton plaklarında üreyen bakteri kolonilerinden öze ile birkaç koloni alınarak cam tüp içerisindeki dilüent içinde süspanse edilir ve mekanik karıştırıcı ile karıştırılarak homojen bakteri süspansiyonu elde edilir. Hazırlanan test süspansiyonu 2 saat içinde kullanılmalıdır.

Bu süspansiyondaki bakteri sayısı $1,5 \times 10^8 - 5,0 \times 10^8$ koloni oluşturan birim/mililitre (CFU/ml) arasında olmalıdır.

Çalışmada test süspansiyonundaki canlı bakteri sayısı spektrofotometre (Dade Behring MicroScan Turbidity Meter) kullanılarak ayarlanmıştır. Her bir bakteri süspansiyonu spektrofotometrede ölçüldüğünde +0,03 OD. değerinde olacak şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra bakteri sayısının hesaplanması için test süspansiyonunun seri dilüsyonları yapılarak TSA plaklarına ekimleri yapılmış 37°C’de 24 saatlik inkübasyonun ardından oluşan koloni sayıları hesaplanmıştır.

Bunun için 2 ml. dilüent içinde hazırlanan test süspansiyonundan 100 mikrolitre (µl.) alınarak 4900 µl. dilüent içine konur (1/50 dilüsyon), buradan 100 µl. alınarak 4900 µl. dilüent içine aktarılır (tekrar 1/50 dilüsyon), buradan da 100µl. alınarak yine 4900 µl. dilüent içine konur (tekrar 1/50 dilüsyon). Son dilüsyondan 100 µl. alınıp TSA plaklarına ekimi yapılır. 18-24 saatlik inkübasyondan sonra oluşan bakteri kolonileri sayılır. Çıkan sayı $1,25 \times 10^6$ ile çarpıldığında test süspansiyonunda bulunan canlı bakteri sayısı hesaplanmış olur.

Validasyon süspansiyonunun hazırlanması (Nv)

Kontrol deneylerinde kullanılan bakteri süspansiyonudur. Test süspansiyonunun (N) seyreltilmesi ile hazırlanır. Bunun için test süspansiyonundan 100 µl. alınıp 4900 µl. dilüent içeren tüpe konur, bu tüpten 50 µl. alınır ve 4950 µl. dilüent içeren bir başka tüpe konulur. (1/5000 dilüsyon).

Validasyon süspansiyonundaki bakteri sayısı $2,4 \times 10^4$ – 8×10^4 CFU/ml. arasında olmalıdır. Validasyon süspansiyonunda bulunan canlı bakteri sayısını hesaplamak için Nv tüpünden 100 µl. alınır ve 900 µl. dilüent içine konur. Buradan 100 µl. alınarak TSA plaklarına yayılır. İnkübasyonun ardından plaklarda sayılan bakteri koloni sayısı 100 ile çarpılır ve Nv değeri bulunur.

Kontrol deneyleri

Dezenfektan duyarlılık testlerinde kullanılan sert su, kirletici madde ve nötralizörün etkilerini kontrol etmek için uygulanan deneylerdir.

DeneySEL Şartların Kontrolü “A”

Deneyde kullanılan ürün ve dezenfektan dışındaki koşulların (kirletici madde, sert su) bakteriler üzerine öldürücü etkisinin olup olmadığının gösterilmesi için yapılır.

Deney için bir tüpe 100 µl. validasyon süspansiyonu (Nv) ve 100 µl. kirletici madde konulur. 2 dakika beklendikten sonra üzerine 800 µl. sert su eklenir. 5 dakika sonra bu tüpten 100 µl. alınarak TSA plaklarına ekimi yapılır. İnkübasyon süresinin sonunda oluşan koloni sayısı hesaplanır ve çıkan sayı 100 ile çarpılır. Kontrol deneyi A sonunda hesaplanan canlı bakteri sayısının $0,5 \times Nv$ 'den büyük veya eşit olması gerekmektedir. Yani mikroorganizma sayısında azalma olmaması beklenir.

Nötralizörün Kontrolü “B”

Nötralizasyonda kullanılan maddelerin mikroorganizmalar üzerine toksik etkisinin olup olmadığının gösterilmesi için yapılan kontrol deneyidir.

Kontrol deneyi B’de kullanılan bakteri süspansiyonu N_{VB} ’dir. N_{VB} ’nin değeri $2,4 \times 10^5$ ile 8×10^5 arasında olmalıdır.

N_{VB} ’nin hazırlanması için test süspansiyonundan (N) 100 µl. alınıp içinde 4900 µl. dilüent bulunan tüpe konur. Bu tüpten de 100 µl. sıvı alınıp içinde 900 µl. dilüent bulunan bir başka tüpe aktarılır. Son tüpteki süspansiyon N_{VB} ’dir.

N_{VB} süspansiyonundaki bakteri sayısının belirlenmesi için bu süspansiyondan 100 µl. alınıp 900 µl. dilüent ile karıştırılır, bu tüpten 50 µl. alınıp 450 µl. dilüent içine konur, bu tüpten de 50 µl. alınıp 450 µl. dilüent içeren tüpe aktarılır ve son tüpteki sıvıdan 100 µl. alınarak TSA plaklarına ekimi yapılır. 24 saatlik inkübasyondan sonra koloni sayımı yapılarak elde edilen sayı yapılan dilüsyon miktarı olan 10^4 ile çarpılır ve böylelikle N_{VB} ’de bulunan bakteri sayısı hesaplanır.

Kontrol deney B için N_{VB} süspansiyonundan 100 µl. alınıp 900 µl. nötralizör içeren tüpe konur. Bu tüpten 50 µl. alınıp 450 µl. nötralizör içeren tüpe konur. Bu tüpten de 50 µl. alınıp yine 450 µl. nötralizör içeren bir başka tüpe konur. Son tüpteki sıvıdan 100 µl. alınıp TSA plaklarına ekim yapılır ve 24 saatlik inkübasyonun ardından koloni sayımı yapılır. Çıkan sayı yapılan dilüsyon oranı olan 10^4 ile çarpılır.

Nötralizörün Kontrolü “C”

Deneylerde kullanılan nötralizör maddelerin dezenfektanın etkisini gerçekten sona erdirip erdirmediğinin gösterilmesi için yapılan kontrol deneyidir.

Bu deney için bir tüp içine 100 µl. kirletici madde ve 100 µl. dilüent konur. 2 dakika beklendikten sonra tüpe 800 µl. dezenfektan eklenir ve 5 dakika beklenir. 5. Dakikadan sonra bu tüpten 100 µl. sıvı alınarak içinde 800 µl. nötralizör bulunan tüpe aktarılır ve tekrar 5 dakika beklenir. Daha sonra bu tüpün üzerine 100 µl. N_v süspansiyonundan eklenerek 30 dakika inkübasyona bırakılır. Sürenin sonunda son tüpten 50 µl. alınarak TSA plaklarına ekim yapılır ve 24 saatlik inkübasyona bırakılır.

Koloni sayımı yapılır ve çıkan sayı 200 ile çarpılır. Elde edilen bu sayının $0,5 \times N_v$ ’ye eşit veya büyük olması gerekmektedir.

Kantitatif süspansiyon test yönteminin uygulanması

Test süspansiyonundan (N) 100 µl. alınır ve içinde 100 µl. kirletici madde bulunan tüpe konularak 2 dakika beklenir. Daha sonra üzerine 800 µl. dezenfektan solüsyonu eklenir. Bu tüpten 1, 5 ve 30. dakikalarda olmak üzere üç kez 100'er µl. alınarak içinde 800 µl. nötralizör ve 100 µl. sert su bulunan tüplere aktarılır. 5 dakika beklendikten sonra bu tüplerden 100'er µl. alınarak TSA plaklarına ekim yapılır ve inkübasyon süresi sonunda koloni sayımı yapılır. Koloni sayısı yapılan dilüsyon miktarı olan 10^2 ile çarpılır.

Değerlendirme:

Test yönteminde bakteri süspansiyonu (N) $1,5 \times 10^8 - 5 \times 10^8$ CFU/ml olarak hesaplanmış ve bu süspansiyon deneylerde kullanılmıştır. Test prosedürüne göre bakteri süspansiyonundan alınan 100 µl.'lik sıvı 100 µl. kirletici madde ve 800 µl. dezenfektan ile muamele edilmektedir. Bu aşamada süspansiyonda bulunan bakteri miktarı dilüsyon nedeniyle 10 kat azalmakta ve çalışma süspansiyonunda bulunan CFU sayısı $1,5 \times 10^7 - 5 \times 10^7$ arasında olmaktadır. Bu dezenfektanla karşılaşan bakteri süspansiyonudur. Bu karışımdan 100 µl. alınıp 800 µl. nötralizör ve 100 µl. sert su içine konulduğunda 10 kat daha dilüsyon yapılmış olmaktadır. Bu son dilüsyondan 100 µl. alınıp plaklara ekildiği için 10 kat dilüsyon daha olur. Plaklarda üreyen koloni sayıldığında dilüsyon oranı olan 100 ile çarpılır. Çalışma süspansiyonundaki sayı ($1,5 \times 10^7 - 5 \times 10^7$) ile elde edilen sayı arasındaki farkın 10^5 'ten daha düşük olması dezenfektanın mikroorganizma üzerine etkili olmadığını göstermektedir. CFU sayısında 10^{-5} 'lik veya daha fazla düşüş olması dezenfektanın etkili olduğunu gösterir.

3.4.2. Mikrodilüsyon yöntemi ile minimal inhibisyon konsantrasyonunun (MİK) belirlenmesi

KNS olarak tanımlanan izolatların benzalkonium klorür ve klorheksidin diglukonat biyosidlerine duyarlılıklarının belirlenmesinde mikrodilüsyon yöntemi kullanıldı. Bu yöntemle, kökenlerin minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standartlarına uygun olarak belirlendi. Mikrodilüsyon yönteminde, Mueller Hinton sıvı besiyeri (Fluka, İspanya) kullanıldı.

Mueller-Hinton sıvı besiyeri üretici firmanın önerileri doğrultusunda hassas terazide tartıldı distile su içinde çözüldükten sonra otoklavda steril edildi.

Toz hammadde olarak sağlanan benzalkonium klorürün (Sigma, Danimarka) 512 mikrogram/mililitre ($\mu\text{g/ml}$) stok konsantrasyonlarının hazırlanması için 5,12 gr benzalkonium klorür tartıldı ve 10 ml distile suda çözüldü. Daha sonra tekrar 1/1000 oranında sulandırılarak 512 $\mu\text{g/ml}$ 'lik stok solüsyonlar elde edildi. Stok solüsyonlar kullanılıncaya kadar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. 96 kuyucuklu U-tabanlı plağın bütün kuyucuklarına 100'er μl Mueller Hinton sıvı besiyeri eklendi. Daha sonra 512 $\mu\text{g/ml}$ stok Benzalkonyum klorürün 0,015625-128 $\mu\text{g/ml}$ seri sulandırımı yapıldı. 0,5 Mc Farland bulanıklığındaki bakteri süspansiyonu hazırlandıktan sonra 1/100 oranında sulandırılarak 1×10^6 yoğunlukta bakteri süspansiyonu elde edildi. Daha sonra 1×10^6 yoğunluktaki bakteri süspansiyonundan negatif kontrol kuyucukları hariç 100'er μl bütün kuyucuklara eklendi. Sonuç olarak kuyucuklarda 5×10^5 CFU/ml yoğunlukta bakteri süspansiyonu elde edildi. Mikroplaklar 37°C 'de 24 saat inkübe edildi. Gözle üreme saptanmayan en düşük dezenfektan konsantrasyonu MİK olarak belirlendi.

Sıvı halde bulunan klorheksidin diglukonatın (1,06 gr/ml) (Sigma, İspanya) 512 $\mu\text{g/ml}$ stok konsantrasyonunun hazırlanması için sıvı halde bulunan klorheksidin diglukonattan 480 μl alınarak, 520 μl distile su eklendi. Daha sonra 1/1000 oranında sulandırılarak 512 $\mu\text{g/ml}$ son konsantrasyon elde edildi. 96 kuyucuklu U-tabanlı plağın bütün kuyucuklarına 100'er μl Mueller Hinton sıvı besiyeri eklendi. Klorheksidin diglukonatın 0,03125-256 $\mu\text{g/ml}$ seri sulandırımı yapıldı. 0,5 Mc Farland bulanıklığındaki bakteri süspansiyonu 1/100 oranında sulandırılarak 1×10^6 yoğunlukta bakteri süspansiyonu elde edildi. Daha sonra 1×10^6 yoğunluktaki bakteri süspansiyonundan negatif kontrol kuyucukları hariç 100'er μl bütün kuyucuklara eklendi. Sonuç olarak kuyucuklarda 5×10^5 CFU/ml yoğunlukta bakteri süspansiyonu elde edildi. Gözle üreme saptanmayan en düşük dezenfektan konsantrasyonu MİK olarak belirlendi.

3.5. *qacA/B* Dezenfektan Direnç Genlerinin Saptanması

3.5.1. DNA izolasyonu için kullanılan solüsyonlar

Tris-EDTA (TE) hazırlanışı

1M Tris-Cl'den 1000 µl, 0,5 M Etilen Diamin Tetra Asetik Asitten (EDTA) 200 µl alındı ve 100 ml distile su ile karıştırılarak hazırlandı. (pH 8,0)

3.5.2. Elektroforez için kullanılan solüsyonlar

5X Tris-Borik asit-EDTA (TBE) tamponunun hazırlanışı

Tris-Base	54 g
Borik Asit	27,5 g
EDTA (0,5 M, pH: 8,0)	20 ml

Kimyasallar çözüldükten sonra distile su ile 1L'ye tamamlandı. pH 8,0' e ayarlanarak oda ısısında saklandı.

Elektroforez yürütme tamponu (1X TBE)

5X TBE stok tampon solüsyonundan alınan bir hacim, dört hacim distile su ile karıştırıldı, böylece agaroz jel hazırlanmasında ve elektroforez işleminde gerekli olan 1X TBE tamponu hazırlanmış oldu.

Etidyum bromid (Et-Br) çözeltisi hazırlanışı

10 mg etidyum bromid 1 ml distile suda çözülerek hazırlandı ve +4 °C'de saklandı.

Agaroz jel hazırlanışı (%2)

Elektroforez için %2'lik agaroz jelin hazırlanmasında, 2 g agaroz tartılarak 1X TBE tamponu ile 100 ml'ye tamamlanmıştır ve mikrodalga fırında homojen bir şekilde şeffaf hale gelinceye kadar ısıtılmıştır. Jel tarağı yerleştirilerek jel tepsisine dikkatlice döküldükten sonra yaklaşık 30 dakika oda ısısında beklenerek jelin katılaşıp donması sağlanmıştır. Daha sonra jel içerisinden tarak çıkartılarak elektroforez tankına yerleştirilmiştir.

3.5.3. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

DNA'nın eldesi (Ekstraksiyon)

Bakterilerin saf kültürlerinden saklama şişelerine (Microbank, Pro-lab, Kanada) alınan pasajlar -30°C'de çalışıncaya kadar saklandı. İlk önce kanlı agara, daha sonra Mueller Hinton Agar plaklarına pasajlanarak 37°C'de 24 saat inkübe edilerek canlandırıldı. Kültürden alınan bakterilere aşağıdaki adımların takip edildiği ısıtma yöntemi uygulanarak DNA'nın ekstraksiyonu yapıldı [153].

- Mueller Hinton Agar besiyerinde üreyen örneklerden 3-4 öze dolusu koloni 750 µl TE tamponu içeren ependorf tüplere aktararak bakteri süspansiyonu hazırlandı.
- 6500 rpm'de 5 dakika santrifüj yapıldı. Üstteki sıvı döküldü.
- Yıkama işlemi her bir bakteri için 3 kez olmak üzere tekrar edildi.
- Yıkama işlemi sonrasında pelletin üzerine 200 µl TE koyuldu ve vortekslendi.
- 98°C'de 20 dakika ısı bloğunda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj yapılarak hücresel atıkların çöktürülmesi sağlandı.
- İçerisinde DNA bulunan üst sıvı temiz tüplere aktararak bakterilerden DNA izolasyonu tamamlandı.

Elde edilen DNA'lar Nanodrop ND 1000 UV-Vis Spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD) cihazı ile saflık ve miktarlarının belirlenmesi amacıyla ölçülmüştür. DNA konsantrasyonu 50 ng/µl olacak şekilde ayarlandı.

DNA' nın çoğaltılması ve gösterilmesi

Primerlerin seçimi

Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan oligonükleotid primerlerin seçiminde “ National Centre for Biotechnology Information” bünyesinde bulunan “Entrez Nucleotide” nükleotid dizileri veritabanında bulunan *qacA/B* dizilerinden yararlanıldı. Primer tasarımında bu veri tabanında yer alan X56628 kodlu dizi kullanıldı. Dizi üzerinde 849-2393 bazlar arasında *qacA* kodlayan bölge belirlendi. Bu bölge PerlPrimer 1.1.14 programına aktarıldı. Primer dimer oluşturma olasılığı en az bulunan primer çiftleri seçildi. Hedeflenen *qacA*'yı çoğaltmaya yönelik ‘ileri (forward)’ oligonükleotid primer *qacA-f*, X56628 kodlu kaydın 967-990’ıncı bazları arasından, ‘geri (reverse)’ oligonükleotid primer *qacA-r* ise yine aynı kaydın karşıt zincirinden 1656-1633’üncü bazları arasından seçildi. Bu primerler kullanılarak *qacA* bulunan kökenlerden 689 baz çifti uzunluğunda PZR ürünleri elde edileceği ön görüldü. Çalışmada kullanılan primerlerin dizileri çizelge 3.1.’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan primerlerin dizileri

PRİMERLER	PRİMER DİZİLERİ
<i>qacAB-forward</i>	5’ - TGG CTT TAC CGG AAT TAG TAA GAG - 3’
<i>qacAB-reverse</i>	5’ - GTC TTA CGT CTA ACA TTG GAT CAG - 3’

PZR Reaksiyon karışımı

Her bir örnek için numaralandırılmış steril 0,2 ml’lik PZR tüplerine, klinik örneklerden ekstrakte edilen DNA örneğinden 2 µl eklendikten sonra hazırlanan PZR reaksiyon karışımı 18 µl dağıtıldı ve spin santrifüj yapıldıktan sonra ısı döngü cihazına yerleştirildi. Çalışmada *qacA* kodlayan bölgenin amplifikasyon karışımının hazırlanması sırasıyla çizelge 3.2.’de verilmiştir.

PZR reaksiyon karışımının hazırlanması:

Çizelge 3.2. PZR reaksiyon karışımı

BİLEŞEN	Son Konsantrasyon
DNaz ve RNaz içermeyen su	-
10X PZR tamponu	1 X
MgCl ₂	3 mM
dNTP miks	0,2 mM
PRİMER Forward <i>qacA</i> -f	0,6 mM
PRİMER Reverse <i>qacA</i> -r	0,6 mM
Taq DNA polimeraz	0,25 U
DNA	50 ng
Toplam Hacim	20 µl

Amplifikasyon şartları

Çalışmada *qacA/B* kodlayan bölgenin amplifikasyonu için kullanılan PZR amplifikasyon şartları çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. *qacA/B* gen bölgelerinin amplifikasyonu için reaksiyon şartları

Reaksiyon aşaması	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Ön ısıtma	95°C	3 dakika	1
Denatürasyon	95°C	15 saniye	40
Primer bağlanması	60°C	45 saniye	
Uzama	72°C	1 dakika	
Son uzama	72°C	7 dakika	1
Muhafaza	4°C	-	

Isı döngü cihazında çoğaltılmış olan PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek amplifikasyonun başarılı olup olmadığı kontrol edildi. PZR ürünlerinden 9'er µl alınarak 3 µl yükleme tamponuyla karıştırılarak yüklendi. Jelde her sıranın baş ve son kuyucuğuna moleküler ağırlık standardı yüklendi. Elektroforez yürütme tamponu olarak 1X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) kullanıldı. Elektroforez işlemi sonrasında jel 0,5 µg/ml etidyum bromür içeren 1X TBE çözeltisinde 30 dakika boyandıktan sonra UV transiluminatör üzerine

aktarılan jel UV ile görüntüledi. Görüntüler kamera kullanılarak kaydedildi (Syngene Bio Imaging, Ingenius, İngiltere). Elde edilen sonuçlar DNA moleküler ağırlık standardı ile karşılaştırıldığında 689 baz çifti ağırlığında bant görülen kökenler *qacA/B* pozitif olarak değerlendirildi.

İstatistiksel Analizler

Çalışmada kullanılan dezenfektanların (klorheksidin diglukonat ve benzalkonyum klorür) yükselmiş MİK değerlerinin istatistiksel analizleri için SPSS 15.0 programında parametrik olmayan Ki-kare testi kullanıldı.

4.BULGULAR

Çalışmaya Ekim 2010 - Ağustos 2011 tarihleri arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na farklı poliklinik ve yataklı servis hastalarından gönderilen kan kültürü ve kateter içi kan kültürü örneklerinden yapılan mikrobiyolojik incelemeler sonucu koagülaz negatif Stafilokok olduğu tespit edilen 50 köken dahil edilmiştir. Bu kökenlerin izole edildiği hasta gruplarının yaş, cinsiyet, gelen materyal ve bölümlere göre dağılımları çizelge 4.2.'de verilmiştir.

Hastaların cinsiyet ve yaşlarına göre dağılımları Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Hastaların 29'u (%58) erkek, 21'i (%42) kadındır. Hastaların yaşlarının 1-90 yaş arasında değiştiği ve yaş ortalamalarının 39,14 olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.1. Hastaların cinsiyet ve yaşlarına göre dağılımları

Yaş	Kadın	Erkek	Toplam
0-10	4	12	16
10-20	2	2	4
20-30	-	1	1
30-40	-	-	-
40-50	3	-	3
50-60	6	3	9
60-70	1	8	9
70-80	3	2	5
80-90	2	-	2
90-100	-	1	1
Toplam	21	29	50

Çizelge 4.2. Koagülaz negatif stafilokok kökenlerinin yaş, cinsiyet, materyal ve bölüme göre dağılımları.

No.	Cinsiyet	Yaş	Bölüm	Materyal	Altta Yatan Hastalık
1	Erkek	56	Genel Cerrahi	Kateter	Mide malign Neoplazmı
2	Erkek	5	Çocuk Hematolojisi	Kan	Akut Lenfoblastik Lösemi
3	Kadın	4	Çocuk Onkolojisi	Kan	Beyin Malign Neoplazmı
4	Kadın	43	Medikal Onkoloji	Kan	Serviks Uteri Malign Neoplazmı
5	Kadın	50	Genel Cerrahi	Kan	Kolon Malign Neoplazmı
6	Kadın	59	Üroloji	Kan	Mesane Malign Neoplazmı
7	Erkek	62	Genel Cerrahi Yoğun Bakım	Kan	Kronik Solunum Yetmezliği
8	Kadın	73	Nefroloji	Kan	Akut Böbrek Yetmezliği
9	Erkek	65	Nefroloji	Kan	Kronik Böbrek Yetmezliği
10	Erkek	2	Yeni Doğan	Kan	Yeni Doğan Bakteriyel Sepsisi
11	Erkek	62	Medikal Onkoloji	Kateter	Mide malign Neoplazmı
12	Kadın	83	Romatoloji	Kan	Romatoid artrit, Pnömoni
13	Kadın	56	Kadın Doğum	Kateter	Serviks Uteri Malign Neoplazmı
14	Kadın	46	Nefroloji	Kan	Böbrek Nakli
15	Kadın	46	Nefroloji	Kateter	Böbrek Nakli
16	Erkek	56	Kalp-Damar Cerrahi	Kan	Arteriyel Embolizm ve Tromboz
17	Kadın	79	Genel Cerrahi	Kan	Kolon Malign Neoplazmı
18	Erkek	3	Çocuk Yoğun Bakım	Kan	Özefagusun Konjenital Malformasyonu
19	Erkek	90	Üroloji	Kan	Benign Prostat Hiperplazisi
20	Kadın	68	Medikal Onkoloji	Kan	Non-Hodgkin Lenfoma
21	Kadın	52	Kadın Doğum	Kan	Over Malign Neoplazmı
22	Erkek	3	Çocuk Enfeksiyon	Kan	Pnömoni
23	Kadın	13	Çocuk Enfeksiyon	Kan	Akut Lenfoblastik Lösemi
24	Kadın	4	Çocuk Yoğun Bakım	Kan	Solunum Yetmezliği
25	Kadın	58	Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım	Kan	Solunum Yetmezliği
26	Erkek	3	Çocuk Cerrahisi	Kan	Özefagus Atrezisi
27	Kadın	3	Yeni Doğan	Kan	Yeni Doğanın Bakteriyel Sepsisi
28	Erkek	77	Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım	Kan	Akut Böbrek Yetmezliği, Solunum Yetmezliği
29	Erkek	10	Çocuk Hematolojisi	Kateter	Akut Lenfoblastik Lösemi
30	Erkek	26	Beyin ve Sinir Cerrahisi	Kan	Kafa Travması ve Hemipleji
31	Erkek	64	Nefroloji	Kan	Kronik Böbrek Yetmezliği
32	Erkek	50	KVC Yoğun Bakım	Kan	Sol Femur Amputasyonu
33	Kadın	74	Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım	Kan	Kronik Solunum Yetmezliği

Çizelge 4.2. (devam) Koagülaz negatif stafilokok kökenlerinin yaş, cinsiyet, materyal ve bölüme göre dağılımları.

34	Erkek	68	Endokrinoloji	Kan	Hipofiz Bezi Benign Neoplazmi
35	Kadın	52	Gastroenteroloji	Kan	Karaciğer Yetmezliği
36	Erkek	2	Yeni Doğan	Kan	Beynin Konjenital Malformasyonu
37	Erkek	67	Genel Cerrahi	Kan	Mide Malign Neoplazmi
38	Kadın	16	Çocuk Nefrolojisi	Kateter	Böbrek Nakli
39	Erkek	63	Nefroloji	Kateter	Kronik Böbrek Yetmezliği
40	Erkek	72	Nefroloji	Kateter	Kronik Böbrek Yetmezliği
41	Erkek	1	Yeni Doğan	Kan	Konjenital Toksoplazmozis
42	Erkek	10	Çocuk Onkolojisi	Kan	Karaciğer Malign Neoplazmi
43	Erkek	2	Çocuk Acil	Kan	Kistik Fibrozis
44	Erkek	2	Çocuk Hastalıkları	Kan	Epilepsi
45	Erkek	64	Erişkin Hematoloji	Kan	Akut Myeloid Lösemi
46	Kadın	82	Nefroloji	Kan	Kronik Böbrek Yetmezliği
47	Kadın	3	Kalp-Damar Cerrahi	Kan	Ventriküler ve Atrial Septal Defekt
48	Erkek	3	Çocuk Onkolojisi	Kan	Akut Lenfoblastik Lösemi
49	Erkek	4	Çocuk Hematolojisi	Kan	Lenfoid Lösemi
50	Erkek	1	Çocuk Yoğun Bakım	Kan	Kronik Akciğer Hastalığı

Çizelge 4.3. Koagülaz negatif stafilokok kökenlerinin API 20 NE tanımlama kiti ve MicroScan WalkAway tanımlama sistemin sonuçlarına göre dağılımı

Köken	N	%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	31	62
<i>Staphylococcus hominis</i>	14	28
<i>Staphylococcus simulans</i>	2	4
<i>Staphylococcus auricularis</i>	1	2
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1	2
<i>Staphylococcus capitis</i>	1	2
Toplam	50	100

Çizelge 4.4. Koagülaz negatif stafilokok kökenlerinin izole edilen hastaların bölümlere göre dağılımı

Bölümler	N	%
Nefroloji	8	16
Genel Cerrahi	4	8
Yeni Doğan	4	8
Çocuk Hematolojisi	3	6
Çocuk Onkolojisi	3	6
Medikal Onkoloji	3	6
Çocuk Yoğun Bakım	3	6
Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım	3	6
Çocuk Enfeksiyon	2	4
Uroloji	2	4
Kalp-Damar Cerrahi	2	4
Kadın Doğum	2	4
Genel Cerrahi Yoğun Bakım	1	2
Romatoloji	1	2
Çocuk Cerrahisi	1	2
Beyin ve Sinir Cerrahisi	1	2
KVC Yoğun Bakım	1	2
Endokrinoloji	1	2
Gastroenteroloji	1	2
Çocuk Nefrolojisi	1	2
Çocuk Acil	1	2
Çocuk Hastalıkları	1	2
Erişkin Hematoloji	1	2
Toplam	50	100

4.1. Minimal İnhibisyon Konsantrasyonunun (MİK) Sonuçları

Bakteriyostatik aktivitenin belirlenmesi amacıyla, hastaneden izole edilen 50 adet KNS izolatının benzalkonyum klorür ve klorheksidin diglukonatın her biri için MİK değerleri (çizelge 4.5.) ve MİK değerlerinin dağılımı çizelge 4.6.'da belirlendi. *qacA/B* dezenfektan direnç geni bulunan hastane suşu KNS'lerde klorheksidin diglukonat ve benzalkonyum klorür için MİK değerlerinin çizelge 4.7.'de dağılımı, klorheksidin diglukonat ve benzalkonyum klorürün her biri için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri çizelge 4.9.'da belirlendi.

Çizelge 4.5. Koagülaz negatif stafilokok izolatlarının klorheksidin diglukonat ve benzalkonyum klorür MİK değerleri

Örnek No	Klorheksidin Diglukonat MİK (µg/ml)	Benzalkonyum Klorür MİK (µg/ml)
1	0,0625	8
2	2	1
3	0,5	0,0625
4	0,03125	4
5	1	2
6	0,5	0,5
7	4	2
8	1	4
9	1	0,5
10	2	8
11	2	8
12	1	0,5
13	0,25	4
14	1	4
15	1	4
16	0,5	4
17	0,5	0,25
18	0,25	4
19	0,5	0,25
20	0,25	0,25

Çizelge 4.5. (devam) Koagülaz negatif stafilokok izolatlarının klorheksidin diglukonat ve benzalkonyum klorür MİK değerleri

21	0,5	4
22	0,5	0,5
23	0,25	0,25
24	0,125	2
25	0,0625	4
26	0,0625	0,5
27	1	2
28	0,5	4
29	0,5	4
30	0,5	4
31	0,25	2
32	1	2
33	0,5	8
34	0,25	4
35	0,25	0,5
36	0.03125	0,25
37	0,5	0,5
38	0,5	0,5
39	0,5	0,5
40	0,5	0,25
41	2	0,5
42	0,25	4
43	0,25	0,5
44	0.125	0,015625
45	0,25	0,0625
46	1	4
47	0,5	0,25
48	0,25	2
49	2	4
50	0,5	2

Çizelge 4.6. Koagülaz negatif stafilokok izolatlarındaki benzalkonyum klorür ve klorheksidin diglukonat MİK değerlerinin dağılımı

MIK değerleri (µg/ml)	Klorheksidin diglukonat (%)	Benzalkonyum Klorür (%)
256 (µg/ml)	-	-
128 (µg/ml)	-	-
64 (µg/ml)	-	-
32 (µg/ml)	-	-
16 (µg/ml)	-	-
8 (µg/ml)	-	4 (%8)
4 (µg/ml)	1 (%2)	16 (%32)
2 (µg/ml)	5 (%10)	8 (%16)
1 (µg/ml)	9 (%18)	1 (%2)
0,5 (µg/ml)	17 (%34)	11 (%22)
0,25 (µg/ml)	11 (%22)	7 (%14)
0,125 (µg/ml)	2 (%4)	-
0,0625 (µg/ml)	3 (%6)	2 (%4)
0,03125 (µg/ml)	2 (%4)	-
0,015625 (µg/ml)	-	1 (%2)
Toplam	50 (%100)	50 (%100)

Çizelge 4.7. *qacA/B* dezenfektan direnç geni bulunan izolatlarda klorheksidin diglukonat ve benzalkonyum klorür için MİK değerlerinin dağılımı

MIK değerleri (µg/ml)	Klorheksidin diglukonat (%)	Benzalkonyum Klorür (%)
8 (µg/ml)	-	3 (%7,14)
4 (µg/ml)	1 (%2,38)	14 (%33,33)
2 (µg/ml)	5 (%11,9)	8 (%19,04)
1 (µg/ml)	8 (%19,04)	1 (%2,38)
0,5 (µg/ml)	13 (%30,95)	9 (%21,42)
0,25 (µg/ml)	9 (%21,42)	5 (%11,9)
0,125 (µg/ml)	1 (%2,38)	-
0,0625 (µg/ml)	3 (%7,14)	2 (%4,76)
0,03125 (µg/ml)	2 (%4,76)	-
Toplam	42	42

Çizelge 4.8. *qacA/B* dezenfektan direnç geni bulunmayan izolatlarda klorheksidin diglukonat ve benzalkonyum klorür için MİK değerlerinin dağılımı

MİK değerleri (µg/ml)	Klorheksidin diglukonat (%)	Benzalkonyum Klorür (%)
8 (µg/ml)	-	1(%12,5)
4 (µg/ml)	-	2(%25)
2 (µg/ml)	-	-
1 (µg/ml)	1(%12,5)	-
0,5 (µg/ml)	4(%50)	2(%25)
0,25 (µg/ml)	2(%25)	2(%25)
0,125 (µg/ml)	1(%12,5)	-
0,0625 (µg/ml)	-	-
0,03125 (µg/ml)	-	-
0,015625 (µg/ml)	-	1(%12,5)
Toplam	8	8

Çizelge 4.9. Benzalkonyum klorür ve klorheksidin diglukonatın MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri

Dezenfektanlar	MİK aralığı (µg/ml)	MİK ₅₀	MİK ₉₀
Klorheksidin diglukonatın	0,03125-4 µg/ml	0,5 µg/ml	2 µg/ml
Benzalkonyum klorür	0,015625-8 µg/ml	2 µg/ml	4µg/ml

Literatürdeki klorheksidin ve benzalkonyum klorür MİK değerlerinin araştırıldığı çalışmalar incelendiğinde, 2 µg/ml'nin üzerindeki MİK değerlerinin genellikle yüksek olarak kabul edildiği, hatta bazı araştırmacıların 2 µg/ml'nin üzerindeki değerlere sahip izolatları dirençli olarak bildirdikleri görülmektedir [137, 154-156].

Bizim çalışmada sadece MİK değerleri dikkate alınıp < 2 µg/ml ve 2 µg/ml değerler klorheksidin diglukonat ve benzalkonyum klorür için duyarlı olarak kabul edildiği takdirde, bakterilerin %98'i klorheksidine duyarlı bulunurken, %60'ı da benzalkonyum klorüre duyarlı bulunmuştur. Bu sonuçlara göre klorheksidin hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole ettiğimiz KNS'ler üzerinde daha fazla etkili olduğu görülmektedir.

4.2. Koagülaz Negatif Stafilokoklarda Dezenfektan Duyarlılık Testlerinin Sonuçları

4.2.1 Kontrol Deneylerinin Sonuçları:

Dezenfektan duyarlılık testlerinin uygulanmasından önce deneylerde kullanılacak olan sert su, nötralizör, dilüent gibi maddelerin bakteriler üzerindeki etkilerinin kontrol edilmesi amacıyla yapılan kontrol deneylerinin sonuçları aşağıda verilmiştir. Kontrol deneylerinde zorunlu test mikroorganizmaları olan *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Enterococcus hirae* ATCC 10541, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 ve *Escherichia coli* NCTC 10538 kullanılmıştır.

Çizelge 4.10. Klorheksidin diglukonat için yapılan validasyon deneylerinin sonuçları
Deneysel Şartların Kontrolü “A” :

Standart Suş	Test Süspansiyonu (N)	Validasyon Süspansiyonu (N _V)	Kontrol Deney A
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	$3,6 \times 10^8$	$4,5 \times 10^4$	$3,64 \times 10^4$
<i>E. hirae</i> ATCC 10541	$2,5 \times 10^8$	$3,08 \times 10^4$	$2,07 \times 10^4$
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	$4,8 \times 10^8$	$6,6 \times 10^4$	$3,64 \times 10^4$
<i>E. coli</i> NCTC 10538	$2,05 \times 10^8$	$1,68 \times 10^4$	$5,04 \times 10^4$

Klorheksidin diglukonat için yapılan A deneyi sonrasında tüm zorunlu test mikroorganizmaları ile elde edilen CFU/ml sayısı validasyon süspansiyonunda bulunan CFU/ml sayısının yarısından büyük olduğu için deney başarılı kabul edilmiştir. Bu deneyle kirletici madde ve sert suyun mikroorganizma üzerine öldürücü etkilerinin olmadığı gösterilmiştir.

Nötralizörün Kontrolü “B”:

Standart Suş	Test Süspansiyonu (N)	Validasyon Süspansiyonu B (N _{VB})	Kontrol Deney B
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	$3,6 \times 10^8$	$2,7 \times 10^5$	$4,9 \times 10^5$
<i>E. hirae</i> ATCC 10541	$2,5 \times 10^8$	$2,5 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5$
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	$4,8 \times 10^8$	$4,5 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$
<i>E. coli</i> NCTC 10538	$2,05 \times 10^8$	$3,1 \times 10^5$	$3,7 \times 10^5$

Klorheksidin diglukonat için yapılan B deneyi sonrasında tüm zorunlu test mikroorganizmaları için elde edilen CFU/ml sayısı validasyon süspansiyonunda bulunan CFU/ml sayısının yarısından büyük olduğu için deney başarılı kabul edilmiştir ve nötralizörün deneydeki bakteriler üzerine öldürücü etkisi olmadığı gösterilmiştir.

Nötralizörün Kontrolü “C” :

Standart Suş	Test Süspansiyonu (N)	Validasyon Süspansiyonu (N _V)	Kontrol Deney C
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	$3,6 \times 10^8$	$4,5 \times 10^4$	$4,54 \times 10^4$
<i>E. hirae</i> ATCC 10541	$2,5 \times 10^8$	$3,08 \times 10^4$	$5,48 \times 10^4$
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	$4,8 \times 10^8$	$6,6 \times 10^4$	$5,94 \times 10^4$
<i>E. coli</i> NCTC 10538	$2,05 \times 10^8$	$1,68 \times 10^4$	$0,92 \times 10^4$

Klorheksidin diglukonat için yapılan C deneyi sonrasında elde edilen CFU/ml sayısı validasyon süspansiyonunda bulunan CFU/ml sayısının yarısından büyük olduğu için deney başarılı kabul edilmiştir. Nötralizörün dezenfektanı nötralize edebildiği gösterilmiştir.

Çizelge 4.11. Benzalkonyum klorür için yapılan validasyon deneylerinin sonuçları
Deneyel Şartların Kontrolü “A” :

Standart Suş	Test Süspansiyonu (N)	Validasyon Süspansiyonu (N _v)	Kontrol Deney A
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	$3,6 \times 10^8$	$4,5 \times 10^4$	$3,64 \times 10^4$
<i>E. hirae</i> ATCC 10541	$2,5 \times 10^8$	$3,08 \times 10^4$	$2,07 \times 10^4$
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	$4,8 \times 10^8$	$6,6 \times 10^4$	$3,64 \times 10^4$
<i>E. coli</i> NCTC 10538	$2,05 \times 10^8$	$1,68 \times 10^4$	$5,04 \times 10^4$

Benzalkonyum klorür için yapılan A deneyi sonrasında tüm zorunlu test mikroorganizmaları ile elde edilen CFU/ml sayısı validasyon süspansiyonunda bulunan CFU/ml sayısının yarısından büyük olduğu için deney başarılı kabul edilmiştir. Bu deneyle kirletici madde ve sert suyun mikroorganizma üzerine öldürücü etkilerinin olmadığı gösterilmiştir.

Nötralizörün Kontrolü “B”:

Standart Suş	Test Süspansiyonu (N)	Validasyon Süspansiyonu B (N _{VB})	Kontrol Deney B
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	$3,6 \times 10^8$	$2,7 \times 10^5$	$4,9 \times 10^5$
<i>E. hirae</i> ATCC 10541	$2,5 \times 10^8$	$2,5 \times 10^5$	$2,9 \times 10^5$
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	$4,8 \times 10^8$	$4,5 \times 10^5$	$5,2 \times 10^5$
<i>E. coli</i> NCTC 10538	$2,05 \times 10^8$	$3,1 \times 10^5$	$3,7 \times 10^5$

Benzalkonyum klorür için yapılan B deneyi sonrasında tüm zorunlu test mikroorganizmaları için elde edilen CFU/ml sayısı validasyon süspansiyonunda bulunan CFU/ml sayısının yarısından büyük olduğu için deney başarılı kabul edilmiştir ve nötralizörün deneydeki bakteriler üzerine öldürücü etkisi olmadığı gösterilmiştir.

Nötralizörün Kontrolü “C” :

Standart Suş	Test Süspansiyonu (N)	Validasyon Süspansiyonu (N _v)	Kontrol Deney C
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	$3,6 \times 10^8$	$4,5 \times 10^4$	$4,06 \times 10^4$
<i>E. hirae</i> ATCC 10541	$2,5 \times 10^8$	$3,08 \times 10^4$	$6,72 \times 10^4$
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	$4,8 \times 10^8$	$6,6 \times 10^4$	$5,68 \times 10^4$
<i>E. coli</i> NCTC 10538	$2,05 \times 10^8$	$1,68 \times 10^4$	$0,88 \times 10^4$

Benzalkonyum klorür için yapılan C deneyi sonrasında elde edilen CFU/ml sayısı validasyon süspansiyonunda bulunan CFU/ml sayısının yarısından büyük olduğu için deney başarılı kabul edilmiştir. Nötralizörün dezenfektanı nötralize edebildiği gösterilmiştir.

4.2.2. Dezenfektan duyarlılık testlerinin sonuçları

Klorheksidin diglukonat ve benzalkonyum klorür için çalışılan 50 bakteri izolatına ait dezenfektan duyarlılık testi sonuçları çizelge 4.12. ve çizelge 4.13.’te verilmiştir.

Hazırlanan bakteri test süspansiyonlarında bulunan CFU/ml sayısı hesaplanarak kaydedilmiştir. Deney prosedürü içinde test süspansiyonunun 1/10 dilüsyonu olduğundan başlangıç süspansiyonundaki bakteri sayısı esas alınmıştır. Test edilen klorheksidin diglukonat ve benzalkonyum klorürün 1/1, 1/10 ve 1/100’lük konantrasyonu için de bakteri süspansiyonu dezenfektanla muamele edildikten sonraki 1., 5. ve 30. dakikalarda alınan örnekler nötralizör içeren tüplere aktarılmış ve daha sonra TSA besiyerine ekimleri yapılmıştır. 24 saatlik inkübasyonun ardından plaklardaki koloni sayıları hesaplanmıştır. Test protokolüne göre başlangıç süspansiyonundaki bakteri sayısı ile dezenfektanla muameleden sonraki üreyen bakteri sayısı arasında 5 log.’luk (10^{-5}) azalma bulunursa bu izolatın dezenfektana karşı duyarlı olarak kabul edilmiştir.

Klorheksidin diglukonatın 1/1’lik konantrasyonu için test edilen 50 KNS suşunun 1. ve 5. dakika temas sonrası bazı suşlarda üreme bulunmasına rağmen bu suşlarda 5 log.’luk (10^{-5}) azalma olmasından dolayı bu suşlarda klorheksidin bakterisidal etkili bulunmuştur. 30. dakika temas sonrası ise tüm KNS suşlarında üreme saptanmadığı için klorheksidin

bakterisidal etkili bulunmuştur. Klorheksidin diglukonatin 1/1'lik konsantrasyon için bütün KNS izolatları duyarlı bulunmuştur

Klorheksidin diglukonatin 1/10'lük konsantrasyonunun 1. dakika temas sonrası izolatların 29 (%58) tanesinde 5 log.'luk (10^{-5}) azalma olmasından dolayı bu suşlarda bakterisidal etkili bulunmuştur, 5. dakika temas sonrasında izolatların 46 (%92) tanesinde bakterisidal etkili bulunmuştur, 30. dakika temas sonrası ise izolatların 49 (%98) tanesinde bakterisidal etkili bulunmuştur.

Klorheksidin diglukonatin 1/100'lük konsantrasyonunun 1. dakika temas sonrası tüm izolatlarda 5 log.'luk (10^{-5}) azalma bulunmamasından dolayı bakterisidal etkisiz bulunmuştur, 5. dakika temas sonrası izolatların 5 (%10) tanesinde bakterisidal etkili bulunmuştur, 30. dakika temas sonrası ise izolatların 22 (%44) tanesinde bakterisidal etkili bulunmuştur.

Benzalkonyum klorürün 1/1'lik konsantrasyonu için test edilen 50 KNS suşunun 1. dakika temas sonrası bazı suşlarda üreme bulunmasına rağmen bu suşlarda 5 log.'luk (10^{-5}) azalma olmasından dolayı bu suşlarda benzalkonyum klorür bakterisidal etkili bulunmuştur. 5. ve 30. dakika temas sonrası ise bakteri üremesi saptanmamıştır. Benzalkonyum klorürün 1/1'lik konsantrasyon için bütün KNS izolatları duyarlı bulunmuştur.

Benzalkonyum klorürün 1/10'lük konsantrasyonunun 1. dakika temas sonrası hastaneden izole edilen 50 KNS suşunun 49 (%98) tanesinde 5 log.'luk (10^{-5}) azalma olmasından dolayı bu suşlarda bakterisidal etkili bulunmuştur, 5. dakika temas sonrası bazı suşlarda üreme bulunmasına rağmen bu suşlarda 5 log.'luk (10^{-5}) azalma olmasından dolayı bu suşlarda benzalkonyum klorür bakterisidal etkili bulunmuştur. 30. dakika temas sonrası ise tüm KNS suşlarında üreme saptanmadığı için benzalkonyum klorür bakterisidal etkili bulunmuştur.

Benzalkonyum klorürün 1/100'lük konsantrasyonunun 1. dakika temas sonrası izolatların 29 (%58) tanesinde bakterisidal etkili bulunmuştur, 5. dakika temas sonrası izolatların 40 (%80) tanesinde bakterisidal etkili bulunmuştur, 30. dakika temas sonrası ise izolatların 44 (%88) tanesinde bakterisidal etkili bulunmuştur.

50 KNS suşunun 1 tanesi klorheksidin diglukonat için MİK değeri 2 µg/ml üzerinde bulunmasına rağmen bu suş 1/1'lik konsantrasyonuna karşı duyarlı bulunmuştur. 50 KNS suşunun 20 tanesi benzalkonyum klorür için MİK değerleri 2 µg/ml üzerinde bulunmasına rağmen 1/1'lik konsantrasyonuna karşı duyarlı bulunmuşlardır.

Çizelge 4.12. Klorheksidin diglukonat için dezenfektan duyarlılık deneylerinin sonuçları

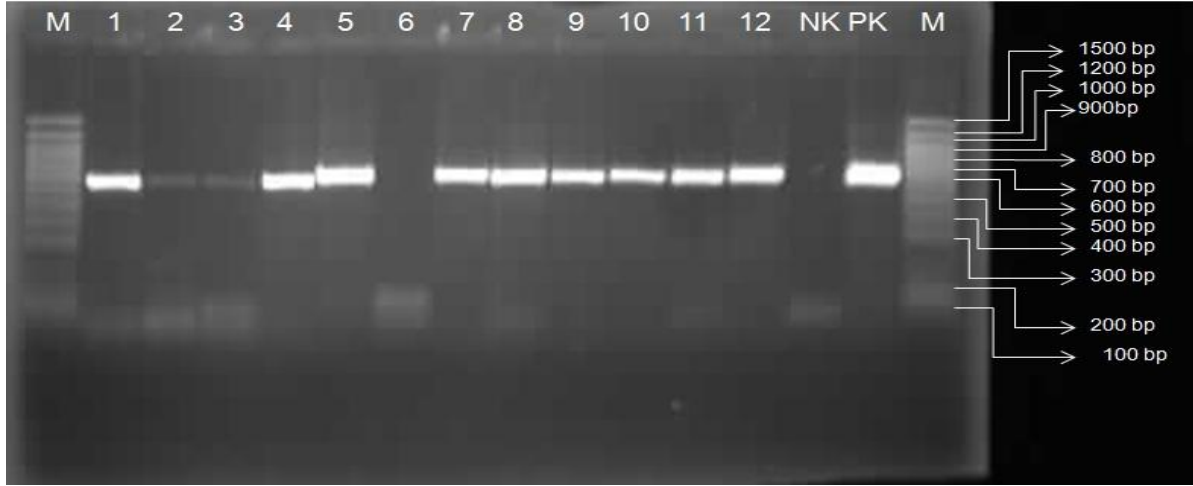
Klorheksidin diglukonat		1/1			1/10			1/100		
Örnek no	Başlangıç Konsantrasyonu	1 dak	5 dak	30 dak	1 dak	5 dak	30 dak	1 dak	5 dak	30 dak
1	$2,60 \times 10^7$	1×10^2	0	0	7×10^2	2×10^2	0	1086×10^2	723×10^2	111×10^2
2	$4,06 \times 10^7$	0	0	0	1×10^2	1×10^2	0	836×10^2	304×10^2	2×10^2
3	$4,22 \times 10^7$	0	0	0	2×10^2	0	0	151×10^2	88×10^2	0
4	$4,81 \times 10^7$	0	0	0	3×10^2	1×10^2	0	2104×10^2	288×10^2	9×10^2
5	$1,69 \times 10^7$	1×10^2	1×10^2	0	5×10^2	1×10^2	1×10^2	37×10^2	9×10^2	4×10^2
6	$1,69 \times 10^7$	1×10^2	1×10^2	0	7×10^2	3×10^2	2×10^2	53×10^2	14×10^2	11×10^2
7	$2,1 \times 10^7$	1×10^2	0	0	3×10^2	1×10^2	0	81×10^2	14×10^2	7×10^2
8	$1,83 \times 10^7$	0	0	0	9×10^2	4×10^2	1×10^2	2260×10^2	51×10^2	4×10^2
9	$4,06 \times 10^7$	2×10^2	0	0	31×10^2	4×10^2	0	844×10^2	47×10^2	1×10^2
10	$4,68 \times 10^7$	0	0	0	9×10^2	5×10^2	1×10^2	333×10^2	25×10^2	13×10^2
11	$2,1 \times 10^7$	1×10^2	0	0	2×10^2	1×10^2	0	56×10^2	47×10^2	2×10^2
12	$4,16 \times 10^7$	0	0	0	1×10^2	0	0	7×10^2	3×10^2	0
13	$3,35 \times 10^7$	1×10^2	0	0	1×10^2	0	0	1312×10^2	473×10^2	141×10^2
14	$4,81 \times 10^7$	1×10^2	0	0	2×10^2	1×10^2	0	2232×10^2	624×10^2	0
15	3×10^7	0	0	0	1×10^2	0	0	115×10^2	8×10^2	8×10^2
16	$3,83 \times 10^7$	0	0	0	3×10^2	1×10^2	1×10^2	101×10^2	2×10^2	1×10^2
17	$2,42 \times 10^7$	0	0	0	3×10^2	1×10^2	0	2160×10^2	1300×10^2	5×10^2
18	$3,22 \times 10^7$	1×10^2	0	0	12×10^2	0	0	1076×10^2	154×10^2	10×10^2
19	$1,8 \times 10^7$	0	0	0	1×10^2	0	0	1544×10^2	996×10^2	27×10^2
20	$2,13 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	1112×10^2	3×10^2	2×10^2
21	$1,56 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	288×10^2	118×10^2	6×10^2
22	$2,5 \times 10^7$	0	0	0	1×10^2	0	0	118×10^2	5×10^2	0
23	$2,3 \times 10^7$	1×10^2	0	0	2×10^2	1×10^2	0	6×10^2	0	0
24	$2,35 \times 10^7$	0	0	0	1×10^2	1×10^2	0	828×10^2	464×10^2	47×10^2
25	$3,72 \times 10^7$	0	0	0	3×10^2	0	0	72×10^2	18×10^2	0
26	$1,7 \times 10^7$	1×10^2	1×10^2	0	6×10^2	1×10^2	0	680×10^2	437×10^2	19×10^2
27	$2,4 \times 10^7$	0	0	0	3×10^2	0	0	486×10^2	92×10^2	11×10^2
28	$1,55 \times 10^7$	0	0	0	1×10^2	0	0	395×10^2	86×10^2	12×10^2
29	$1,83 \times 10^7$	0	0	0	2×10^2	0	0	614×10^2	140×10^2	9×10^2
30	$3,18 \times 10^7$	1×10^2	0	0	6×10^2	2×10^2	0	680×10^2	286×10^2	15×10^2
31	$1,87 \times 10^7$	0	0	0	1×10^2	0	0	75×10^2	14×10^2	0
32	$3,31 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	470×10^2	289×10^2	13×10^2
33	$2,0 \times 10^7$	0	0	0	1×10^2	0	0	808×10^2	472×10^2	0
34	$1,83 \times 10^7$	0	0	0	8×10^2	0	0	403×10^2	113×10^2	23×10^2
35	$3,22 \times 10^7$	0	0	0	35×10^2	2×10^2	1×10^2	1928×10^2	728×10^2	27×10^2
36	$3,96 \times 10^7$	1×10^2	0	0	5×10^2	0	0	1940×10^2	606×10^2	0
37	$3,46 \times 10^7$	1×10^2	1×10^2	0	12×10^2	2×10^2	1×10^2	1272×10^2	149×10^2	1×10^2
38	$4,4 \times 10^7$	1×10^2	1×10^2	0	25×10^2	4×10^2	2×10^2	2604×10^2	1104×10^2	31×10^2
39	$3,96 \times 10^7$	1×10^2	0	0	15×10^2	0	0	1988×10^2	163×10^2	5×10^2
40	$4,70 \times 10^7$	0	0	0	1×10^2	0	0	1636×10^2	298×10^2	7×10^2
41	$4,72 \times 10^7$	0	0	0	3×10^2	0	0	233×10^2	33×10^2	4×10^2
42	$1,8 \times 10^7$	0	0	0	19×10^2	5×10^2	0	422×10^2	137×10^2	2×10^2
43	$3,6 \times 10^7$	1×10^2	0	0	2×10^2	0	0	964×10^2	51×10^2	1×10^2
44	$1,47 \times 10^7$	0	0	0	2×10^2	0	0	15×10^2	1×10^2	0
45	$1,85 \times 10^7$	0	0	0	1×10^2	1×10^2	0	29×10^2	6×10^2	3×10^2
46	$4,07 \times 10^7$	1×10^2	0	0	3×10^2	1×10^2	0	650×10^2	107×10^2	9×10^2
47	$3,33 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	916×10^2	205×10^2	0
48	$3,45 \times 10^7$	0	0	0	2×10^2	1×10^2	0	14×10^2	5×10^2	1×10^2
49	$4,18 \times 10^7$	1×10^2	0	0	1×10^2	0	0	2136×10^2	588×10^2	2×10^2
50	$4,6 \times 10^7$	0	0	0	4×10^2	0	0	98×10^2	1×10^2	0

Çizelge 4.13. Benzalkonyum klorür için dezenfektan duyarlılık deneylerinin sonuçları

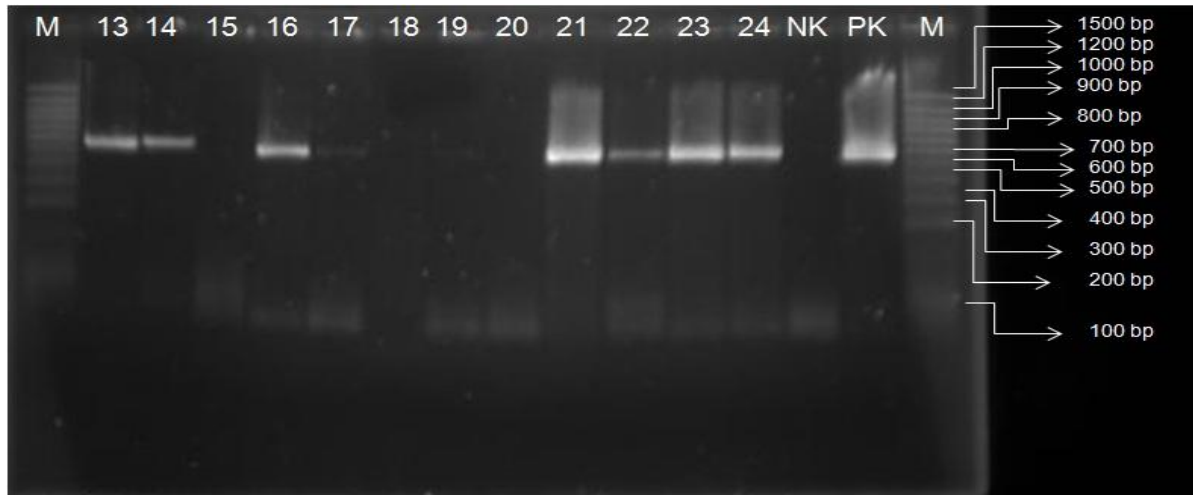
Benzalkonyum klorür		1/1			1/10			1/100		
Örnek no	Başlangıç Konsantrasyonu	1 dak	5 dak	30 dak	1 dak	5 dak	30 dak	1 dak	5 dak	30 dak
1	$2,82 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	$4,42 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	3×10^2	1×10^2	0
3	$4,98 \times 10^7$	0	0	0	1×10^2	1×10^2	0	13×10^2	8×10^2	5×10^2
4	$2,04 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	6×10^2	1×10^2	0
5	$5,05 \times 10^7$	0	0	0	1×10^2	0	0	4×10^2	1×10^2	0
6	$3,76 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	2×10^2	0	0
7	$2,15 \times 10^7$	0	0	0	1×10^2	0	0	4×10^2	1×10^2	0
8	$4,81 \times 10^7$	0	0	0	1×10^2	0	0	3×10^2	0	0
9	$4,05 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	$4,42 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	$2,15 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	$3,76 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	$4,05 \times 10^7$	0	0	0	5×10^2	0	0	28×10^2	0	0
14	$3,31 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	2×10^2	0	0
15	$1,49 \times 10^7$	0	0	0	1×10^2	0	0	273×10^2	154×10^2	83×10^2
16	$1,45 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	527×10^2	311×10^2	246×10^2
17	$2,31 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	178×10^2	67×10^2	0
18	$1,61 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	208×10^2	97×10^2	43×10^2
19	$4,06 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	337×10^2	164×10^2	91×10^2
20	$2,82 \times 10^7$	0	0	0	1×10^2	0	0	414×10^2	281×10^2	112×10^2
21	$2,27 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	1×10^2	0	0
22	$2,31 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	14×10^2	11×10^2	0
23	$3,76 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	1×10^2	0	0
24	$1,57 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	0	0	0
25	$2,31 \times 10^7$	0	0	0	1×10^2	0	0	9×10^2	0	0
26	$2,11 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	1×10^2	0	0
27	$4,81 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	$1,57 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	18×10^2	6×10^2	0
29	$1,94 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	1×10^2	1×10^2	0
30	$1,61 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	$3,33 \times 10^7$	0	0	0	2×10^2	0	0	267×10^2	0	0
32	$2,40 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	36×10^2	0	0
33	$2,31 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	0	0	0
34	$3,08 \times 10^7$	0	0	0	1×10^2	0	0	2×10^2	0	0
35	$4,53 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	0	0	0
36	$3,34 \times 10^7$	0	0	0	2×10^2	0	0	2×10^2	0	0
37	$3,08 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	10×10^2	1×10^2	0
38	$4,81 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	3×10^2	1×10^2	0
39	$4,58 \times 10^7$	0	0	0	1×10^2	0	0	58×10^2	12×10^2	1×10^2
40	$2,40 \times 10^7$	1×10^2	0	0	1×10^2	0	0	13×10^2	0	0
41	$4,81 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	4×10^2	0	0
42	$1,72 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	6×10^2	1×10^2	0
43	$2,43 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	0	0	0
44	$3,08 \times 10^7$	0	0	0	1×10^2	0	0	1×10^2	0	0
45	$2,40 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	1×10^2	1×10^2	0
46	$2,31 \times 10^7$	0	0	0	1×10^2	0	0	1×10^2	0	0
47	$5,0 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	4×10^2	1×10^2	0
48	$2,96 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	251×10^2	0	0
49	$5,0 \times 10^7$	1×10^2	0	0	1×10^2	1×10^2	0	10×10^2	4×10^2	2×10^2
50	$2,60 \times 10^7$	0	0	0	0	0	0	2×10^2	1×10^2	0

4.3. PZR Sonuçları

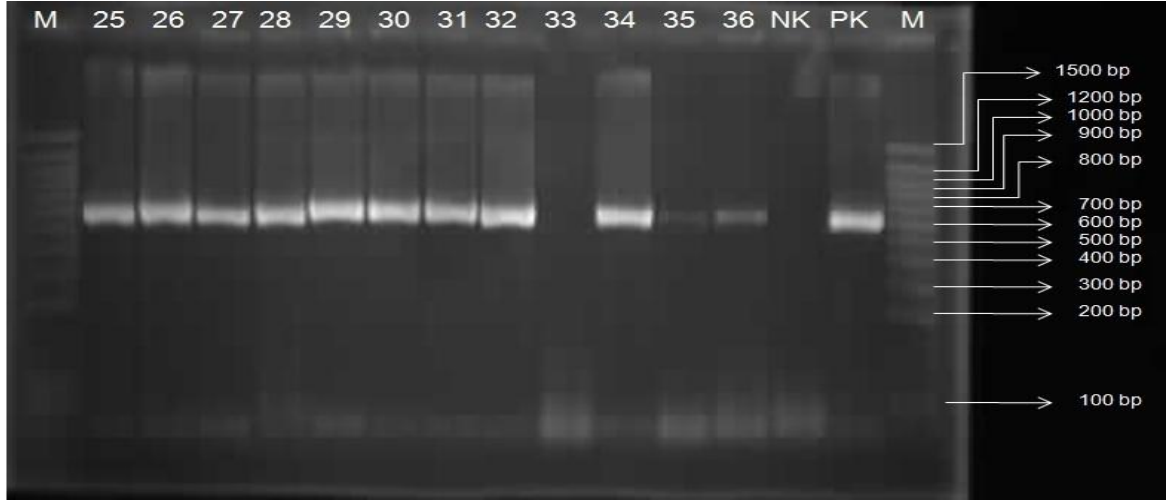
Kökenlerin *qacA* kodlayan bölgenin amplifikasyonu amacıyla *qacAB-f* ve *qacAB-r* primerleri kullanılarak yapılan PZR sonrası agaroz jel elektroforez görüntüleri sırasıyla resim 1, 2, 3, 4 ve 5'te verilmiştir.



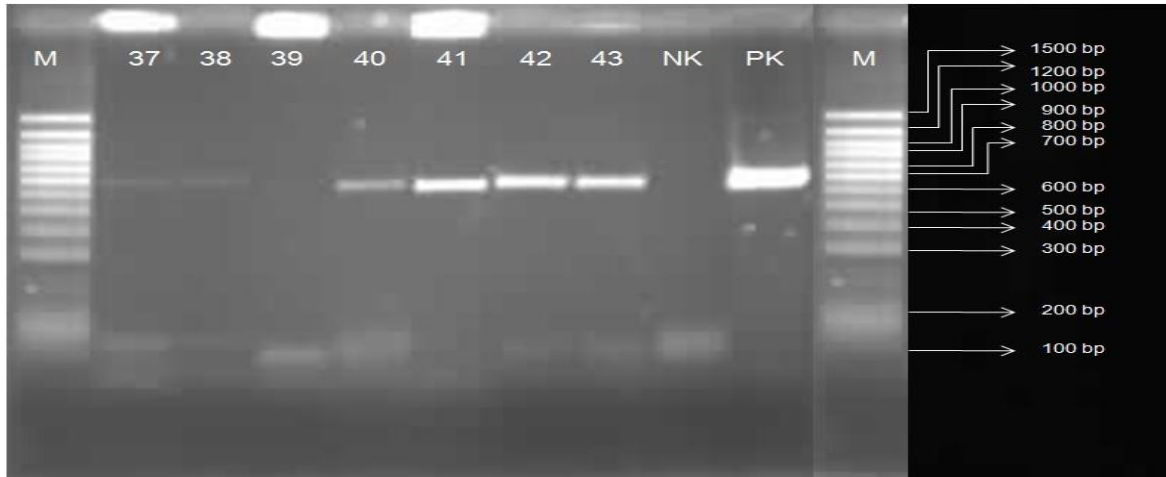
Resim 4.1. 1-12 numaralı kökenlerin *qacAB-f/r* primer çifti ile yapılan PZR sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 12: *qacAB* geni pozitif kökenler, M: moleküler ağırlık standartı (Marker), NK: Negatif kontrol, PK: *qacA/B* geni pozitif MRSA (Kobayashi, Naguchi)



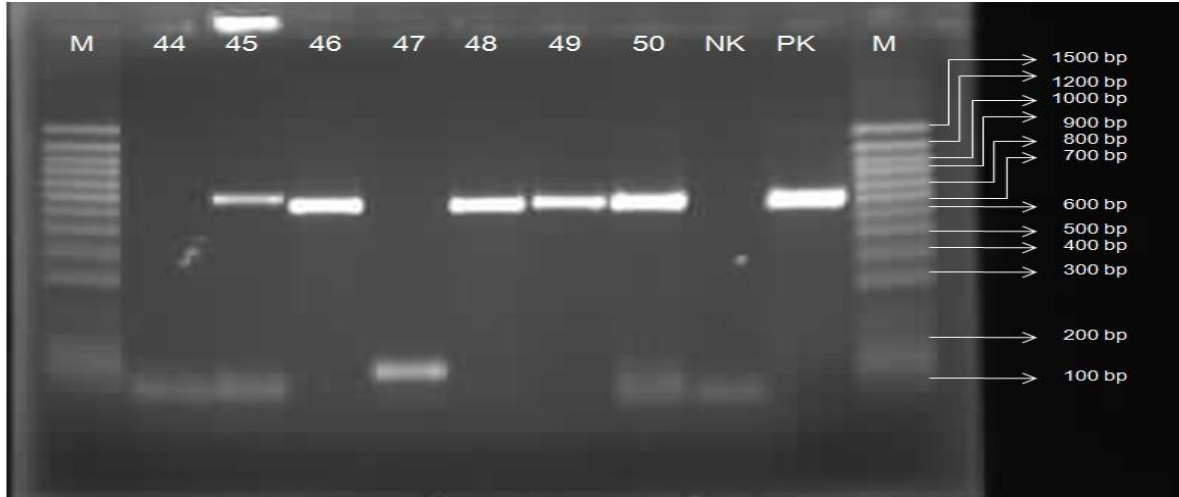
Resim 4.2. 13-24 numaralı kökenlerin *qacAB-f/r* primer çifti ile yapılan PZR sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü. 13, 14, 16, 17, 19, 21, 22, 23, 24: *qacA/B* geni pozitif kökenler, M: moleküler ağırlık standartı (Marker), NK: Negatif kontrol, PK: *qacA/B* geni pozitif MRSA (Kobayashi, Naguchi)



Resim 4.3. 25-36 numaralı kökenlerin *qacAB*-f/r primer çifti ile yapılan PZR sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü. 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36: *qacA/B* geni pozitif kökenler, M: moleküler ağırlık standartı (Marker), NK: Negatif kontrol, PK: *qacA/B* geni pozitif MRSA (Kobayashi, Naguchi)



Resim 4.4. 37-43 numaralı kökenlerin *qacAB*-f/r primer çifti ile yapılan PZR sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü. 37, 38, 40, 41, 42, 43: *qacA/B* geni pozitif kökenler, M: moleküler ağırlık standartı (Marker), NK: Negatif kontrol, PK: *qacA/B* geni pozitif MRSA (Kobayashi, Naguchi)



Resim 4.5. 44-50 numaralı kökenlerin *qacAB*-f/r primer çifti ile yapılan PZR sonrası agaroz jel elektroforez görüntüsü. 45, 46, 48, 49, 50: *qacA/B* geni pozitif kökenler, M: moleküler ağırlık standartı (Marker), NK: Negatif kontrol, PK: *qacA/B* geni pozitif MRSA (Kobayashi, Naguchi)

50 KNS suşunun 42 (%84) tanesinde *qacA/B* direnç geni pozitif tespit edilmiştir. *qacA/B* direnç geni pozitif tespit ettiğimiz suşların %2,38'i (1/42) klorheksidine ve %40,47'si (17/42) ise benzalkonyum klorüre yüksek MİK değeri (2 µg/ml'nin üzerindeki MİK değerleri) bulundu. *qacA/B* direnç geni bulunmayan suşlarda ise klorheksidin için yüksek MİK değeri saptanmazken (0/8), benzalkonyum klorür için %37,5 (3/8) oranında yüksek MİK değeri tespit edildi. *qacA/B* direnç geni pozitif ve yüksek MİK değerine sahip izolatlar, *qacA/B* direnç geni bulunmayan ve yüksek MİK değerine sahip izolatlarla göre klorheksidin ve benzalkonyum klorürün MİK değerleri daha yüksek bulundu. Ancak *qac* direnç geni bulunan (1/42) ve bulunmayan (0/8) izolatlarda klorheksidine karşı MİK değerlerinin yükselmesi açısından SPSS 15.0 programında yapılan parametrik olmayan Ki-kare testiyle istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). *qac* direnç geni bulunan (17/42) ve bulunmayan (3/8) izolatlarda benzalkonyum klorüre karşı MİK değerlerinin yükselmesi açısından SPSS 15.0 programında yapılan parametrik olmayan Ki-kare testiyle istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Ayrıca *qacA/B* direnç geni bulunan izolatlar (yüksek MİK değeri bulunan ve bulunmayanlar) ve *qacA/B* direnç geni bulunmayan izolatlarla (yüksek MİK değeri bulunan ve bulunmayanlar) kantitatif süspansiyon testi yaparak klorheksidin ve benzalkonyum klorürün klinik kullanım konsantrasyonuna karşı duyarlı oldukları sonucuna varıldı.

5. TARTIŞMA

Günümüzde nozokomiyal enfeksiyonların önlenmesi için hastane ortamlarında dezenfektan ve antiseptik preparatlar yoğun olarak kullanılmaktadır. Özellikle kuaterner amonyum bileşikleri ve klorheksidin gibi katyonik bileşikler bu preparatların içeriğinde sıklıkla bulunan kimyasallardır [3].

Kuaterner amonyum bileşikleri gibi biyositlere dirençle ilişkilendirilen *qac* genleri [*qacA*, *qacB* ve *qacC (smr)*] ilk olarak insan kaynaklı *S. aureus* ve KNS suşlarında tanımlanmış; ardından yiyecek ve yiyecek üretim ortamlarından izole edilen stafilocok türlerinde de *qacA/B* ve *smr* direnç genlerinin saptanmaya başladığı bildirilmiştir. Hastane ortamında kullanılan çoğu dezenfektan ve antiseptik preparatta klorheksidin gibi katyonik bileşikler ile benzalkonyum klorür gibi kuaterner amonyum bileşiklerine sıkça rastlanmaktadır. Bu ajanlara dirençle ilişkilendirilen, plazmidde kodlanan antiseptik direnç genleri tanımlanmıştır. Özellikle çoğul ilaç direnci kodlayan plazmidlerin bakteriler arasında aktarımı ile aynı anda hem antiseptik, dezenfektan preparatlara hem de antibiyotiklere dirençli suşların yaygınlaşması olasılığı endişe verici bir durumdur. Plazmid aracılı biyosit direnci ile ilişkili çalışmalar, enfeksiyonlardaki önemi göz önüne alınarak daha çok *S. aureus* suşları üzerinde yoğunlaşmıştır [157].

Antibiyotik dirençli *S. aureus* ve *S. epidermidis* suşlarında kuaterner amonyum bileşikleri (QACs) ve klorheksidin (CHX) gibi katyonik biyositler için düşük seviyeli plazmid aracılı direnç gözlenmiştir ve bu suşların *qac* geni taşıma olmaları nedeni ile klinik ortamlarda hayatta kalmalarını sağladığı ileriye sürülmüştür. Katyonik biyositlerin yaygın kullanımı antibiyotik ve biyositlere dirençli stafilocok suşlarının seçimine neden olabilir, ancak bu olasılığın klinik önemi tartışması devam etmektedir [158].

Ekolojik ve epidemiyolojik bakış açısından stafilocokların hastanelerde yayılmasının sebebi bazı araştırmacılara göre, antiseptik ve antibiyotiklerin her ikisinin de kullanılıyor olmasıdır. Bu antibakteriyel grupların her birinin veya her ikisinin dirençli suşlarının seçilmesine neden olduğu düşünülmektedir. Aynı zamanda başka araştırmacılara göre, kuaterner amonyum bileşikleri gibi katyonik biyositlerin yaygın kullanımının çoklu ilaç

dışarı atılım pompasına sahip, *qac* genleri bulunan bakterilerin seçilimine neden olduğu düşünülmektedir [158].

Akimitsu ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada; MRSA'ların bazı durumlarda biyosit ve antibiyotik direnci arasında ilişki olduğu yönündedir, biyositlerin klinik uygulamaya girmesinin yanı sıra oluşan bazı mutasyonlar antibiyotiğe dirençli bakterilerin seçilimine yol açabilir. Bu çalışmada MRSA'larda benzalkonyum klorür MİK değerinin $> 5 \mu\text{g/ml}$ olarak verilmiştir, oksasilin MİK değeri daha yüksek bulunan MRSA'larda ise benzalkonyum klorür MİK değeri $10 \mu\text{g/ml}$ olarak belirtilmiştir [159].

Sidhu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada; benzalkonyum klorüre dirençli *S. aureus* ve koagülaz negatif stafilokok suşların aynı zamanda, penisilin, oksasilin, sefalosporin, sefuroksim, imipenem, trimetoprim, gentamisin, doksisisiklin ve fusidik asit gibi antibiyotiklere dirençlerinin de anlamlı düzeyde yüksek olduğunu rapor etmişlerdir [1].

Ev gibi ortamlarda subletal konsantrasyonlarda kullanılan kuaterner amonyum bileşikler, bu biyositlere karşı çevrede yaygın bulunan ve potansiyel patojen olan bakterilerden dirençli olanların seçilimine yol açabilmektedir [160].

Zmantar ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, toplam 117 stafilokok suşunda (46 *S. aureus* ve 71 koagülaz negatif stafilokok) benzalkonyum klorürün MİK değeri ve *qacA*, *qacB* ve *qacC* direnç genlerini araştırmışlardır. Bu 117 stafilokok izolatın benzalkonyum klorüre karşı MİK değerlerini, $16-32 \mu\text{g/ml}$ (%20) MİK değerleri yüksek dirençli, $4-8 \mu\text{g/ml}$ (%54) MİK değerleri dirençli ve $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ (%23) MİK değerleri duyarlı olarak kabul etmişlerdir. Toplam 117 stafilokok suşunda %24 *qacA*, %15,4 *qacB* ve %35 *qacC* bulmuşlardır. Araştırmacılar *S. aureus*'larda 2 suşta her üç geni (*qacA*, *qacB* ve *qacC*) bulmuşken, %5,12 *qacA*, %3,41 *qacB* ve %4,27 *qacC* direnç geni pozitif bulmuşlardır. KNS'lerde ise 9 suşta her üç geni (*qacA*, *qacB* ve *qacC*) bulunmuşken, diğer taraftan çalışmaya alınan 32 *S. epidermidis* suşun arasından 5 *qacA*, 2 *qacB* ve 16 *qacC* direnç geni pozitif bulmuşlardır. Araştırmacılar diyaliz biyomateriyallerinde *qac* direnç genini taşıyan stafilokokların yaygın bulunma sebebinin, direncin tür ve suşlar arasındaki plasmidler tarafından transfer edilmesi ile dirençli stafilokokların yayılmasına neden olduğunu düşünmüşlerdir [156].

Noguchi ve arkadaşları 1998-1999 yılları arasında 11 Asya ülkesinden (Japonya, Güney Kore, Çin, Filipin, Singapur, Vietnam, Tayland, Endonezya, Hindistan, Sri Lanka ve Suudi Arabistan) toplanan 894 MRSA izolatın antiseptik ajanlara duyarlılıkları incelemişlerdir. Çalışmada, Asya MRSA izolatlarında %41,6 (372/894) oranında *qacA/B* direnç genini tespit etmişlerdir. 11 ülkeyi kapsayan bu çalışmada *qacA/B* direnç genlerin bulunma olasılığı %2,6 (Hindistan) ile %72,4 (Singapur) arasında değişmektedir. Asya ülkelerinden izole edilen MRSA suşlarının klorheksidin diglukonat için MİK değerleri < 0,5–16 µg/ml arasında değişirken, benzalkonyum klorür için MİK değerleri 1-16 µg/ml arasında değişmektedir. Bu sonuçlar göre *qacA/B* direnç geninin Asya'da MRSA'lar arasında hızla yayıldığını düşündürmektedir. Bu nedenle, antiseptik dirençli MRSA'ların gözetimi hastane enfeksiyonu kontrolü hakkında önemli bilgiler verebilmektedir [161].

Mayer ve arkadaşları 1997-1999 yıllarında 14 farklı Avrupa ülkesini kapsayan çalışmalarında, 24 farklı araştırma hastanesinden toplanan kan, deri ve yumuşak doku kültüründen izole edilen 297 MRSA ve 200 MSSA toplam 497 *S. aureus* suşunda antiseptik direnç genlerinin prevalansını ve dağılımını incelemişlerdir. MRSA'ların %63'ünde (186/297) ve MSSA'ların %12'sinde (24/200) *qacA/B* direnç genlerini tespit etmişlerdir. Bu genlerin prevalansının yüksek bulunuşunu, dezenfeksiyon ajanların hastanelerde yaygın kullanımının zorunlu seçici etkisi olarak yorumlamışlardır. Ayrıca MRSA izolatlarında *qacA/B* genlerin MSSA izolatlarına göre daha yüksek oranda bulunması, bu *qacA/B* genlerin çoklu ilaç direnci taşıyan plazmidlerde yaygın bulunuşunun bir sonucu olarak yorumlamışlardır. Bu antiseptik direnç genlerinin prevalansının Avrupa hastanelerinde lokal değil yaygın bir sorun olduğu anlamına gelmektedir [162].

Noguchi, Nakaminami ve arkadaşları 1999-2004 yılları arasında toplam 283 MRSA izolatında [66 impetigo hasta izolatı, 10 SSSS (Staphylococcal Scalded Skin Syndrome) hasta izolatı ve 207 farklı poliklinik hasta izolatı] klorheksidin diglukonat ve benzalkonyum klorürün MİK ve *qacA/B* direnç genini araştırmışlardır. Çalışmaya alınan bakterilerden impetigo ve SSSS dışındaki MRSA izolatlarında %45,9 (95/207) oranında antiseptik direnç geni olan *qacA/B* geni pozitifliği tespit etmişlerdir. Bu MRSA izolatlarında benzalkonyum klorür ve klorheksidin diglukonat MİK değerleri aynı oranlarda 1-8 µg/ml olarak belirtmişlerdir. İmpetigo ve SSSS hastalarından izole ettikleri MRSA'lardan %1,3 oranında *qacA/B* geni taşıdığını bulmuşlardır, bu izolatlar benzalkonyum klorür için MİK değerini 2-4 µg/ml, klorheksidin diglukonat için MİK değerini ise 1-4 µg/ml olarak

belirtmişlerdir. Araştırmacılar çalışmalarının sonuçlarına göre *qacA/B* direnç genleri taşıyan spesifik MRSA klonlarının yaygın olmadığını ama farklı MRSA klonları arasında horizontal olarak aktarıldığını ileri sürmüşlerdir. İmpetigo ve SSSS hastalardan izole edilen MRSA izolatlarında *qacA/B* geninin daha düşük oranda bulunma sebebi bu izolatların katyonik antiseptik maddelere karşı daha duyarlı olduklarının sonucuna varmışlardır [163].

Leelaporn ve arkadaşları 164 klinik KNS suşlarında dezenfektan ve antiseptik direncini araştırmışlardır. Bu 164 suşun 65 (%40) tanesinde çalışmada kullanılan bir veya birden fazla dezenfektan ve antiseptiğe karşı direnç tespit etmişlerdir. 40 dirençli KNS izolatın katyonik bileşiklerin MİK değerlerini incelemişlerdir. Bu 40 izolatın %50'sinde *qacA/B* bulunurken, %40'ında hem *qacA* hem de *qacC* bulunmuştur, *qacC* ise izolatların %10'unda bulunmuştur. *qacA/B* pozitif bulunan 20 KNS izolatın benzalkonyum klorür MİK değerini 1-6 mg/L, klorheksidin MİK değerini ise 2-4 mg/L olarak belirtmişlerdir [2].

McDonnell ve arkadaşları *S. aureus* suşları için klorheksidin için MİK değerleri 0,5-1 µg/ml ve benzalkonyum klorür için MİK değerini 0,5 µg/ml olarak belirtilmiştir. *qacA/B* ve *qacC/D* geni taşıyan MRSA suşlarında antiseptiğe karşı MİK değerinin artabileceğinden bahsetmişlerdir. Farklı *qac* direnç genlerini taşıyan stafilokoklarda klorheksidin ve benzalkonyum klorüre MİK değerleri şöyle verilmiştir: *qacA*, *qacB*, *qacC* ve *qacD* genlerini taşıyan bakterilerin hepsinde benzalkonyum klorür için MİK değeri >3 µg/ml olarak verilmiş, *qacA* geni taşıyan bakterilerde klorheksidin için MİK değeri 2,5 µg/ml, *qacB*, *qacC* ve *qacD* geni taşıyan bakterilerde klorheksidin MİK değeri ise 1 µg/ml olarak belirtilmiştir [137].

Block ve Furman yaptıkları bir çalışmada farklı kliniklerden izole edilen hastane enfeksiyonu etkenleri arasında MRSA, MSSA ve KNS'lerinde bulunduğu farklı mikroorganizmalarda klorheksidin duyarlılığı ve yoğun klorheksidin kullanımı arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. İzolatların klorheksidin duyarlılıklarını MİK ve disk difüzyon yöntemi kullanarak değerlendirmişlerdir. İstatiksel olarak klorheksidin kullanım konsantrasyonu ile hastanede yatan hastalardan izole edilen bütün mikroorganizmaların duyarlılığı arasında ters ilişki bulmuşlardır. Araştırmacılar çalışmaların sonuçlarına göre stafilokoklar diğer mikroorganizmalarla kıyaslandığında klorheksidine daha duyarlı olduklarını bulmuşlardır. MSSA'larda klorheksidin MİK değerleri 1-64 µg/ml arasında değişirken MRSA'larda 0,5-8 µg/ml arasında değişmektedir. KNS'lerde ise klorheksidin

MİK değerleri 0,5-32 µg/ml arasında değişmektedir. Ayrıca hastanede yatan hastalardan izole edilen mikroorganizmaların klorheksidine duyarlılığı ile klinik servislerde kullanılan klorheksidin yoğunluğu arasında negatif bir ilişki olduğunu göstermişlerdir [164].

Cookson ve arkadaşları Block ve Furman'ın yaptıkları çalışmanın aksine MRSA suşlarında klorheksidin MİK değerinin MSSA'lara göre daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. MRSA'larda klorheksidin MİK değerinin 4,19 µg/ml olarak bulmuşlardır [165]. İrizarry ve arkadaşları MRSA ve MSSA suşlarında klorheksidin ve kuaterner amonyum bileşiklerinin (setilpiridinyum klorür gibi) MİK değerlerini incelemişlerdir. MRSA suşlarında klorheksidin ve kuaterner amonyum bileşiğine MİK değerinin MSSA'lara göre 5-10 kat daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. MRSA'larda klorheksidin MİK değerinin 5-10 µg/ml olarak belirtmişlerdir [154].

Suller ve arkadaşları *S. aureus* suşlarında agar difüzyon yöntemi kullanarak klorheksidin ve benzalkonyum klorürün MİK değerlerini araştırmışlardır. MRSA'larda benzalkonyum klorür için MİK değerini 1,5-4 µg/ml, klorheksidin için MİK değerini ise 1,5-3 µg/ml olarak bulmuşlardır [166].

Zhang ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, hastanede çalışan hemşirelerden izole edilen toplam 249 *S. aureus* ve KNS izolatlarında klorheksidin ve benzalkonyum klorürün MİK değerleri ve *qacA/B* dezenfektan direnç genlerini araştırmışlardır. *S. aureus*'larda 36 suшта *qacA/B* pozitif bulunurken, KNS'lerde ise 48 suшта *qacA/B* pozitif bulmuşlardır. 36 *qacA/B* pozitif *S. aureus* suşlarında benzalkonyum klorürün MİK değerleri 0,5-4 µg/ml iken, klorheksidin MİK değerleri ise 1-8 µg/ml bulmuşlardır. 48 *qacA/B* pozitif KNS suşlarında ise benzalkonyum klorürün MİK değerleri 0,5-64 µg/ml iken, klorheksidin MİK değerleri ise 0,5-8 µg/ml bulmuşlardır. Hemşirelerden izole edilen stafilokoklarda antiseptik direnç genlerinin artan prevalansı, hastane ortamında bu suşların taşınması için seçici baskı olabileceğini göstermektedir [167].

Miyazaki ve arkadaşları Brezilya'da yaptıkları çalışmada, 2002-2003 yılları arasında 3 devlet hastanesinden toplam 74 MRSA suşu izole etmişlerdir. Bu çalışmada MRSA suşlarında *qacA/B* dezenfektan direnç genini araştırmışlardır. Araştırmacılar PCR yöntemi kullanarak MRSA izolatlarında %80 oranında *qacA/B* geni pozitif bulmuşlardır. Bu

sonuçlar *qacA/B* geni Brezilya MRSA suşlarında ilk kez rapor edilmiş ve genlerin yüksek oranda saptanmasının düşündürücü bir sonuç olduğunu bildirmişlerdir [168].

Sheng ve arkadaşları Tayvan'da yaptıkları çalışmada, 26 hastaneden toplam 206 MRSA izolatında klorheksidin MİK değerleri ve *qacA/B* dezenfektan direnç genini araştırmışlardır. 206 MRSA izolatın klorheksidin MİK değerleri 0,125-16 µg/ml arasında değişirken, klorheksidin MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla 2 ve 8 µg/ml olarak bulmuşlardır. MRSA izolatların 73'ünde (%35,4) *qacA/B* dezenfektan direnç genini pozitif bulmuşlardır. Tayvan'da bazı MRSA klonlarında *qacA/B* genlerinin varlığı, genellikle klorheksidin ve çeşitli antiseptik maddelerle karşı yüksek dirençle ilişkili olup, MRSA enfeksiyonlarının tedavisi için ilaçların seçimini kısıtlayabilir ve MRSA enfeksiyon kontrolünde zor bir sorun teşkil edebilmektedir [169].

Ho ve arkadaşları 2008-2009 yılları arasında kan kültüründen toplanan 60 MSSA ve 96 MRSA izolatında klorheksidin MİK değerleri ve *qacA/B* ve *smr* dezenfektan direnç genlerini araştırmışlardır. MSSA suşlarında klorheksidin MİK değerleri 0,5-4 µg/ml arasında değişirken, MRSA suşlarında ise klorheksidin MİK değerleri 0,125-4 µg/ml arasında değişmektedir. Klorheksidin MİK₅₀ değerleri MSSA suşlarında 1 µg/ml iken, MRSA suşlarında ise 2 µg/ml olarak bulmuşlardır. MSSA suşlarında %3,3 *qacA/B* geni ve %5 *smr* geni pozitif bulunurken, MRSA suşlarında ise %43,8 *qacA/B* geni ve %25 *smr* geni pozitif bulmuşlardır. MRSA suşlarındaki *qacA/B* genlerin artışı göz ardı edilemez, çünkü enfeksiyon kontrolünde MRSA tehdidi sadece glikopeptidlere karşı sınırlı kalmayıp aynı zamanda klinik işlemlerde kullanılan biyositlere de karşı yaygın direnç neden olabilmektedirler. Bu yüzden dezenfektan direnç genlerin aktarımının anlaşılması için daha fazla araştırmalar yapılmasını gerektiğini söylemişlerdir [170].

Longtin ve arkadaşları Kanada'da yaptıkları bir çalışmada, 2005-2009 yılları arasında iki yoğun bakım ünitesinden toplam 334 MRSA izolatı toplamışlardır. Bu izolatlarda *qacA/B* ve *smr* dezenfektan direnç genlerini araştırmışlardır. MRSA izolatların 7 (%2) tanesinde *qacA/B* geni pozitif bulunurken, *smr* geni ise izolatların 23 (%7) tanesinde pozitif bulmuşlardır [171].

Vali ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, Yeni Edinburg Kraliyet Hastanesi klinik laboratuvarlarından 120 MRSA izolatı toplamışlardır. Bu izolatlarda *qacA/B*, *qacG*, *qacH*

ve *smr* dezenfektan direnç genlerini araştırmışlardır. *qacA/B* geni 10 (%8,3) izolatta, *qacH* geni 4 (%3,3) izolatta ve *smr* geni 54 (%44,2) izolatta pozitif olarak saptamışlardır. *qacG* geni ise herhangi bir izolatta saptamamışlardır. izolatların %4,2 (5/120)'sinde *qacA/B* ve *smr* genleri beraber pozitif olarak tespit etmişlerdir. Hastane ortamında uygulanan dezenfektanların kalıntılarının oluşturduğu seçici baskı sonucu, klinik izolatlarda klorheksidine karşı azalmış duyarlılık gözlenebilmektedir. Bu sonuçlar klinik suşlarda etkinlik testlerin yapılmasının ve iyi bir enfeksiyon kontrol yönteminin uygulanmasının önemini vurgulamaktadır [4].

Türkiye'de dezenfektan direnç genleriyle ilgili ilk araştırma, 2006 yılında Aykan tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada 69 MRSA suşunun 8 (%11,5) tanesinde *qacA/B* geni saptanmıştır. Bu suşların klorheksidin ve benzalkonyum klorürün için MİK değerleri 2-8 µg/ml olarak bulunmuştur. Klorheksidin için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla 2 ve 4 µg/ml olarak bulunmuştur. Benzalkonyum klorür için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ise sırasıyla 2 ve 8 µg/ml olarak bulunmuştur [172].

Nakipoğlu ve arkadaşları yaptıkları çalışmada İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalına 2006-2010 yılları arasında gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 50'si metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) ve 50'si metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) toplam 100 *S. aureus* suşunda *qacA/B* ve *smr* dezenfektan direnç genlerini araştırmışlardır. MRSA suşlarının %36 (18/50)'sında *smr*, MSSA suşlarının %4 (2/50)'ünde *qacA/B* genleri saptanmıştır. Ancak bu çalışmada MRSA suşlarında *qacA/B* genine rastlanmazken, MSSA suşlarında da *smr* geni görülmemiştir [157].

Bizim çalışmamız sonucunda *qacA/B* direnç geni bulunan ve bulunmayan tüm KNS izolatlarında klorheksidin glukonat için MİK değerlerinin dağılımı 0,03125-4 µg/ml arasında değişirken, benzalkonyum klorür için MİK değerlerinin dağılımı 0,015625-8 µg/ml arasında değişmektedir. Klorheksidin için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri sırasıyla 0,5 ve 2 µg/ml olarak bulunurken, benzalkonyum klorür için MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri ise sırasıyla 2 ve 4 µg/ml olarak bulunmuştur. 50 KNS suşunun 42 (%84) tanesinde *qacA/B* dezenfektan direnç geni pozitif saptanmıştır. Çalışmamızda klorheksidin ve benzalkonyum klorür için 2 µg/ml ve üzerindeki MİK değerine sahip KNS'ler dirençli olarak yorumlandığında [137, 154-156], *qacA/B* direnç geni pozitif tespit ettiğimiz suşların

%2,38'i klorheksidine ve %40,47'si ise benzalkonyum klorür dirençli bulunmuştur. Çalışmamızda *qacA/B* direnç geni bulunmayan KNS suşlarında ise klorheksidin glukonat için MİK değerlerinin dağılımı 0,125-1 µg/ml arasında değişirken, benzalkonyum klorür için MİK değerlerinin dağılımı 0,015625-8 µg/ml arasında değişmektedir. 2 µg/ml ve üzerindeki MİK değerine sahip KNS'ler dirençli olarak yorumlandığında, *qacA/B* direnç geni bulunmayan KNS suşlarında klorheksidine duyarlı bulunurken (0/8), benzalkonyum klorüre %37,5 (3/8) dirençli bulunmuştur. Çalışmamızda elde ettiğimiz bu sonuçlara göre KNS'lerde kuaterner amonyum bileşiği olarak kullandığımız benzalkonyum klorüre duyarlılığın, klorheksidin duyarlılığından daha az olduğu görülmektedir.

Opacic ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, toplam 100 *S. aureus* suşunda *qacA/B* dezenfektan direnç geni ve kantitatif süspansiyon testi kullanarak %1 ve %4 klorheksidin glukonat konsantrasyonunun antimikrobiyal etkisini incelemişlerdir. %1 klorheksidin glukonatın 30, 60 ve 120 saniye temas sonrası MRSA ve MSSA'larda bakterisidal etki göstermemiştir. %4 'lük konsantrasyonunda klorheksidin glukonatın tüm temas sürelerinde MRSA ve MSSA'larda bakterisidal etki göstermiş olduğunu bulmuşlardır. *qacA/B* dezenfektan direnç geni ise 50 MRSA suşun 16 (%32) tanesinde ve 50 MSSA suşun 1 (%2) tanesinde, toplam 100 *S. aureus* suşun 17 (%17) tanesinde pozitif olarak bulmuşlardır [173].

Oie ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, metisilin dirençli *S. aureus*'larda dezenfektan maddelerin etkilerini değerlendirmişlerdir. %0,1'lik klorheksidin glukonatın 10 dakikada bakteriler üzerinde bakterisidal etkisini göstermiştir. Biyofilm içerisindeki bakterilere aynı testi uyguladıklarında ise klorheksidin glukonatın %1, %0,5 ve %0,1'lik konsantrasyonları 60 dakikada bile bakterisidal olarak etkisiz bulunmuştur. Biyofilm içerisindeki bakteriler benzalkonyum klorürün %1'lik konsantrasyonu 10 dakika içerisinde bakterisidal etkisi bulunurken, %0,5'lik konsantrasyonunda ise 30 dakika içerisinde bakterisidal olarak etkili bulmuşlardır. Biyofilm içerisindeki MRSA'larda benzalkonyum klorürün klorheksidin glukonata göre bakterisidal etkisinin daha fazla olduğunu belirtmişlerdir [174].

İrikli ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, %4 klorheksidin glukonatın metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) ve metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) suşlarının üzerine farklı konsantrasyonlarda (1/10- 1/100- 1/1000 sulandırım) ve temas sürelerinde (1, 2, 5, 10, 30 dk) kalitatif süspansiyon test yöntemi ile etkilerini araştırmışlardır. %4 klorheksidin

glukonatın tüm konsantrasyonlarda ve temas sürelerinde hem MRSA hem de MSSA suşlarında etkili olduklarını bulmuşlardır. Değişik hastane ortamlarından izole edilen bakterilerin duyarlılıkları farklı olabileceğinden ve sık kullanılan dezenfektanlara karşı direnç gelişimi fazla olabileceği için hastane enfeksiyonlarının kontrolünde her hastanenin mevcut mikroorganizmalarına karşı etkili dezenfektanları saptayarak malzeme seçimi yapmasının yararlı olacağını düşünmüşlerdir [175].

Erbay ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, farklı kliniklerden izole edilen MRSA suşlarının dezenfektanlara karşı duyarlılıklarını ölçmek için tüp dilüsyon yöntemi kullanmışlardır. Çeşitli servislerde kullanılmakta olan dezenfektanlardan %15 setrimid + %1,5 klorheksidin ve %10 benzalkonyum klorürün etkinlikleri değerlendirilmek üzere çalışmaya dahil etmişlerdir. Dezenfektanların yüzey dezenfeksiyonu için önerilen kullanım konsantrasyonları ve kullanım konsantrasyonunun iki kat dilüsyonları hazırlamışlardır (setrimid + klorheksidin solüsyonundan %1 ve %0,5'lik konsantrasyonda, benzalkonyum klorür %1 ve %0,5'lik konsantrasyonda çeşme suyu kullanılarak dilüe etmişlerdir). MRSA suşlarının süspansiyonları dezenfektanlar ile muameleden sonra 1., 5. ve 20. dakikalarda yapılan ekimler sonrası setrimid + klorheksidinin kullanılmakta olan %1'lik solüsyonunun, MRSA suşları üzerinde %100 etkili olduğunu bulmuşlardır. %0,5'lik solüsyonunu ise sadece 20. Dakikada etkili olduğunu bulmuşlardır. Benzalkonyum klorürün %1'lik solüsyonu, MRSA suşlarına karşı 5. ve 20. dakikalarda %100 etkin olduğunu saptamışlardır. %0,5'lik solüsyonunu ise sadece 20. Dakikada etkili olduğunu bulmuşlardır. Hastane enfeksiyonlarının kontrolünde her hastanenin mevcut mikroorganizmalarına karşı duyarlı dezenfektanları saptayarak malzeme seçimi yapılmasının yararlı olacağını düşünmektedirler [176].

Bizim çalışmamızda %4 klorheksidin diglukonatın ve %1 benzalkonyum klorürün çözeltisinin 1/1, 1/10 ve 1/100'lük konsantrasyonlarının KNS'ler üzerinde 1, 5 ve 30 dakika temas sonrası bu dezenfektanların bakterisidal etkinliğini incelediğimizde, her iki dezenfektanın 1/1'lik konsantrasyonları tüm bakteri suşlarında bakterisidal etkili bulunmuştur.

Klorheksidin diglukonatın 1/10'lük konsantrasyonunun 1. dakika temas sonrası 29 (%58), 5. dakika temas sonrasında 46 (%92) ve 30. dakika temas sonrası ise izolatların 49 (%98) tanesinde bakterisidal etkili bulunmuştur. Klorheksidin diglukonatın 1/100'lük

konsantrasyonun 1. dakika temas sonrası tüm izolatlarda bakterisidal etkisiz bulunurken, 5. dakika temas sonrası 5 (%10) ve 30. dakika temas sonrası ise izolatların 22 (%44) tanesinde bakterisidal etkili bulunmuştur.

Benzalkonyum klorürün 1/10'luk konsantrasyonunun 1. dakika temas sonrası suşların 49 (%98) tanesinde bakterisidal etkili bulunurken, 5. ve 30. dakika temas sonrası ise tüm KNS suşlarının üzerinde bakterisidal etkili bulunmuştur. Benzalkonyum klorürün 1/100'lük konsantrasyonunun 1. dakika temas sonrası 29 (%58), 5. dakika temas sonrası 40 (%80) ve 30. dakika temas sonrası ise izolatların 44 (%88) tanesinde bakterisidal etkili bulunmuştur.

qacA/B direnç geni pozitif tespit ettiğimiz suşların %2,38'i (1/42) klorheksidine ve %40,47'si (17/42) ise benzalkonyum klorüre yüksek MİK değeri (2 µg/ml'nin üzerindeki MİK değerleri) bulundu. *qacA/B* direnç geni bulunmayan suşlarda ise klorheksidin için yüksek MİK değeri saptanmazken (0/8), benzalkonyum klorür için %37,5 (3/8) oranında yüksek MİK değeri tespit edildi. *qacA/B* direnç geni pozitif ve yüksek MİK değerine sahip izolatlar, *qacA/B* direnç geni bulunmayan ve yüksek MİK değerine sahip izolatlara göre klorheksidin ve benzalkonyum klorürün MİK değerleri daha yüksek bulundu. Ancak *qac* direnç geni bulunan (1/42) ve bulunmayan (0/8) izolatlarda klorheksidine karşı MİK değerlerinin yükselmesi açısından SPSS 15.0 programında yapılan parametrik olmayan Ki-kare testiyle istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). *qac* direnç geni bulunan (17/42) ve bulunmayan (3/8) izolatlarda benzalkonyum klorüre karşı MİK değerlerinin yükselmesi açısından SPSS 15.0 programında yapılan parametrik olmayan Ki-kare testiyle istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Ayrıca *qacA/B* direnç geni pozitif izolatlar (yüksek MİK değeri bulunan ve bulunmayanlar) ve *qacA/B* direnç geni bulunmayan izolatlara (yüksek MİK değeri bulunan ve bulunmayanlar) kantitatif süspansiyon testi yaparak klorheksidin ve benzalkonyum klorürün klinik kullanım konsantrasyonuna karşı duyarlı oldukları sonucuna varıldı.

Sonuç olarak çevre değişikliğine uyum sağlayabilen mikroorganizmalar antiseptik ve dezenfektan maddelerin gereksiz yere ve önerilen konsantrasyonların altında kullanılması bu maddelere karşı direnç gelişimini hızlandırmaktadır. Direnç gelişimindeki olası mekanizmalar hedef bölge değişimi, hücre duvarı değişimine bağlı alımının azalması ve dışarı atılım şeklinde tanımlanmaktadır. Dezenfektanlara karşı gelişen direnç

mekanizmaları arasında dışarı atılım yolu oldukça önemlidir. Bu mekanizmadan sorumlu genler genellikle plazmidler tarafından kodlanmaktadır. Plazmid aracılığı ile gelişen direnç *qac* genleri tarafından kodlandığı belirlenmiştir. Bu genler birçok dezenfektana karşı azalmış duyarlılığı kodlamakta olup plazmid üzerinde de bulunabilmeleri nedeniyle önemlidir. Bu genler dezenfektanları dışarı atılımdan sorumlu proteinlerini kodlamaktadır. Dezenfektanlara karşı artmış MİK değerlerinin *qac* genlerini taşıyan stafilokok suşları arasında yaygın bir şekilde görüldüğü bildirilmektedir. Bu sebeple bakterilerin bu genleri taşıyıp taşımadığını ve sahip olunan genlerin fenotipik yansımasının olup olmadığını bilmek bu bakteri kaynaklı hastane enfeksiyonlarının önlenmesinde önemlidir.

Ayrıca *qac* genleri antibiyotiklere duyarlı stafilokoklarda bulunmaktan ziyade antibiyotiklere dirençli olan stafilokoklarda bulunmaktadır ve klorheksidin ile kuaterner amonyum bileşiklerinin klinik uygulamalarda kullanılmasının dirençli stafilokokların seçilmesinden sorumlu olduğu ileri sürülmektedir. Bu yüzden her hastanede özellikle sık saptanan mikroorganizmalara karşı etkin dezenfektanların belirlenerek, dezenfeksiyon rehberleri ve politikalarının oluşturulması, uygulamaların periyodik aralıklarla kontrol edilmesi gerekmektedir.

6. SONUÇ

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına Ekim 2010 - Ağustos 2011 tarihleri arasında yatan hastalardan gönderilen kan kültürü ve kateter içi kan kültürü örneklerinden izole edilen 50 koagülaz negatif stafilokok kökenlerinde *qacA/B* dezenfektan direnç geninin varlığı ve dağılımı araştırıldı. %84 oranında *qacA/B* direnç geni pozitifliği tespit edildi.

MİK ve kantitatif süspansiyon testleri yapılarak, klorheksidin diglukonat ve benzalkonyum klorürün bakteriyostatik ve bakterisidal etkileri belirlendi, *qacA/B* direnç genlerin fenotipik olarak dezenfektan direncine yol açıp açmadığı veya ne ölçüde yol açtığı da araştırıldı. Kantitatif süspansiyon testleri yapılarak, %4 klorheksidin diglukonat ve %1 benzalkonyum klorürün 1/1'lik konsantrasyonları tüm KNS suşlarında bakterisidal etkili bulundu.

Klorheksidin diglukonatın 1/10'lük konsantrasyonunun 1. dakika temas sonrası 29 (%58), 5. dakika temas sonrasında 46 (%92) ve 30. dakika temas sonrası ise izolatların 49 (%98) tanesinde bakterisidal etkili bulundu. Klorheksidin diglukonatın 1/100'lük konsantrasyonunun 1. dakika temas sonrası tüm izolatlarda bakterisidal etkisiz bulunurken, 5. dakika temas sonrası 5 (%10) ve 30. dakika temas sonrası ise izolatların 22 (%44) tanesinde bakterisidal etkili bulundu.

Benzalkonyum klorürün 1/10'lük konsantrasyonunun 1. dakika temas sonrası suşların 49 (%98) tanesinde bakterisidal etkili bulunurken, 5. ve 30. dakika temas sonrası ise tüm KNS suşlarının üzerinde bakterisidal etkili bulundu. Benzalkonyum klorürün 1/100'lük konsantrasyonunun 1. dakika temas sonrası 29 (%58), 5. dakika temas sonrası 40 (%80) ve 30. dakika temas sonrası ise izolatların 44 (%88) tanesinde bakterisidal etkili bulundu.

50 KNS suşunun %98'inde klorheksidin için MİK değeri ≤ 2 µg/ml bulunurken, %2'sinde ise 2 µg/ml'nin üzerinde bulundu. Benzalkonyum klorür çözeltilisinin 50 KNS suşunun %60'ında MİK değeri ≤ 2 µg/ml bulunurken, %40'ında ise 2 µg/ml üzerinde bulundu.

Sonuç olarak çalışmamızda polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile *qacA/B* dezenfektan direnç geni pozitifliği tespit ettiğimiz KNS suşlarının hepsi için klorheksidin diglukonat ve

benzalkonyum klorürün klinik kullanım konsantrasyonlarına karşı duyarlı bulundu. Klorheksidin diglukonat ve benzalkonyum klorürün *qacA/B* direnç geni bulunan ve yüksek MİK değerine sahip olan bakterilerde bakterisidal olarak etkili bulundu. Direnç genlerinin ve artmış MİK değerlerinin direnç fenotipine yansımaları sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

1. Sidhu, M. S, Heir, E., Leegaard, T., Wiger, K., Holck, A. (2002). Frequency of disinfectant resistance genes and genetic linkage with beta-lactamase transposon Tn552 among clinical staphylococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(9), 2797-2803.
2. Leelaporn, A., Paulsen, I. T., Tennent, J. M., Littlejohn, T. G., and Skurray, R. A. (1994). Multidrug resistance to antiseptics and disinfectants in coagulase-negative staphylococci. *Journal of Medical Microbiology*, 40(3), 214-220.
3. Smith, K., Gemmell, C. G., and Hunter, I. S. (2008). The association between biocide tolerance and the presence or absence of qac genes among hospital-acquired and community-acquired MRSA isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(1), 78-84.
4. Vali, L., Davies, S. E., Lai, L. G., Dave, J., and Amyes, S. G. (2008). Frequency of biocide resistance genes, antibiotic resistance and the effect of chlorhexidine exposure on clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(3), 524-532.
5. Noguchi, N., Hase, M., Kitta, M., Sasatu, M., Deguchi, K., and Kono, M. (1999). Antiseptic susceptibility and distribution of antiseptic-resistance genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 172(2), 247-253.
6. Teixeira, C. F., Pereira, T. B., Miyazaki, N. H., and Villas Boas, M. H. (2010). Widespread distribution of *qacA/B* gene among coagulase-negative *Staphylococcus* spp. in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Hospital Infection*, 75(4), 333-334.
7. Bannerman, T. L. (2003). *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Tenover, R. H. Tenover (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology*. Eighth edition. Washington DC: American Society for Microbiology, pp. 384-404.
8. Kloos, W. E., Bannerman, T. L. (1994). Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 7(1), 117-140.
9. İnternet: Todar, K. Todar's Online Textbook of Bacteriology, The Bacterial Flora of Humans. URL: <http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.textbookofbacteriology.net%2F&date=2014-05-24>, Son Erişim Tarihi: 24.05.2014.
10. Peacock, S. J. (2005). *Staphylococcus*. In S. P. Borriello, P. R. Murray, G. Funke (Eds.), *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. Tenth edition. London, United Kingdom: Hodder Arnold, pp. 771-832.
11. Bilgehan, H. (2000). *Klinik mikrobiyoloji: özel bakteriyoloji ve bakteri enfeksiyonları*. İzmir: Şafak Matbaası, 239-316.

12. Kartal, E. D. (2007, 4-8 Nisan). *Bakteriler ve Dezenfektanlara Direnç*. 5. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresinde sunuldu, Antalya.
13. Russell, A. D. (2002). Introduction of biocides into clinical practice and the impact on antibiotic-resistant bacteria. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 92, 121S–135S.
14. Jehle, K., Jarrett, N., and Matthews, S. (2008). Clean and green: saving water in the operating theatre. *The Royal College of Surgeons of England*, 90(1), 22–24.
15. Koneman E. W., Allen S. D., Janda W. M., Schreckenberger P. C. (1997). The gram-positive cocci: Part 1: Staphylococci and related organism. In: S. D. Allen, E. W. Koneman, W. M. Janda, P. C. Schreckenberger, W. Winn, G. L. Woods, G. Procop (Eds.), *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Fifth edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 539-576.
16. Kawamura, Y., Hou, X. G., Sultana, F., Hirose, K., Miyake, M., Shu, S. E., and Ezaki, T. (1998) Distribution of Staphylococcus species among human clinical specimens and emended description of *Staphylococcus caprae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(7), 2038–2042.
17. Platt, R., Goodman, D. A., Hopkins, C. C. (1998). Epidemiology of nosocomial infection. In S. L. Gorbach, B. J. Bartlett, N. R. Blacklow (Eds.), *Infectious Diseases*. Second edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company, pp. 108-122.
18. Harris, L. G., Foster, S. J., and Richards, R. G. (2002). An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. *European Cells and Materials*, 4, 39-60.
19. Waldvogel, F. A. (2000). *Staphylococcus aureus* (including staphylococcal toxic shock). In: G. L. Mandel, J. E. Bennet, R. Dolin (Eds.), *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Fifth edition. New York: Churchill Livingstone, pp. 2070–2092.
20. Bilgehan, H. (2004). *Klinik mikrobiyolojik tanı* (Dördüncü Baskı). İzmir: Barış Yayınları, 495–496.
21. Cengiz, A. T. (1999). Staphylococcus., Ş. Ustacelebi. (Editör). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara. Güneş Kitabevi, s. 339-346.
22. Tünger, A. (2004). *Staphylococcus aureus*: Mikrobiyoloji, patogenezi ve epidemiyoloji., S. Ulusoy, G. Usluer, S. Ünal. (Editörler). *Gram-Pozitif Bakteri Enfeksiyonları*. Ankara. Bilimsel Tıp Yayınevi, s. 9-68.
23. Baba, T., Takeuchi, F., Kuroda, M., Yuzawa, H., Aoki, K., Oguchi, A., Nagai, Y., Iwama, N., Asano, K., Naimi, T., Kuroda, H., Cui, L., Yamamoto, K., and Hiramatsu, K. (2002). Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *The Lancet*, 359(9320), 1819-1827.

24. Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y., Lian, J., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Takahashi, N. K., Sawano, T., Inoue, R., Kaito, C., Sekimizu, K., Hirakawa, H., Kuhara, S., Goto, S., Yabuzaki, J., Kanehisa, M., Yamashita, A., Oshima, K., Furuya, K., Yoshino, C., Shiba, T., Hattori, M., Ogasawara, N., Hayashi, H., and Hiramatsu, K. (2001). Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Lancet*, 357(9264), 1225-1240.
25. Rohrer, S., Bachi, B. B. (2003). FemABX peptidyl transferases: a link between branched-chain cell wall peptide formation and β -Lactam resistance in gram-positive Cocci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(3), 837-46.
26. Moreillon, P., Que, Y., Glauser, M. P. (2005). *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock) In: G. L. Mandell, J. E. Bennett, R. Dolin (Eds.), *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Sixth edition. Philadelphia: Churchill Livingstone, pp. 2321-2351.
27. Ünal, S. (2004). *Staphylococcus aureus*: Direnç mekanizmaları. S. Ulusoy, G. Usluer, S. Ünal. (Editörler). *Gram pozitif bakteri infeksiyonları*. Ankara. Bilimsel Tıp Yayınevi, s. 23-38.
28. Lodise, T. P., McKinnon, P. S. (2005). Clinical and economic impact of meticillin resistance in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 52(2), 113-122.
29. Lowy, F. D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *New England Journal of Medicine*, 339(8), 520-532.
30. Vancraeynest, D., Hermans, K., and Haesebrouck, F. (2004). Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence *Staphylococcus aureus* isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs. *Veterinary Microbiology*, 103(3-4), 241-247.
31. Patti, J. M., Allen, B. L., McGavin, M. J., and Hook, M. (1994). MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annual Review of Microbiology*, 48, 585-617.
32. Foster, T. J., Hook, M. (1998). Surface protein adhesins of *Staphylococcus aureus*. *Trends in Microbiology*, 6(12), 484-488.
33. Levinson, W. and Jawetz, E. (2000). *Medical Microbiology and Immunology* (Sixth edition). Singapore: Lange Medical Books/Mc Graw-Hill, 85, 95.
34. Rijinarts, H. M., Norde, W., Bouwer, E. J., Lyklema, J., and Zehnder, A. B. (1993). Bacterial adhesion under static and dynamic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(10), 3255-3265.
35. Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881-890.

36. Lindsay, D., Von Holy, A. (2006). Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know? *Journal of Hospital Infection*, 64(4), 313-325.
37. Altun, H. U., Şener, B. (2008). Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 39, 82-88.
38. Vuong, C., Otto, M. (2002). *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes and Infection*, 4(4), 481-489.
39. Cunha, M. L. R. S., Calsolari, R. A. O. (2007). Toxigenicity in *Staphylococcus* with emphasis on coagulase negative staphylococci. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 778-781.
40. Cunha, M. L. R. S., Calsolari, R. A. O. (2008). Toxigenicity in *Staphylococcus aureus* and coagulase-Negative Staphylococci: epidemiological and molecular aspects. *Microbiology Insights*, 1, 13-24.
41. Udo, E. E., AL-Bustan, M. A., Jacob, L. E., and Chugh, T. D. (1999). Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuawait City may be a potential cause of food poisoning. *Journal of Medical Microbiology*, 48, 819-823.
42. Otto, M. (2004). Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci. *Frontiers in Bioscience*, 9, 841-63.
43. Rosenstein, R., Götz, F. (2000). Staphylococcal lipases: biochemical and molecular characterization. *Biochimie*, 82(11), 1005-1014
44. Moon, J. L., Banbula, A., Oleksy, A., Mayo, J. A., and Travis, J. (2001). Isolation and characterization of a highly specific serine endopeptidase from an oral strain of *Staphylococcus epidermidis*. *Biological Chemistry*, 382(7), 1095-1099
45. Chamberlain, N. R., Brueggemann, S. A. (1997). Characterisation and expression of fatty acid modifying enzyme produced by *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Medical Microbiology*, 46(8), 693-697.
46. Von Eiff, C., Peters, G., and Heilmann, C. (2002). Pathogenesis of infections due to coagulase negative staphylococci. *The Lancet Infectious Diseases*, 2(11), 677-685.
47. Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, Í., and Penadés, J. R. (2001). Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, 183(9), 2888-2896.
48. Nilsson, M., Frykberg, N., Flock, J. I., Pei, L., Lindberg, M., and Guss, B. (1998). A fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and Immunity*, 66(6), 2666-2673.
49. McCrea, K. W., Hartford, O., Davis, S., Eidhin, D. N., Lina, G., Speziale, P., Foster, T. J., and Höök, M. (2000). The serine-aspartate repeat (Sdr) protein family in *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*, 146(Pt 7), 1535-1546.

50. Baldassarri, L., Donelli, G., Gelosia, A., Voglino, M. C., Simpson, A. W., and Christensen, G. D. (1996). Purification and characterization of the staphylococcal slime-associated antigen and its occurrence among *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *Infection and Immunity*, 64(8), 3410-3415.
51. Hussain, M., Herrmann, M., von Eiff, C., Perdreau-Remington, F., and Peters, G. (1997). A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of *Staphylococcus epidermidis* strains on surfaces. *Infection and Immunity*, 65(2), 519-24.
52. Gattermann, S., Meyer, H. G., and Wanner, G. (1992). *Staphylococcus saprophyticus* hemagglutinin is a 160-kilodalton surface polypeptide. *Infection and Immunity*, 60(10), 4127-4132.
53. Gattermann, S., Burkhard, K., Marre, R., and Wanner, G. (1992). Identification and characterization of a surface-associated protein (Ssp) of *Staphylococcus saprophyticus*. *Infection and Immunity*, 60(3), 1055-1060.
54. Patel, R., Piper, K. E., Rouse, M. S., Uhl, J. R., Cockerill, F. R., and Steckelberg, J. M. (2000). Frequency of isolation of *Staphylococcus lugdunensis* among staphylococcal isolates causing endocarditis: a 20-year experience. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(11), 4262–4263.
55. Farrag, N., Lee, P., Gunney, R., and Viagappan, G. M. (2001). *Staphylococcus lugdunensis* endocarditis. *Postgraduate Medical Journal*, 77(906), 259–260.
56. Keim, L. S., Torres-Filho, S. R., Silva, P. V., and Teixeira, L. A. (2011). Prevalence, aetiology and antibiotic resistance profiles of coagulase negative staphylococci isolated in a teaching hospital. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(1), 248-255.
57. Richards, M. J., Edwards, J. R., Culver, D. H., and Gaynes, R. P. (1999). Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National nosocomial infections surveillance system. *Critical Care Medicine*, 27(5), 887-892.
58. Wisplinghoff, H., Seifert, H., Wenzel, R. P., and Edmond, M. B. (2003). Current trends in the epidemiology of nosocomial bloodstream infections in patients with hematological malignancies and solid neoplasms in hospitals in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 36(9), 1103–1110.
59. Bouza, E., San Juan, R., Munoz, P., Pascau, J., Voss, A., and Desco, M. (2004). A European perspective on intravascular catheter-related infections: report on the microbiology workload, aetiology and antimicrobial susceptibility (ESGNI-005 Study). *Clinical Microbiology Infection*, 10(9), 838–842.
60. Akpaka, P. E., Christian, N., Bodonaik, N. C., and Smikle, M. F. (2006) Epidemiology of coagulase-negative Staphylococci isolated from clinical blood specimens at the University Hospital of the West Indies. *West Indian Medical Journal*, 55 (3), 170-173.
61. Gülmez, D., Gür, D. (2012). Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi'nde 2000-2011 Yılları Arasında Kan Kültürlerinden İzole Edilen Mikroorganizmalar: 12 Yıllık Değerlendirme. *Journal of Pediatric Infection*, 6, 79-83.

62. Özçetin, M., Saz, E. U., Karapınar, B., Özen, S., Aydemir, Ş., ve Vardar, F. (2009). Hastane enfeksiyonları; sıklığı ve risk faktörleri. *Journal of Pediatric Infection*, 3, 49-53.
63. Huebner, J., Goldmann, D. A. (1999). Coagulase-negative staphylococci: Role as Pathogens. *Annual Review of Medicine*, 50, 223-236.
64. Costerton, J. W., Stewart, P. S., and Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322.
65. Mack, D., Davies, A. P., Harris, L. G., Rohde, H., Horstkotte, M. A., and Knobloch, J. K. (2007). Microbial interactions in *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(2), 399-408.
66. Ziebuhr, W., Hennig, S., Eckart, M., Kränzler, H., Batzilla, C., and Kozitskaya, S. (2006). Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 28(1), 14-20.
67. Qin, Z., Yang, X., Yang, L., Jiang, J., Ou, Y., Molin, S., and Qu, D. (2007). Formation and properties of in vitro biofilms of *ica*-negative *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. *Journal of Medical Microbiology*, 56(1), 83-93.
68. Xu, L., Li, H., Vuong, C., Vadyvaloo, V., Wang, J., Yao, Y., Otto, M., and Gao, Q. (2006). Role of the *luxS* quorum-sensing system in biofilm formation and virulence of *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and Immunity*, 74(1), 488-496.
69. Kong, K. F., Vuong, C., and Otto, M. (2006). *Staphylococcus* quorum sensing in biofilm formation and infection. *International Journal of Medical Microbiology*, 296(2-3), 133-139.
70. Harraghy, N., Kerdudou, S., and Herrmann, M. (2007). Quorum-sensing systems in staphylococci as therapeutic targets. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387(2), 437-444.
71. Koksall, F., Yasar, H., and 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.
72. Frebourg, N. B., Lefebvre, S., Baert, S., and Lemeland, J. F. (2000). PCR-based assay for discrimination between invasive and contaminating *Staphylococcus epidermidis* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(2), 877-880.
73. Vandecasteele, S. J., Peetermans, W. E., Merckx, R., Rijnders, B. J., and Van Eldere, J. (2003). Reliability of the *ica*, *aap* and *atlE* genes in the discrimination between invasive, colonizing and contaminant *Staphylococcus epidermidis* isolates in the diagnosis of catheter-related infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 9(2), 114-119.

74. Rohde, H., Kalitzky, M., Kröger, N., Scherpe, S., Horstkotte, M. A., Knobloch, J. K., Zander, A. R., and Mack, D. (2004). Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12), 5614–5619.
75. Poutanen, S. M., Baron, E. J. (2001). *Staphylococcus lugdunensis*: a notably distinct coagulase negative staphylococcus. *Clinical Microbiology Newsletter*, 23(19), 147–150.
76. Koziol-Montewkan, M., Szczepanik, A., Baranowicz, I., Jozwiak, L., Ksiazek, A., and Kaczor, D. (2006). The investigation of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci nasal carriage among patients undergoing haemodialysis. *Microbiological Research*, 161(4), 281–287.
77. Mermel, L. A., Allon, M., Bouza, E., Craven, D. E., Flynn, P., O’Grady, N. P., Raad, I. I., Rijnders, B. J., Sherertz, R. J., and Warren, D. K. (2009). Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 49(1), 1–45.
78. Tokars, J. I. (2004). Predictive value of blood cultures positive for coagulase-negative staphylococci: implications for patient care and health care quality assurance. *Clinical Infectious Diseases*, 39(3), 333–341.
79. Piette, A., Verschraegen, G. (2009). Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Veterinary Microbiology*, 134(1-2), 45–54.
80. Saleem, B. R., Meerwaldt, R., Tielliu, I. F., Verhoeven, E. L., van den Dungen, J. J., and Zeebregts, C. J. (2010). Conservative treatment of vascular prosthetic graft infection is associated with high mortality. *The American Journal of surgery*, 200(1), 47–52.
81. PMcGirt, M. J., Zaas, A., Fuchs, H. E., George, T. M, Kaye, K., and Sexton, D. J. (2003). Risk factors for pediatric ventriculoperitoneal shunt infection and predictors of infectious pathogens. *Clinical Infectious Diseases*, 36(7), 858–62.
82. Schreffler, R. T., Schreffler, A. J., and Wittler, R. R. (2002). Treatment of cerebrospinal fluid shunt infections: a decision analysis. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 21(7), 632–636.
83. Chu, V. H., Woods, C. W., Miro, J. M., Hoen, B., Cabell, C. H., Pappas, P. A., Federspiel, J., Athan, E., Stryjewski, M. E., Nacinovich, F., Marco, F., Levine, D. P., Elliott, T. S., Fortes, C. Q., Tornos, P., Gordon, D. L., Utili, R., Delahaye, F., Corey, G. R., Fowler, V. G. Jr. (2008). Emergence of coagulase-negative staphylococci as a cause of native valve endocarditis. *Clinical Infectious Diseases*, 46(2), 232–242.
84. Chu, V. H., Cabell, C. H., Abrutyn, E., Corey, G. R., Hoen, B., Miro, J.M., Olaison, L., Stryjewski, M. E., Pappas, P., Anstrom, K. J., Eykyn, S., Habib, G., Benito, N., and Fowler, V. G. Jr. (2004). Native valve endocarditis due to coagulase-negative staphylococci: report of 99 episodes from the International Collaboration on Endocarditis Merged Database. *Clinical Infectious Diseases*, 39(10), 1527–1530.

85. Chu, V. H., Miro, J. M., Hoen, B., Cabell, C. H., Pappas, P. A., Jones, P., Stryjewski, M. E., Anguera, I., Braun, S., Muñoz, P., Commerford, P., Tornos, P., Francis, J., Oyonarte, M., Selton-Suty, C., Morris, A. J., Habib, G., Almirante, B., Sexton, D. J., Corey, G. R., Fowler, V. G. Jr. (2009). Coagulase-negative staphylococcal prosthetic valve endocarditis— a contemporary update based on the International Collaboration on Endocarditis: prospective cohort study. *Heart (British Cardiac Society)*, 95(7), 570–576.
86. Gandelman, G., Frishman, W. H., Wiese, C., Green-Gastwirth, V., Hong, S., Aronow, W. S., and Horowitz, H. W. (2007). Intravascular device infections: epidemiology, diagnosis, and management. *Cardiology in Review*, 15(1), 13–23.
87. Rundström, H., Kennergren, C., Andersson, R., Alestig, K., and Hogevis, H. (2004). Pacemaker endocarditis during 18 years in Göteborg. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 36(9), 674–679.
88. Hidron, A. I., Edwards, J. R., Patel, J., Horan, T. C., Sievert, D. M., Pollock, D. A., and Fridkin, S. K. (2008). 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.
89. Cantlon, C. A., Stemper, M. E., Schwan, W. R., Hoffman, M. A., and Qutaishat, S. S. (2006). Significant pathogens isolated from surgical site infections at a community hospital in the Midwest. *American Journal of Infection Control*, 34(8), 526-529.
90. Lalwani, G. A., Flynn, H. W. Jr., Scott, I. U., Quinn, C. M., Berrocal, A. M., Davis, J. L., Murray, T. G., Smiddy, W. E., and Miller, D. (2008). Acute-onset endophthalmitis after clear corneal cataract surgery (1996–2005). Clinical features, causative organisms, and visual acuity outcomes. *Ophthalmology*, 115(3), 473–476.
91. Karacal, H., Kymes, S. M., and Apte, R. S. (2007). Retrospective analysis of etiopathogenesis of all cases of endophthalmitis at a large tertiary referral center. *International Ophthalmology*, 27(4), 251-259.
92. Abu el-Asrar, A. M., al-Amro, S. A., al-Mosallam, A. A., and al-Obeidan, S. (1999). Post traumatic endophthalmitis: causative organisms and visual outcome. *European Journal of Ophthalmology*, 9(1), 21-31.
93. Raz, R., Colodner, R., and Kunin, C. M. (2005). Who Are You—*Staphylococcus saprophyticus*? *Clinical Infectious Diseases*, 40(6), 896-898.
94. Widerström, M., Monsen, T., Karlsson, C., and Wiström, J. (2006). Molecular epidemiology of meticillin-resistant coagulase-negative staphylococci in a Swedish county hospital: evidence of intra- and interhospital clonal spread. *Journal of Hospital Infection*, 64(2), 177-183.
95. Nys, S., van Merode, T., Bartelds, A. I., and Stobberingh, E. E. (2006). Urinary tract infections in general practice patients: diagnostic tests versus bacteriological culture. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(5), 955-958.

96. Jones, C. (2008). Infections in the critically ill neonate. In S. Nadel (Eds.), *Infectious Diseases in the Pediatric Intensive Care Unit*. London: Springer, pp. 69-70.
97. Pavoni, G. L., Giannella, M., Falcone, M., Scorzoloni, L., Liberatore, M., Carlesimo, B., Serra, P., and Venditti, M. (2004). Conservative medical therapy of prosthetic joint infections: retrospective analysis of an 8-year experience. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(9), 831-837.
98. Archer, G. L., Climo, M. W. (2005). *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative *Staphylococci*. In G. L. Mandell, J. E. Bennett, R. Dolin (Eds.), *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Sixth edition. Philadelphia, Pennsylvania: Churchill Livingstone, pp. 2352-2360.
99. Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C., Winn, W. C. Jr. (Eds.). (2005). *Konemans Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* (Sixth edition). Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 649-661.
100. Kloos, W. E., George, C. G., Olgiate, J. S., Pelt, L. V., McKinnon, M. L., Zimmer, B. L., Muller, E., Weinstein, M. P., and Mirrett, S. (1998). *Staphylococcus hominis* subsp. *novobiosepticus* subsp. nov., a novel trehalose- and N-acetyl-D-glucosamine-negative, novobiocin- and multiple-antibiotic-resistant subspecies isolated from human blood cultures. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 799-812.
101. Lambert, L. H., Cox, T., Mitchell, K., Rossello-Mora, R. A., Del Cueto, C., Dodge, D. E., Orkand, P., and Cano, R. J. (1998). *Staphylococcus succinus* sp. nov., isolated from Dominican amber. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 511-518.
102. Janda, W. M., Ristow, K., and Novak, D. (1994). Evaluation of RapiDEC Staph for identification of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Staphylococcus saprophyticus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(9), 2056-2059.
103. Kellogg, J. A., Hanna, M. D., Nelsen, S. J., Sprenkle, L. S., Thomas, M. L., and Young, K. S. (1996). Predictive values of species identifications from the Vitek Gram-Positive Identification Card using clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *American Journal of Clinical Pathology*, 106(3), 374-377.
104. Kloos, W. E., George, C. G. (1991). Identification of *Staphylococcus* species and subspecies with the MicroScan Pos ID and Rapid Pos ID panel systems. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(4), 738-744.
105. Zadoks, R. N., Watts, J. L. (2009). Species identification of coagulase-negative staphylococci: genotyping is superior to phenotyping. *Veterinary Microbiology*, 134(1-2), 20-28.
106. Shah, M. M., Iihara, H., Noda, M., Song, S. X., Nhung, P. H., Ohkusu, K., Kawamura, Y., and Ezaki, T. (2007). *dnaJ* gene sequence-based assay for species identification and phylogenetic grouping in the genus *Staphylococcus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(Pt1), 25-30.

107. Carretto, E., Barbarini, D., Couto, I., De Vitis, D., Marone, P., Verhoef, J., De Lencastre, H., and Brisse, S. (2005). Identification of coagulase-negative staphylococci other than *Staphylococcus epidermidis* by automated ribotyping. *Clinical Microbiology and Infection*, 11(3), 177-184.
108. Sivadon, V., Rottman, M., Chaverot, S., Quincampoix, J. C., Avettand, V., de Mazancourt, P., Bernard, L., Trieu-Cuot, P., Feron, J. M., Lortat-Jacob, A., Piriou, P., Judet, T., and Gaillard, J. L. (2005). Use of genotypic identification by *sod A* sequencing in a prospective study to examine the distribution of coagulase negative *Staphylococcus* species among strains recovered during septic orthopedic surgery and evaluate their significance. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(6), 2952-2954.
109. Heikens, E., Fleer, A., Paauw, A., Florijn, A., and Fluit, A. C. (2005). Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(5), 2286-2290.
110. Loonen, A. J., Jansz, A. R., Bergland, J. N., Valkenburg, M., Wolffs, P. F., van den Brule, A. J. (2012). Comparative Study Using Phenotypic, Genotypic, and Proteomics Methods for Identification of Coagulase-Negative Staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(4), 1437-1439.
111. Rice, L. B., Sahm, D., Bonomo, R. A. (2003). Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. In B. E. Murray PR, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller, R. H. Tenover (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology*. Eighth edition. Washington, DC: ASM Press, pp. 1074-1101.
112. Livermore, D. M. (2000). Antibiotic resistance in staphylococci. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 16(Suppl 1), 3-10.
113. Krediet, T. G., Mascini, E. M., van Rooij, E., Vlooswijk, J., Paauw, A., Gerards, L. J., and Fleer, A. (2004). Molecular epidemiology of coagulase-negative staphylococci causing sepsis in a neonatal intensive care unit over an 11-year period. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(3), 992-995.
114. Venkatesh, M. P., Placencia, F., and Weisman, L. E. (2006). Coagulase-negative staphylococcal infections in the neonate and child: an update. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 17(3), 120-127.
115. Srinivasan, A., Dick, J. D., and Perl, T. M. (2002). Vancomycin resistance in staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(3), 430-438.
116. Center, K. J., Reboli, A. C., Hubler, R., Rodgers, G. L., and Long, S. S. (2003). Decreased vancomycin susceptibility of coagulase-negative staphylococci in a neonatal intensive care unit: evidence of spread of *Staphylococcus warneri*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(10), 4660-4665.
117. Klingenberg, C., Sundsfjord, A., Ronnestad, A., Mikalsen, J., Gaustad, P., and Flaegstad, T. (2004). Phenotypic and genotypic aminoglycoside resistance in blood culture isolates of coagulase-negative staphylococci from a single neonatal intensive care unit, 1989-2000. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(5), 889-896.

118. Rahman, M. (1998). Alternatives to vancomycin in treating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41(3), 325-328.
119. Pechere, J. C. (1999). Current and future management of infections due to methicillin-resistant staphylococci infections: the role of quinupristin/dalfopristin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 44(Suppl A), 11-18.
120. John, M. A., Pletch, C., and Hussain, Z. (2002). In vitro activity of quinupristin/dalfopristin, linezolid, telithromycin and comparator antimicrobial agents against 13 species of coagulase-negative staphylococci. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(6), 933-938.
121. Russell, A. D. (2002). Mechanisms of antimicrobial action of antiseptics and disinfectants: an increasingly important area of investigation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(4), 597-599.
122. Rutala, A. W., Weber, D. J. (2005). Disinfection, Sterilization, and Control of Hospital Waste. In G. L. Mandell, J. E. Bennett, R. Dolin (Eds.), *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Sixth edition. Philadelphia: Elsevier, pp. 3331-3347.
123. Abbasoğlu, U. (2005, 20-24 Nisan). Dezenfektan Direncini Belirleyen Testlere Global Bir Bakış. Hangi Testler Hangi Sıra ile Yapılmalıdır? En Ucuz ve Kesin Sonuç Nasıl Elde Edilir? 4. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresinde sunuldu, Samsun.
124. Özyurt M. (2000). Dezenfeksiyon ve Sterilizasyon Yöntemleri. *Klinik Dergisi*, 13, 41-48.
125. Dukan, S., Belkin, S., and Touati, D. (1999). Reactive oxygen species are partially involved in the bacteriocidal action of hypochlorous acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 367(2), 311-316.
126. Chapman, J. S. (2003). Biocide resistance mechanisms. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51(2), 133-138.
127. Dinç, G. (2012). Kavite dezenfektanlarının antibakteriyel özellikleri, bağlanma dayanımı ve mikrosızıntı üzerine etkileri (derleme). *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 6, 66-75.
128. Kampf, G., Kramer, A. (2004). Epidemiologic Background of Hand Hygiene and Evaluation of the Most Important Agents for Scrubs and Rubs. *Clinical Microbiology Reviews*, 4, 863-893.
129. Karami, N., Alsterholm, M., and Faergemann, J. (2009). In vitro Activity of Chlorhexidine and Pentane-1,5-diol and their Combination on *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* and *Propionibacterium acnes*. *Acta Dermato Venereologica*, 89(5), 514-515.
130. Marple, B., Roland, P., and Benninger, M. (2004). Safety review of benzalkonium chloride used as a preservative in intranasal solutions: an overview of conflicting data and opinions. *Otolaryngology Head and Neck Surgery*, 130(1), 131-141.

131. Osman, M., EL Hendawy, H. H., Hassan, A., Abdel-All, S. M., and Mahmoud, D. E. (2012). Efficacy Of Combination Of Glutaraldehyde And Benzalkonium Chloride Against Multidrug-Resistant Gram Negative Bacteria Isolated From Hospitals. *Journal of Applied Sciences Research*, 8(6), 3019-3031.
132. Fazlara, A., Ekhtelat, M. (2012). The Disinfectant Effects of Benzalkonium Chloride on Some Important Foodborne Pathogens. *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 12(1), 23-29.
133. To, M. S., Favrin, S., Romanova, N., and Griffiths, M. W. (2002). Postadaptational resistance to benzalkonium chloride and subsequent physicochemical modifications of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental, Microbiology*, 68(11), 5264-5528.
134. Russell, A. D. (2002). Antibiotic and biocide resistance in bacteria: comments and conclusions. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 92(s1), 171S–173S.
135. Gilbert, P., Moore, L. E. (2005). Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *Journal of Applied Microbiology*, 99(4), 703-715.
136. Muller, G., Kramer, A. (2008). Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(6), 1281-1287.
137. McDonnell, G., Russell, A. D. (1999). Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1), 147–179.
138. Russell, A. D. (2004). Bacterial adaptation and resistance to antiseptics, disinfectants and preservatives is not a new phenomenon. *Journal of Hospital Infection*, 57(2), 97–104.
139. Russell, A. D. (2003). Biocide use and antibiotic resistance: the relevance of laboratory findings to clinical and environmental situations. *Lancet Infectious Diseases*, 3(12), 794–803.
140. Maillard, J. Y. (2005). Antimicrobial biocides in the healthcare environment: efficacy, usage, policies, and perceived problems. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 1(4), 307– 320.
141. Russell, A. D. (2000). Do Biocides Select for Antibiotic Resistance? *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52(2), 227-233.
142. Poole, K. (2002). Mechanisms of bacterial biocide and antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 92(1), 55S–64S.
143. Özdemir, D. (2002). Dezenfektanlara Direnç. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 4(3), 39-44.
144. Çağlar, K. (2005, 20-24 Nisan). Dezenfektanlara Direnç Gelişim Mekanizmaları? Dezenfeksiyon İşlemini Ne Kadar Tehdit Etmektedir? 4. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresinde sunuldu, Samsun.

145. Russell, A. D. (2003). Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(5), 750–763.
146. Sato, K. K., Wachino, J. I., Kondo, T., Ito, H., and Arakawa, Y. (2010). Correlation between reduced susceptibility to disinfectants and multidrug resistance among clinical isolates of *Acinetobacter* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(9), 1975–1983.
147. Paulsen, I. T., Brown, M. H., Skurray, R. A. (1996). Proton-Dependent Multidrug Efflux Systems. *Microbiological reviews*, 60(4), 575–608.
148. Poole, K. (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(1), 20–51.
149. Chapman, J. S. (2003). Disinfectant Resistance Mechanisms, Cross-Resistance and Co-Resistance. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 51(4), 271–276.
150. Öztürk, R. (2004). Antiseptik ve Dezenfektan Maddelere Karşı Direnç Sorunu., M. Günaydın, Ş. Esen, A. Saniç, H. Leblebicioğlu. (Editörler). *Sterilizasyon Dezenfeksiyon ve Hastane İnfeksiyonları*. Samsun. Simad Yayınları, s. 41-60.
151. Vila, J., Martí, S., and Sánchez-Céspedes, J. (2007). Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(6), 1210–1215.
152. Rajamohan, G., Srinivasan, V. B., and Gebreyes, W. A. (2010). Novel role of *Acinetobacter baumannii* RND efflux transporters in mediating decreased susceptibility to biocides. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(2), 228–232.
153. Işık, Y. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinde kinolon direncinin moleküler olarak saptanması, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 61-62.
154. Irizarry, L., Merlin, T., Rupp, J., and Griffith, J. (1996). Reduced susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to cetylpyridinium chloride and chlorhexidine. *Chemotherapy*, 42(4), 248–252.
155. Littlejohn, T. G., Paulsen, I. T., Gillespie, M. T., Tennent, J. M., Midgley, M., Jones, I.G., Purewal, A. S., Skurray, R. A. (1992). Substrate specificity and energetics of antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 95(2-3), 259–265.
156. Zmantar, T., Kouidhi, B., Miladi, H., and Bakhrouf, A. (2011). Detection of macrolide and disinfectant resistance genes in clinical *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. *BioMed Central Research Notes*, 4, 453.
157. Nakipoğlu, Y., İğnak, S., Gürler, N., ve Gürler, B. (2012). Klinik *Staphylococcus aureus* suşlarında antiseptik direnç genlerinin (*qacA/B* ve *smr*) ve antibiyotik maddelere direnç prevalansının araştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 46(2), 180–189.

158. Russell, A. D., Tattawasart, U., Maillard, J. Y., and Furr, J. R. (1998, August). Possible Link between Bacterial Resistance and Use of Antibiotics and Biocides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(8), 2151.
159. Akimitsu, N., Hamamoto, H., Inoue, R., Shoji, M., Akamine, A., Takemori, K., Hamasaki, N., and Sekimizu, K. (1999). Increase in resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to b-Lactams caused by mutations conferring resistance to benzalkonium chloride, a disinfectant widely used in hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(12), 3042–3043.
160. McBain, A. J., Ledder, R. G., Moore, L. E., Catrenich, C. E., and Gilbert P. (2004). Effects of quaternary-ammonium-based formulations on bacterial community dynamics and antimicrobial susceptibility. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6), 3449–3456.
161. Noguchi, N., Suwa, J., Narui, K., Sasatsu, M., Ito, T., Hiramatsu, K., and Song, J. H. (2005). Susceptibilities to antiseptic agents and distribution of antiseptic-resistance genes *qacA/B* and *smr* of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Asia during 1998 and 1999. *Journal of Medical Microbiology*, 54(Pt 6), 557–565.
162. Mayer, S., Boos, M., Beyer, A., Fluit, A. C., and Schmitz, F. J. (2001). Distribution of the antiseptic resistance genes *qacA*, *qacB* and *qacC* in 497 methicillin-resistant and -susceptible European isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(6), 896-897.
163. Noguchi, N., Nakaminami, H., Nishijima, S., Kurokawa, I., So, H., and Sasatsu, M. (2006). Antimicrobial agent of susceptibilities and antiseptic resistance gene distribution among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients with Impetigo and Staphylococcal Scalded Skin Syndrome. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(6), 2119-2125.
164. Block, C., Furman, M. (2002). Association between intensity of chlorhexidine use and micro-organisms of reduced susceptibility in a hospital environment. *Journal of Hospital Infection*, 51(3), 201-206.
165. Cookson, B. D., Bolton, M. C., and Platt, J. H. (1991). Chlorhexidine resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* or just an elevated MIC? An in vitro and in vivo assessment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(10), 1997-2002.
166. Suller, M. T. E., Russell, A. D. (1999). Antibiotic and biocide resistance in methicillin-resistant *staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococcus. *Journal of Hospital Infection*, 43(4), 281-291.
167. Zhang, M., O'Donoghue, M. M., Ito, T., Hiramatsu, K., and Boost, M. V. (2011). Prevalence of antiseptic-resistance genes in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci colonising nurses and the general population in Hong Kong. *Journal of Hospital Infection*, 78(2), 113-117.
168. Miyazaki, N. H., Abreu, A. O., Marin, V. A., Rezende, C. A., Moraes, M. T., and Villas Boas, M. H. (2007). The presence of *qacA/B* gene in Brazilian methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(4), 539-540.

169. Sheng, W. H., Wang, J. T., Lauderdale, T. L., Weng, C. M., Chen, D., and Chang, S. C. (2009). Epidemiology and susceptibilities of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan: emphasis on chlorhexidine susceptibility. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 63(3), 309–313.
170. Ho, C. M., Li, C. Y., Ho, M. W., Lin, C. Y., Liu, S. H., and Lu, J. J. (2012). High rate of *qacA*- and *qacB*-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from chlorhexidine-impregnated catheter-related bloodstream infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(11), 5693-5697.
171. Longtin, J., Seah, C., Siebert, K., McGeer, A., Simor, A., Longtin, Y., Low, D. E., and Melano, R. G. (2011). Distribution of antiseptic resistance genes *qacA*, *qacB*, and *smr* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated in Toronto, Canada, from 2005 to 2009. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(6), 2999-3001.
172. Aykan, B. (2006). *Hastane enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen metisiline dirençli Staphylococcus aureus suşlarında qacA/B dezenfektan direnç genlerinin araştırılması*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 48-51.
173. Opacic, D., Lepsanovic, Z., and Milosevic, G. S. (2013). In vitro activity of chlorhexidine gluconate against methicillin-resistant and sensitive *Staphylococcus aureus* strains. *Archives of Biological Science*, 65 (3), 949-953.
174. Oie, S., Huang, Y., Kamiya, A., Konishi, H., and Nakazawa, T. (1996). Efficacy of disinfectants against biofilm cells of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbios*, 85(345), 223-230.
175. İrikli, S., Otkun, M. T. (2007). Bazı antiseptik ve dezenfektanların in vitro antimikrobik aktivitelerinin araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi (Turkish Journal of Infection)*, 21(1), 7-13.
176. Erbay, A., Ergönül, Ö., Esener, H., Çolpan, A., ve Dokuzoğuz, B. (2002). Hastane kökenli metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter* spp. ve *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının çeşitli dezenfektanlara karşı direnci. *Hastane Enfeksiyonları Dergisi*, 6(4), 191-194.

EKLER

EK-1. Etik Kurul toplantı kararları sayfası



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı

Sayı: 25901600 - 2183
Konu: Toplantı Kararları

02/04/2013

Sayın *Prof. Dr. Kayhan Göçler*
Proje Yürütücüsü

Fakültemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun **13 Mart 2013** tarihinde yapmış olduğu toplantı kararları ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi rica ederim.

[Signature]
Doç. Dr. İ. Onur ÖZEN
Dekan Yardımcısı

EK-2. Gazi Üniversitesi (girişimsel olmayan) klinik araştırmalar Etik Kurulu değerlendirme formu



GAZİ ÜNİVERSİTESİ (GİRİŞİMSEL OLMAYAN) KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
DEĞERLENDİRME FORMU

DEĞERLENDİRME KURULUNUN ADI	Gazi Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
AÇIK ADRES	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası 06500 Beşevler/Ankara
TELEFON	0312 202 69 58
FAKS	0312 202 46 73
E-POSTA	tipetikkurul@gazi.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Koagülaz negatif Stafilkoklarda dezenfektan direnç genlerinin sıklığının tespiti ve fenotipik direnç ile ilişkisinin araştırılması		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Kayhan ÇAĞLAR		
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ ☐	AKADEMİK AMAÇLI ☐	
		DİĞER ☐	Doktora Tezi ☐	
	İLAC DIŞI ARAŞTIRMA	☒	☐ İLAC DIŞI GİRİŞİMSEL	
			☒ İLAC DIŞI GİRİŞİMSEL OLMAYAN 5-Hücre ve doku kültürleriyle yapılacak araştırmalar	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon No	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİL. GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒		
	SİGORTA	☐		

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 85	Toplantı tarihi: 15.03.2013
	Üniversitemiz Tıp Fakültesinde Prof.Dr.Kayhan Çağlar'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıdaki künyede kayıtlı başvuru bilgileri verilen, Doktora Tezi olan klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmannın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve araştırmannın gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına G.Ü.T.F. Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesinin son versiyonu, İyi Klinik Uygulamaları (Uluslararası ICH-GCP) kılavuzu ve bununla ilgili 2001/20/EC ve 2005/28/EC sayılı Avrupa Birliği direktifleri, Biyoloji ve Tıbbın uygulanması bakımından İnsan Hakları ve İnsan haysiyetinin korunması sözleşmesi ve İnsan Hakları ve Biyotip Sözleşmesinin onaylanmasının uygun bulunduğu dair kanun (9.12.2003 tarihli 25311 sayılı Resmi Gazete), 2547 sayılı Yükseköğretim Kanunu (06.11.1981 tarihli 17506 sayılı Resmi Gazete), Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
	ETİK KURUL BAŞKANI ÜNVANI/ADI/SOYADI: Prof.Dr.Canan ULUOĞLU					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Katılım **	İmza
Prof.Dr.Canan ULUOĞLU BAŞKAN	Tıbbi Farmakoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D	K	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç.Dr.Arzu BAKIRTAŞ BAŞKAN YRD.	Çocuk Sağ.ve Hast. Çocuk Allerji	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D	K	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	Katılmadı

EK-2. (devam) Gazi Üniversitesi (girişimsel olmayan) klinik araştırmalar Etik Kurulu değerlendirme formu

Prof.Dr.Gonca AKBULUT RAPORTÖR	Fizyoloji	G.Ü.T.F Fizyoloji A.D.	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Fusun BOZKIRLI ÜYE	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	G.Ü.T.F Anest.ve Rea. A.D	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Emin TÜRKÖZ ÜYE	Restoratif Diş Tedavisi ve Endodonti	G.Ü.D.F Restoratif Diş Ted. ve Endodonti A.D	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Seyhan ERSAN ÜYE	Farmasötik Kimya	G.Ü.E.F (Ecz.Mes.Bil.) Farmasötik Kimya A.D.	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Sefer AYCAN ÜYE	Halk Sağlığı	G.Ü.T.F Halk Sağlığı A.D	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Mustafa KAVUTÇU ÜYE	Tıbbi Biyokimya	G.Ü.T.F Tıbbi Biyokimya A.D	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Öznur L.BOYUNAĞA ÜYE	Radyoloji	G.Ü.T.F Radyoloji A.D	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Galip GÜZ ÜYE	İç Hastalıkları Erişkin Nefroloji	G.Ü.T.F İç Hastalıkları A.D.	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Aylar POYRAZ ÜYE	Tıbbi Patoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Patoloji A.D	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Metin YILMAZ ÜYE	Kulak-Burun-Boğaz Hast.	Kulak-Burun-Boğaz Hast. A.D	E	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Katılmadı
Prof.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU ÜYE	Tıp Etiği ve Tıp Tarihi	G.Ü.T.F Tıp Etiği ve Tıp Tarihi A.D	K	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Katılmadı
Doç.Dr.Birol DEMİREL ÜYE	Adli Tıp	G.Ü.T.F Adli Tıp A.D.	E	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Öğr.Gör. Adem GELİR ÜYE	Hukukçu Üye	Rektörlük Hukuk Müşavirliği	E	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	Katılmadı
Emine ŞEKER ÜYE	Sivil Temsilci	Sivil Temsilci	K	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : SHAHAB, Sarmad Wahab Shahab
Uyruğu : Irak
Doğum tarihi ve yeri : 22/09/1981 Süleymaniye
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0544 395 86 88
e-posta : sermet_shehap@yahoo.com



Eğitim Derecesi

Okul/Program

Mezuniyet yılı

Doktora	Gazi Üniversitesi /Tıbbi Mikrobiyoloji ABD	Devam Ediyor
Lisans	Bağdat Üniversitesi/Veterinerlik Bölümü	2004
Lise	Hanekin Erkek Lisesi	1999

İş Deneyimi, Yılı

Çalıştığı Yer

Görev

2005	Diyala Veterinerlik Hastanesi	Veteriner Hekim
------	-------------------------------	-----------------

Yabancı Dili

İngilizce

Hobiler

Futbol, Masa tenisi, Yüzme, Balık tutma, Kitap okuma



GAZİ GELECEKTİR...



Gazî Eğitim Fakültesi

