

T.C.  
SAĞLIK BAKANLIĞI  
ŞİŞLİ HAMİDİYE EĞİTİM VE  
ARAŞTIRMA HASTANESİ

( UZMANLIK TEZİ )

***Staphylococcus aureus* İZOLATLARINDA METİSİLİN DİRENCİNİN  
BELİRLENMESİNDE SEFOKSİTİN DİSK DİFÜZYON, PHOENİX  
OTOMATİZE SİSTEM VE mecA/mecC PZR YÖNTEMLERİNİN  
KARŞILAŞTIRILMASI VE PVL VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

DR. NESLİHAN ARICI

DANIŞMAN  
DOÇ. DR. BANU BAYRAKTAR

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ  
LABORATUVARI

İSTANBUL-2015

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

NESLİHAN ARICI

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda ve uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Banu Bayraktar'a yardımları ve desteği için teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimimde emeği geçen Sayın Doç. Dr. Elif Aktaş ve Uzman Dr. M.Emin Bulut'a ve tez çalışmama standart suş temininde yardımcı olarak katkıda bulunan Sayın Yrd. Doç.Dr. Onur Karatuna'ya teşekkür ederim.

Eğitimim süresince uyum içerisinde çalıştığım ve yardımlarını gördüğüm değerli asistan arkadaşlarıma ve emeği geçen tüm laboratuvar çalışanlarına teşekkür ederim.

Her daim desteğini esirgemeyen ve benimle bu eğitim sürecini tamamlamanın mutluluğunu paylaşan eşim Mustakim Arıcı ve biricik kızım Fatma Beyza'ya; beni yetiştiren ve fedakârlıklarını hiçbir zaman esirgemeyen anne ve babama teşekkürü bir borç bilirim.

# İÇİNDEKİLER

|                                                         |      |
|---------------------------------------------------------|------|
| BEYAN .....                                             | II   |
| TEŞEKKÜR.....                                           | III  |
| İÇİNDEKİLER.....                                        | IV   |
| TABLolar LİSTESİ.....                                   | V    |
| ŞEKİLLER LİSTESİ.....                                   | VI   |
| SEMBOLLER/KISALTMALAR LİSTESİ.....                      | VII  |
| ÖZET.....                                               | VIII |
| ABSTRACT.....                                           | IX   |
| 1.GİRİŞ VE AMAÇ. ....                                   | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                  | 3    |
| 2.1. TARİHÇE.....                                       | 3    |
| 2.2. MORFOLOJİ, BOYANMA VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLER..... | 4    |
| 2.3. HÜCRE YAPISI.....                                  | 5    |
| 2.3.1. Hücre duvarı.....                                | 5    |
| 2.3.2. Kapsüler polisakkaritler.....                    | 6    |
| 2.3.3. Koagülaz ve diğer yüzey proteinleri.....         | 6    |
| 2.3.4. Stoplazmik membran.....                          | 6    |
| 2.4. PATOGENEZ VE İMMÜNİTE.....                         | 7    |
| 2.4.1. <i>S.aureus</i> toksinleri.....                  | 7    |
| 2.4.2. <i>S.aureus</i> enzimleri.....                   | 9    |
| 2.5. <i>S.AUREUS</i> ' UN İDENTİFİKASYONU.....          | 11   |
| 2.6. EPİDEMİYOLOJİ.....                                 | 14   |
| 2.6.1. <i>S.aureus</i> 'un yaptığı enfeksiyonlar.....   | 15   |
| 2.7. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK.....                        | 18   |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM.....                                 | 24   |
| 4.BULGULAR.....                                         | 31   |
| 5.TARTIŞMA.....                                         | 37   |
| 6. KAYNAKLAR.....                                       | 54   |

## TABLÖLAR LİSTESİ

**Tablo 1:** Multipleks PZR’da Kullanılan Primerler

**Tablo 2:** Master Mix hazırlama protokolü

**Tablo 3:** Kùltürlerin örnek türleri

**Tablo 4:** MRSA ve MSSA izolatlarının servislere göre sayı ve yüzdeleri

**Tablo 5:** Sefoksitin Disk Diffüzyon (SDD) ve Phoenix ile belirlenen MRSA-MSSA sayı ve yüzdeleri

**Tablo 6:** SDD ve Phoenix için Duyarlılık, Özgüllük, PKD ve NKD değeri

**Tablo 7:** MRSA ve MSSA izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları

## ŞEKİLLER LİSTESİ

**Şekil 1:** SCCmec türleri I-IV

**Şekil 2:** spa, mecA, mecC ve PVL PZR ürünlerini gösteren agaroz jel elektroforez fotoğrafı

**Şekil 3.** *S. aureus* üreyen kültürlerin geldiği servislere göre dağılımı

**Şekil 4.** MRSA ve MSSA gruplarında antibiyotik direnç oranları



## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

BORSA: Borderline-resistant *S. aureus*

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

DNAse: Deoksiribonükleaz

HK-MRSA: Hastane Kaynaklı Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*

KNS: Koagülaz negatif stafilokok

MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon

MLS: Makrolid-Linkozamid-Streptogramin direnci

MODSA: Moderately resistant *Staphylococcus aureus*

MSSA: Metisiline duyarlı *S. aureus*

MRSA: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*

OAT : Oksasilin Agar Tarama

PBP : Penisilin bağlayan protein

PVL: Panton-Valentin Lökosidin

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

*S. aureus*: *Staphylococcus aureus*

SCCmec: Stafilokokal kaset kromozomu

TBE: Tris, Borik asit, EDTA

TK-MRSA: Toplum Kaynaklı Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*

TSST-1: Toksik Şok Sendrom Toksin-1

VISA: Vankomisine azalmış duyarlılık gösteren *S. aureus*

VRSA: Vankomisine dirençli *S. aureus*

## ÖZET

Arıcı N. (2015). *S. aureus* İzolatlarında Metisilin Direncinin Belirlenmesinde Sefoksitin Disk Difüzyon, Phoenix Otomatize Sistem ve mecA/mecC PCR Yöntemlerinin Karşılaştırılması ve PVL Gen Varlığının Araştırılması. Sağlık Bakanlığı Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı. Tıpta Uzmanlık Tezi. İstanbul.

Bu çalışmada, *S. aureus* suşlarında mecA ve mecC genlerinin belirlenmesine dayalı PZR yöntemi altın standart kabul edilerek, sefoksitin disk difüzyon ve Phoenix (BD, ABD) otomatize sisteminin duyarlılık ve özgüllüklerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca tüm suşlarda mecC ve PVL varlığı araştırılmıştır. Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş 179 *S. aureus* suşu çalışmaya dahil edildi. İzolatların tamamının *S. aureus* oldukları koloni morfolojisi, Gram boyama, katalaz, koagülaz testleri, Phoenix otomatize sistem kitleri ve multipleks PZR ile spa geninin gösterilmesi ile doğrulandı. Bütün suşlara sefoksitin disk difüzyon, otomatize sistem ile sefoksitin MİK belirlenmesi ve multipleks PZR uygulandı. Metisilin direncinin belirlenmesinde mecA ve mecC PZR referans metot alınarak sefoksitin disk difüzyon ve otomatize sistemin duyarlılık ve özgüllüğü değerlendirildi. Aynı zamanda bu izolatlarda PVL toksin geni varlığı araştırıldı.

Çalışmaya alınan suşların 91'i mecA geni saptanarak MRSA olarak tanımlandı. MecC geni içeren hiçbir izolat saptanmadı. Sefoksitin disk difüzyon yöntemi ve otomatize sistemin MRSA tespitindeki duyarlılıkları referans metoda göre sırasıyla % 100, % 100; özgüllükleri % 100, % 93.2 olarak tespit edildi. MRSA'lar içinde PVL pozitiflik oranı % 6.5, MSSA'lar içinde ise % 7.4 olarak bulundu. Çalışmamızdaki verilere dayanarak *S. aureus*'larda metisilinin direncinin belirlenmesinde sefoksitin disk difüzyon yönteminin güvenilir bir metot olduğu, aynı zamanda maliyet etkinlik göz önüne alındığında rutin laboratuvar kullanımı için daha uygun olduğu düşünülmüştür. Phoenix otomatize sistemi ile MRSA bulunan izolatlarda ise yanlış pozitif sonuçtan kaçınmak için sefoksitin disk difüzyon yöntemi de beraberinde kullanılmalıdır. İmkân olduğu koşulda üremenin olduğu gün PZR ile mecA ve mecC genin varlığının gösterilmesi metisilin direncinin erken saptanması açısından önerilir.

Anahtar Kelimeler: MRSA, Sefoksitin disk difüzyon, Phoenix, mecA, mecC, PVL

## ABSTRACT

Arıcı N. (2015) . Comparison of cefoxitin disc diffusion, Phoenix automated system and mecA/mecC PCR for detection of methicillin resistance in *S.aureus* isolates and investigation the presence of PVL genes. Health Ministry Sisli Hamidiye Etfal Training and Research Hospital Microbiology and Clinical Microbiology Laboratory. Thesis for specialisation in medicine. Istanbul.

The aim of this study was to compare the specificity and sensitivity of the cefoxitin disk diffusion and Phoenix (BD, ABD) automated system with PCR for the mecA and mecC genes used as the gold standard assay. 179 *S. aureus* strains isolated from various clinical specimens in Sisli Hamidiye Etfal Research and Training Hospital Microbiology Laboratory were included in the study. All of isolates were verified as *Staphylococcus aureus* using colony morphology, Gram staining, catalase and coagulase tests, Phoenix kits and spa gene detection by multiplex PCR. Cefoxitin disc diffusion, the automated system and multiplex PCR were applied to all isolates. The specificity and sensitivity of the cefoxitin disk diffusion and Phoenix automated system were evaluated with multiplex PCR for the mecA and mecC genes used as the gold standard assay. These isolates were also tested for presence of PVL. Of the species included in the study, 91 were determined as MRSA since they were mecA positive. The sensitivity of cefoxitin disc diffusion and the automatized system in determining MRSA were 100% and 100% respectively; the specificity of cefoxitin disc diffusion and the automatized system in determining MRSA were 100% and 93.2% respectively. The rate of PVL positivity among MRSA and MSSA strains were found as 6.5% and 7.4 %, respectively. No isolates having mecC gene were detected.

Based on data from our study, it was considered that cefoxitin disc diffusion test is a reliable method in determining of methicillin resistance in *S. aureus* and more appropriate to perform at routine laboratories in terms of cost and efficiency. Also, the isolates identified as MRSA by the automatized Phoenix system should be detected by cefoxitin disc diffusion test to avoid from false positivity. If possible, the day when the bacterial growth observed, showing the presence of mecA and mecC genes is recommended for early detection of methicillin resistance.

Key words: MRSA, cefoxitin disc diffusion, Phoenix, mecA, mecC, PVL

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

*Staphylococcus aureus* toplum ve hastane kaynaklı infeksiyonların en önemli etkenlerinden olup, lokal ve sistemik birçok hastalıklara sebep olabilir. Tedavi edilmediği takdirde, bu mikroorganizma çeşitli organlara kan yoluyla yayılarak endokardit, osteomyelit ve septik artrit gibi ciddi klinik tablolara yol açar. Özellikle MRSA'lar on yılı aşkın bir süredir pandemilere sebep olarak, ciddi stafilocok infeksiyonlarındaki artışın en önemli kaynağını oluşturmaktadır. Günümüzde, MRSA suşları tedavi seçeneklerinin kısıtlılığı, tedavide kullanılan antibiyotikler ve infeksiyon kontrol önlemlerinin maliyeti nedeniyle tüm dünyada ciddi bir sağlık sorunu haline gelmiştir.

Özellikle metisiline resisten *S. aureus* (MRSA)'larda görülen çoklu antibiyotik direnci dikkate alındığında, doğru antibiyotiğin seçimi için öncelikle metisilin direncinin hızlı ve doğru tanımlanması gerekmektedir. MRSA'ların hatalı olarak duyarlı saptanması tedavi başarısızlıklarına neden olurken benzer şekilde metisiline duyarlı stafilocokların da dirençli tanımlanması gereksiz yere glikopeptid antibiyotiklerin kullanılması ve toksik etkilerine maruz kalınmasına, ayrıca tedavi maliyetinin artmasına yol açmaktadır. *Staphylococcus aureus* kökenlerindeki metisilin direnci, mecA gen kompleksi tarafından kodlanan değişmiş bir penisilin bağlayan protein olan PBP2a ile ilişkilidir. Ancak genetik baskılayıcı ve uyarıcıların ekspresyonunun kontrolündeki heterojenlikten dolayı metisilin direncinin tanımlanması zordur. Bu nedenle stafilocoklarda, metisilin direncini belirleyebilmek için PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) ile mecA geninin tespiti altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak 2011 yılında, insan ve inek MRSA izolatlarından, mecC (mecA-LGA251) adı verilen yeni bir mecA homologue (%70 nükleotit benzerliğine sahip) geni bulunmasından sonra tek başına mecA geninin tespiti metisilin direncinin saptanmasında altın standart olma özelliğini koruyamayacağı düşünülmektedir.

Şimdiye kadar mecC içeren suşlara hem insanlarda hem de farklı hayvan türlerinde rastlanmıştır. Bununla birlikte suşun asıl kaynağı ve epidemiyolojisi hakkında çok az bilgi bulunmaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalarda, mecC içeren MRSA ile enfekte olan inek, koyun gibi hayvanların, MRSA enfeksiyonları açısından insanlara bulaşta yeni bir zoonotik kaynak olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte bu genin varlığının mecA üzerinden metisilin direncini saptayan konvansiyonel ve moleküler metotlarla saptanamaması tüm dünyada endişe

uyandırmıştır. Bu tür izolatların metisilin duyarlı olarak raporlandığı ve tedavide yetersiz kalındığı bildirilmiş, bu problemin çözülebilmesi için son zamanlarda hem ticari hem de in-house PZR yöntemleri geliştirilmiştir.

Fakat her laboratuvarın moleküler teknikleri kullanma imkânı olmadığından, metisilin direncini gösteren fenotipik yöntemler geliştirilmiştir. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında metisilin direncinin tespiti için disk diffüzyon tekniği, sıvı dilüsyon yöntemleri, agar tarama testi, E-test yöntemi, çeşitli otomatize sistemler ve moleküler bazlı lateks aglütinasyon testleri kullanılmaktadır.

*S. aureus*'un neden olduğu enfeksiyonların patogeneğinde, bakteriye ait yüzeyel komponentlerin yanı sıra çok sayıdaki ekstraselüler proteinler, virülans faktörü olarak rol oynamaktadır. Bunlar arasında yer alan Panton-Valentin lökositidin (PVL) toksini, hücrelerin parçalanmasına ve nekroza yol açarak ciddi deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ile genç ve daha önce sağlıklı olan bireylerde yüksek mortalite ile seyreden ciddi nekrotizan pnömoniye neden olabilmektedir. PVL özellikle toplum kökenli *S. aureus* suşlarında gözlenmektedir ancak yapılan çalışmalar bu suşların hastane ortamlarına hızla yayılmaya başladığını göstermektedir. Morbidite ve mortalitesi yüksek olan PVL pozitif suşların hastane ortamında yayılması, salgınlar oluşturmaları, antibiyotiklere karşı direnç genlerini kazanarak, daha dirençli, daha virülan suşların ortaya çıkma riskini artırmaktadır. Bu nedenle bu toksin geninin varlığının ve sıklığının bilinmesi, hem enfeksiyonun ciddiyeti hakkında klinisyene ışık tutması hem de epidemiyolojik veriler açısından önem arz etmektedir.

Biz bu çalışmamızda, hastanemiz rutin mikrobiyoloji laboratuvarında klinik örneklerden izole edilmiş ve *S. aureus* olarak tanımlanmış suşlarda metisilin direncinin belirlenmesinde mecA ve metisilin direncinden sorumlu yeni bir gen olan mecC genlerinin varlığını referans alarak; sefoksitin disk diffüzyon testi ve Phoenix otomatize sisteminin (Becton Dickinson, ABD) MRSA'yı doğru saptamadaki başarılarının değerlendirilmesini amaçladık. Kullandığımız multipleks PZR yöntemi sayesinde aynı zamanda bu suşlarda PVL toksin geninin varlığını araştırdık.

## 2. GENEL BİLGİLER

Stafilokoklar *Micrococcaceae* ailesi içerisinde yer alan, doğada yaygın olarak bulunan gram pozitif koklardır. Memelilerin deri ve muköz membranlarında normal flora elemanıdır. Stafilokoklar genelde 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 (1).

### 2.1. Tarihçe

Stafilokokları ilk olarak 1878’de Robert Koch ışık mikroskopunda tanımlamış, 1880’de Pasteur sıvı besiyerinde üretmiştir. İskoçyalı cerrah Alexander Ogston 1881’de stafilokokların fareler ve kobaylar için patojen olduğunu gösterirken bu mikroorganizmalara; üremeleri sırasında birbirlerinden ayrılmayıp, üzüm salkımına benzeyen düzensiz kümeler oluşturmaları sonucu ‘*Staphylococcus*’ (*Staphyle*: üzüm salkımı) adını vermiştir. Rosenbach 1884’de ilk kez insandan izole etmiştir (1, 2).

Alexander Fleming’in 1928’de penisilini bulması ve 1940’da Florey ve Chain tarafından penisilin üretiminin başarılması ile stafilokok infeksiyonlarının tedavisinde önemli bir aşama kaydedilmiştir. Penisilinaz üretimi ilk olarak 1940’da Abraham Chain tarafından *Escherchia coli*’de bildirilmiştir. *S.aureus* suşlarında ise penisilin direncini 1944’de Kirby tanımlamıştır (3). İlk semisentetik penisilinaza dirençli antimikrobiyal olan metisilin 1959’da klinik kullanıma girmiştir. İki yıl sonra, ilk metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatları İngiltere’den bildirilmiştir. *S. aureus* suşlarındaki bu direnç 1960’lı yıllarda Avrupa’da ve 1970’li yıllarda ABD’nde önemli bir sorun haline gelmiştir. MRSA suşları özellikle 1980’li yıllarda hastane kaynaklı salgın etkeni olarak bildirilirken; kinolonlar, klindamisin, makrolidler, kloramfenikol, tetrasiklinler, aminoglikozidler, trimetoprim/sulfametoksazol ve rifampisin gibi antibiyotiklere karşı çoklu direnç ile sık karşılaşmıştır (4, 5).

Çoklu direnç gösteren MRSA suşlarına bağlı infeksiyonların artması nedeniyle, son 25 senedir vankomisin, stafilokokal nozokomiyal infeksiyonların tedavisinde kullanılır hale gelmiştir. İlk olarak 1995’de Fransa’da (6), 1996’da Japonya’da (7), 1997 yılı içinde ABD (8) Hong Kong (9) ve Kore’de (10) vankomisine azalmış duyarlılık (VISA: Vancomycin intermediate *S. aureus*) gösteren MRSA suşlarının izole edilmesi direnç sorununun ne kadar

önemli olduğunu göstermiştir. İlk vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA) suşu, Haziran 2002’de ABD’nde diyaliz tedavisi gören 40 yaşındaki bir erkek hastanın kateter ucundan izole edilmiştir (11,12). Direnç probleminin artmasıyla birlikte MRSA tüm dünyada nozokomiyal epidemilere yol açan ciddi bir sağlık sorunu haline gelmiştir.

## 2.2. Morfoloji, Boyanma ve Biyokimyasal Özellikler

Eski Yunanca ‘bir salkım üzüm’ anlamına gelen ‘staphilé’ sözcüğünden köken alan stafilokoklar Gram pozitif, genellikle üzüm salkımı şeklinde gözlenen topluluklar oluşturmuş kok morfolojisinde, sporsuz, hareketsiz ve 0.5-1.7 µm çapında olan aerop ve fakültatif anaerop, oksidaz negatif, katalaz pozitif bakterilerdir. Genellikle kapsülsüz olmakla birlikte nadiren kısıtlı bir kapsül formasyonu oluşturabilirler. *S. aureus subsp. anaerobius* ve *S. saccharoliticus* diğer türlerin aksine anaerop ortamda üremektedirler. Çoğu % 7,5-10 NaCl içeren besiyerlerinde, 18-45 °C’de kolaylıkla üreyebilmektedirler. Optimal üreme ısı 37°C olmakla birlikte pigment oluşumu için en iyi ısı 20-25°C’dir. G+C oranı % 30-39’dur (13).

Stafilokoklar katı besiyerinde 24 saatlik inkübasyondan sonra 1-3 mm büyüklüğünde yuvarlak, düzgün, düşük konveks ve parlak görünümde ürerler. *S. aureus*, türleri daha büyük (4-6 mm) olup griden parlak sarıya kadar değişen pigment açığa çıkarırlar. Ancak anaerobik ortamda ve sıvı besiyerinde pigment oluşumu gözlenmemektedir. Kanlı besiyerinde değişik derecelerde hemoliz yapabilmektedirler ancak küçük, pigmentsiz ve hemoliz oluşturmeyen koloniler şeklinde üreyen küçük koloni varyantları da tanımlanmıştır (14). Lizozime dirençli, basitrasın, furazolidon ve lizostafine duyarlıdırlar. Eritromisin varlığında gliserolden asit oluşturabilmektedirler (15).

Stafilokoklar, % 10 ve daha az NaCl içeren basit besiyerlerinde üreyebilirler. Başta glikoz olmak üzere birçok karbonhidratı fermentatif olarak parçalar ve son ürün olarak laktik asit meydana getirirler. Gaz oluşturmazlar (16). Mannitole etkileri değişken olup özellikle *S. aureus* bu şekere etkilidir. *S. aureus* mannitolü parçalayarak asit oluşturur. Karbonhidratlardan trehaloz, mannoz, maltoz, sükroz ve laktozu parçalar; ksiloz, sellobioz, arabinoz ve rafinozu parçalamaz. Nitratları nitritlere indirger (15, 17, 18).

## 2.3. Hücre Yapısı

### 2.3.1. Kapsüler polisakkaritler

*S. aureus*'un kapsüler polisakkarit bazlı immünotiplendirmesinde 11 tip sınıflandırılmıştır. Önemli klinik izolatların %70-80'inde kapsüler serotip 5 veya 8 bulunmuştur. Bu iki kapsüler tip, özellikle de tip 8, aynı zamanda toksik şok sendrom toksini üretimi gibi diğer *S. aureus* virulans faktörleri ile de ilişkilidir. Ayrıca oksasiline dirençli *S. aureus* suşlarının çoğu serotip 5 kapsüler polisakkarit eksprese etmektedir (19, 17). Polisakkaritten yapılmış olan tabakadan oluşan tükçe karakter kullanımına dikkat kapsül, kemotaksisi ve polimorfonükleer lökositler (PMNL) tarafından organizmanın fagositozunu inhibe ederek bakteriyi korur. Ayrıca bakterinin kateter ve diğer sentetik materyallere aderansını kolaylaştırır (20).

### 2.3.2 Hücre Duvarı

*S. aureus*'un hücre duvarı üç bölümden oluşmaktadır:

- 1- Peptidoglikan tabaka
- 2- Teikoik asit
- 3- Protein A ve diğer yüzey proteinleri

Peptidoglikan tabaka hücre duvarının esas yapısını oluşturmaktadır. Diğer gram pozitif mikroorganizmalarla benzer olarak *S. aureus*'un da hücre duvarının %50'sinden fazlası peptidoglikandır. Peptidoglikan yapısını oluşturan polisakkarit iskelet; birbirine  $\beta(1-4)$  bağlarıyla bağlı, tekrarlayan N-Asetil Glikozamin (NAG) ve N-Asetil Muramik asit (NAM) birimlerinden oluşmaktadır (17). NAM'a bağlı D ve L aminoasitlerden oluşmuş tetrapeptid zincir L-alanin, D-glutamin, L-lizin ve D-alaninden oluşmaktadır. Üçüncü sıradaki L-lizin stafilokoklar ve streptokoklar için tipiktir ancak diğer birçok mikroorganizmalarda ve gram negatif mikroorganizmalarda bunun yerine diaminopimelik asit bulunur. Bir tetrapeptidin karboksil grubu ile komşu NAM'daki tetrapeptidin  $\text{NH}_2$  grubu arasındaki çapraz bağ ve tetrapeptid zincirleri arasındaki bağlar peptidoglikan yapının bütünlüğünü sağlamaktadır (21). Peptidoglikan; birden fazla tabakadan oluşmuş dayanıklı ve kompleks bir yapıdır. Sitoplazmik membranın dışında yer alır, bakteriye şeklini verir ve ozmotik basınçtan korur. Çok sayıdaki çapraz bağ içeriği, hücre duvarının sağlamlığını artırarak konak savunmasına katkı yapar ve farklı fiziksel koşullara karşı koyabilmesini ve canlı kalabilmesini sağlar (22).

Hücre duvarında ikinci bölüm teikoik asittir. Hücre duvarı ağırlığının %50'ye yakın bir kısmını oluşturur. Ribitol teikoik asit ve lipoteikoik asit olmak üzere iki tiptir. Ribitol teikoik asit hücre duvarından uzanır. Lipoteikoik asit (Gliserol teikoik asit) ise hücre membranından

uzanır (17). Teikoik asit suda eriyebilen, antijenik yapıda, şeker-alkol-fosfat polimerleridir. Hücre duvarında aktif enzimlerin ve diğer proteinlerin bağlandığı yer olarak *S. aureus*'un metabolizmasında oldukça önemli fizyolojik görevleri vardır. Bununla birlikte teikoik asidin stafilokok infeksiyonlarının patogeneizde ve immün sistemin aktive olmasındaki direkt rolü tam olarak aydınlatılmış değildir (17,21). Lipoteikoik asitte, ribitol teikoik asitten farklı olarak poligliserol fosfat bulunmaktadır ve plazma membranındaki diaçilgliserol molekülleriyle bağlanarak bütünlüğün korunmasına yardımcı olur. Lipoteikoik asit, makrofaj ve diğer bağışıklık hücrelerinden sitokinlerin salınımını başlatarak inflamasyonda rol oynar (17,21).

Protein A, peptidoglikan yapının en dışındaki hücre duvarı komponentidir ve bu yapı sadece *S. aureus*'ta bulunmaktadır. Yüzey proteinlerinin bir prototipi olan protein A, hücre duvarının yaklaşık %7'sini oluşturur. En önemli özelliği, IgG3 dışındaki tüm IgG ve IgA2 ile bazı IgM'lerin Fc reseptörleri ile birleşebilmesidir (13). Bu şekilde mikrorganizmayı fagositoza karşı korumaktadır. Ayrıca hücre dışına salgılanan protein A aynı reseptörlere bağlanarak komplemanın aktive olmasına neden olur (13, 17, 21).

### **2.3.3 Koagülaz ve diğer yüzey adezyon proteinleri**

Stafilokoklarda çok sayıda yüzey proteini tanımlanmaktadır. Çoğu *S. aureus* suşunun en dış yüzeyinde “clumping” faktör (bağlı koagülaz olarak da adlandırılır) bulunmaktadır. Bu protein *S. aureus*'da önemli bir virulans faktörüdür. Clumping faktör, fibrinojene bağlanarak fibrine dönüştürür ve stafilokokların kümeleşmesine sebep olur. Bu proteinin saptanması, *S.aureus*'un tanımlanmasında temel bir testtir. Fibronektin, fibrinojen, elastin, kollajen gibi diğer yüzey proteinleri de konak matriks proteinlerine tutunmada önemlidir. Stafilokoklarda ve diğer bakterilerde bulunan yüzey adezyon proteinleri yeni tedavi yaklaşımlarında hedef oluşturmaktadır (23).

### **2.3.4. Stoplazmik membran**

Stoplazmik membran protein, lipit ve az miktardaki karbonhidratların bileşiminden oluşmaktadır. Hücrede osmotik bariyer olarak çalışır. Hücresel biyosentez ve solunum enzimlerinin sentezlenmesinde görevlidir (23).

## 2.4 Patogenez ve İmmünite

Stafilokokal infeksiyonların patogenezi, konak dokularına bakterinin tutunmasını sağlayan yüzey proteinlerinin üretimi ile spesifik toksinler ve hidrolitik enzimler gibi ekstrasellüler proteinlerin üretilmesine bağlıdır.

### 2.4.1 Stafilokokal toksinler

*S. aureus* beş sitolitik veya membran hasarlayıcı toksin (alfa, beta, delta, gama ve Panton-Valentin (P-V) lökosidin), iki eksfoliyatif toksin (A ve B), sekiz enterotoksin (A, B, C, D, E, G, H ve I) ve toksik şok sendrom toksin-1 (TSST-1)'i içeren çok sayıda virulans faktörü üretir. Sitotoksinlerin nötrofilleri parçalaması sonucu salınan lizozomal enzimler çevre dokuda yıkıma neden olabilirler. Sitotoksinlerden biri olan P-V lökosidin şiddetli pulmoner ve kutanöz infeksiyonlarla ilişkilendirilmektedir (23). Eksfoliyatif toksin A, TSST-1 ve enterotoksinler süper antijenler olarak bilinen polipeptitler sınıfına aittir (23).

#### Alfa toksin

Bakteriyel kromozom ve plazmidlerin her ikisi tarafından da kodlanabilen insanda hastalık oluşturan *S. aureus*'un çoğu suşları tarafından üretilen 33 kD'luk bir polipeptittir. Bu toksin damar düz kas hücrelerini bozar ve eritrosit, lökosit, hepatosit ve trombositlere zarar verir. Alfa toksinin stafilokokal hastalıklarda doku hasarında önemli bir mediyatör olduğuna inanılır (23).

#### Beta toksin

Sfingomyelinaz C olarak da adlandırılan beta toksin, insan ve hayvanlarda hastalık oluşturabilen *S. aureus*'un çoğu suşu tarafından üretilen, 35 kD'lik ısıya duyarlı bir proteindir. Bu enzim sfingomiyelin ve lizofosfatidilkolin için spesifiteye sahiptir ve eritrosit, fibroblast, lökosit ve makrofajları da içeren çoğu hücre için toksiktir. Beta toksinin insan hastalıklarındaki rolü henüz tam olarak açıklanamamıştır. Ancak alfa toksinle birlikte stafilokok hastalıklarının karakteristik abse formasyonu ve doku yıkımından sorumlu olabileceğine inanılmaktadır (23).

#### Delta toksin

*S. aureus* suşları ve diğer stafilokoklar tarafından üretilen 3 kD'lik bir polipeptittir. Bu toksin eritrosit, lökosit, makrofaj, lenfosit ve trombositler üzerine etkilidir. Diğer memeli hücreleri ve hücre içi membran yapılarını da içeren geniş bir sitolitik aktiviteye sahiptir. Delta toksin

kısmi nonspesifik membran toksisitesiyle deterjan benzeri etki gösterir. Antijenik özelliğe sahip değildir (23).

#### Gamma toksin ve Panton-Valentine (P-V) lökosidin

Hemen hemen tüm *S. aureus* suşları tarafından üretilen gama toksin ve *S. aureus* suşlarının %5'inden azı tarafından üretilen P-V lökosidin iki polipeptit zincirinden oluşan çift komponentli S (yavaş) ve F (hızlı)) toksinlerdir. Şimdiye kadar üç S ve iki F protein tanımlanmıştır. Her iki toksini üretme yeteneğindeki bakteri bu proteinlerin tümünü 6 farklı toksin üretme potansiyeli ile kodlayabilir. Bu toksinler nötrofil ve makrofajları parçalayabilir. P-V lökosidin toksini lökotoksiktir ancak hemolitik aktivitesi yoktur. Bu toksinlerin sitolitik etkisi, membranlarda por oluşumunu takiben hücre katyon gradyentindeki değişikliklere bağlı gelişen osmotik değişikliklerden kaynaklanır (23).

#### Eksfoliyatif toksinler

Haşlanmış deri sendromu bu toksinle oluşur. Eksfoliyatif toksinin iki farklı şekli (ETA ve ETB) tanımlanmıştır. Her ikisi de hastalık yapabilir. ETA ısıya dirençli ve geni kromozomaldır. ETB ise ısıya duyarlı ve plazmid aracılıdır. Ultrastrüktürel çalışmalar, serin proteazlar olan bu toksinlere maruz kalma sonucunda epidermisin stratum granulosum tabakasındaki intrasellüler köprüler (desmozomlar)'ın ayrılmasının gerçekleştiğini göstermiştir. Bu olayın tam mekanizması hala bilinmemektedir. Bu toksinler hücre yıkımı veya inflamasyonla ilişkili değildir. Bu yüzden epidermisin etkilenen tabakasında ne stafilokoklar ne de lökositler bulunmazlar. Epidermisin toksine maruz kalması sonucu koruyucu nötralizan antikorlar gelişir. Haşlanmış deri sendromu çoğunlukla küçük çocuklarda ve nadiren de büyük çocuklar ve erişkinlerde görülür. Bunun muhtemel sebeplerinden birisi ETA ve ETB'nin, duyarlı yenidoğanların epidermisinde bulunup büyük çocuk ve erişkin epidermisinde bulunmayan GM4 benzeri glikopeptidlere bağlanmalarıdır (23).

#### Enterotoksinler

Serolojik olarak farklı 8 stafilokok enterotoksini (A-E, G-I) ve enterotoksin C'nin 3 alt tipi tanımlanmıştır. Enterotoksinler 100°C'de 30 dakika ısıtmaya, mide ve jejunum enzimlerine karşı dirençlidir. Gıda ürünleri enterotoksin üreten stafilokoklar ile kontamine olduktan sonra toksin üretimi gerçekleştiğinde, gıdanın yeniden hafifçe ısıtılması ve gastrik asite maruz kalması koruyucu olmamaktadır. Bu toksinler tüm *S. aureus* suşlarının %30-50'si tarafından üretilmektedir. Enterotoksin A hastalıkla ilişkili en yaygın toksindir. Enterotoksin C ve D

kontamine süt ürünlerinde bulunur. Enterotoksin B ise stafilokokal pseudomembranöz enterokolite sebep olur. Toksin aktivitesinin tam mekanizması ise bilinmemektedir. Bu toksinler süperantijen olup; sitokin salınımı ve T hücrelerinin nonspesifik aktivasyonunu da sağlayabilmektedirler. Mide ve jejunumdaki karakteristik histolojik değişiklik epitelyum ve altındaki lamina propria'da nötrofil infiltrasyonunu içermesidir. Ayrıca bu toksinler, jejunum epitelindeki fırçamsı kenar kaybı ve mast hücrelerinden inflamatuvar mediyatörlerin salınımının uyarılmasıyla stafilokokal gıda zehirlenmesinin karakteristik özelliği olan kusmanın oluşmasından sorumlu olabilir (23).

#### Toksik şok sendrom toksin-1 (TSST-1)

Önceden pirojenik ekzotoksin C ve enterotoksin F olarak isimlendirilen TSST- 1, ısı ve proteolize dirençli, 22 kD'luk kromozom aracılı bir ekzotoksindir. Menstruasyonla ilişkili toksik şok sendromundan (TSS) *S. aureus* suşlarının % 90'ı, diğer TSS şekillerinden ise *S. aureus* suşlarının yarısının sorumlu olduğu tahmin edilmektedir. Enterotoksin B ve nadiren enterotoksin C menstruasyonla ilişkili olmayan TSS'lerin yaklaşık olarak yarısından sorumlu tutulmaktadır. TSST-1'in mukozal bariyerlerden penetre olma kabiliyeti TSS'nin sistemik etkisinden sorumludur. TSS'li hastalarda ölüm, multiorgan yetmezliğine neden olan hipovolemik şok nedeniyledir (23).

### **2.4.2 Stafilokok Enzimleri**

#### Koagülaz

*S. aureus* suşları bağlı ve serbest olmak üzere iki formda koaglaza sahiptirler. Stafilokokal hücre duvarındaki bağlı koagülaz, direkt olarak fibrinojeni çözünmeyen fibrine çevirir ve stafilokokların kümelenmesine neden olur (17, 24, 20). Serbest koagülaz da globulin plazma faktör (koagülaz reacting faktör) ile reaksiyona girerek, fibrinojeni çözünmeyen fibrine dönüştürür ve stafilotrombin formunu oluşturur (24). Bu faktörlerin enzimatik aktivitesi sayesinde bakteri fibrinle kaplanarak, opsonizasyon ve fagositoza daha dirençli hale gelir (17, 24, 20).

#### Katalaz

Bütün stafilokoklar miyeloperoksidaz sisteminde düzenlenen toksik hidrojen peroksitin su ve oksijene dönüşümünü katalize eden katalaz enzimi üretirler (17, 20). Hidrojen peroksit bakteriyel metabolizma sırasında veya fagositoz sonrası birikebilir (20). Katalaz fagosite

edilmiş bakterinin oksijen radikalleri ile öldürülmesini engelleyerek konak savunma mekanizmalarını bozar (25).

#### Hyaluridaz

Hyaluronik asiti hidrolize eder. Bu enzim *S. aureus* 'un dokuda yayılımını kolaylaştırır. *S. aureus* suşlarının % 90'dan fazlası bu enzimi üretirler (17, 24, 20).

#### Fibrinolizin

Aynı zamanda stafilokinaz olarak da isimlendirilir. Hemen hemen tüm *S. aureus* türlerince üretilen fibrinolizin, fibrin kılıfını eriterek infeksiyonun yayılımını kolaylaştırır (17, 24, 20).

#### Lipaz

*S. aureus* 'un tüm suşları ve KNS'lerin % 30'dan fazlası birkaç farklı lipaz üretirler. Bu enzim lipidleri hidrolize eder ve vücutta yağdan zengin deri bölgelerinde bulunan stafilokokların canlılığını devam ettirmesini sağlayan bir faktördür. Ayrıca kutanöz ve subkutanöz dokularda yüzeysel cilt infeksiyonlarının gelişiminde rol oynar (17, 20, 24, 26).

#### Nükleaz

Termostabil nükleaz, *S. aureus* 'u diğer stafilokoklardan ayırt etmede kullanılan diğer bir faktördür. İnfeksiyonun patogenezinde bu enzimin rolü bilinmemektedir (20, 26).

#### Penisilinaz

Penisilinin ilk klinik kullanıma girdiği 1941 yılında stafilokoklar büyük oranda penisiline duyarlı iken, organizmanın ürettiği penisilinaz sayesinde bugün stafilokokların % 90'ından fazlası penisiline dirençli durumdadır (20). Yapılan ayrıntılı çalışmalar, *S. aureus* 'un en az üç farklı tipte  $\beta$ -laktamaz ürettiğini göstermiştir. Penisilin ve ampisiline direnci sağlayan stafilokok penisilinazı; antibiyotik tarafından yapımı indüklenebilen enzim niteliğinde olabileceği gibi, sürekli üretilen yapısal bir enzim niteliğinde de olabilir. Bu enzimi kodlayan genler genellikle plazmid üzerinde bulunur (ekstrakromozomal DNA) ve aynı zamanda eritromisin ve tetrasiklin gibi çeşitli antibiyotiklere direnç genlerini de taşırlar. Bu direnç genleri transformasyon ve transdüksiyon ile diğer bakterilere de transfer edilebilir (17).

## 2.5. *S. aureus*'un İdentifikasyonu

*S. aureus*'u tanımlamada en güvenli testlerden biri koagülaz testidir. Serbest koagülaz “tüp koagülaz” ve bağlı koagülaz “lam koagülaz” yöntemleriyle tespit edilir.

### Lam koagülaz testi

*S. aureus* suşlarının çoğu hücre duvarında bağlı koagülaza veya ‘clumping faktör’e sahiptir. Bu faktör hızlı hücre aglütinasyonuna sebep olan plazmadaki fibrinojen ile direk tepkimeye girer. Bu test kanlı agar, Columbia Colistin Nalidixic Agar ya da diğer nonselektif nutrient besiyerinde üreyen kolonilerden yapılabilir. Fakat yüksek tuz oranı *S. aureus*'un bazı suşlarında otoaglütinasyona sebep olduğu için bu test, yüksek tuz içeren besiyerlerinden (mannitol salt agar gibi) yapılmamalıdır. Clumping faktöre sahip olmayan suşlar serbest koagülaz üretebileceği için, herhangi bir suş lam koagülaz testinde negatif çıkarsa bu sonuç bir tüp koagülaz testi ile doğrulanmalıdır. *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi* gibi koagülaz negatif bazı suşlar clumping faktör üretilip lam koagülaz testi ile pozitif sonuç verebilirler (17).

### Tüpte koagülaz

Tüp koagülaz testi *S. aureus* identifikasyonu için referans testtir. Bu metot ile saptanan koagülaz ekstrasellüler olarak salınır ve bir kompleks oluşturmak için plazmadaki Coagulase-Reacting Factor (CRF) ile reaksiyona girerek stafilotrombin oluşturur. Stafilotrombin de fibrinojenle reaksiyona girerek fibrin oluşumunu tetikler. Bazı suşlar, 35°C’de uzayan inkübasyon periyodunda pıhtının çözülmesine sebep olan fibrinolizin üreteceği için testler 35°C’de 4 saat inkübasyondan sonra oda ısısına alınmalıdır ve 18–24 saat sonra tekrar okunmalıdır. Nadiren bazı *S. aureus* suşları koagülaz negatif olabilmektedir (7,19). Yukarıda sözü edildiği gibi hem tüp hem de lam koagülaz testi için önerilen ortam EDTA’lı tavşan plazmasıdır. İnsan plazması çeşitli miktarda CRF ve antistafilokokal antikorlar içerdiğinden koagülaz testi yapmada kullanılmamalıdır (17).

### Lateks aglütinasyon

Bu yöntemde plazma ile kaplanmış lateks parçacıkları kullanılır. Latekse bağlı fibrinojen clumping faktörü saptar. Ayrıca parçacıklarda bulunan immunglobulin molekülleri stafilokokal hücre duvarı proteini olan protein A’yı da saptayabilir. Bu protein, IgG moleküllerinin Fc reseptörü ile bağlanabilmektedir. Bir agar plağından alınan kolonilerin test materyali ile karışması sonucu lateks-mikroorganizma süspansiyonu hızlı bir kümeleşme

gösterir. Ayrıca *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi*'nin bazı suşları da clumping faktör üretir ve bu test ile pozitif reaksiyon verebilir (17).

#### Pasif hemaglütinasyon

Eritrositler ya da sentetik olarak hazırlanmış polistiren lateks gibi parçacıklar, çeşitli yöntemlerle çok çeşitli antijenlerle kaplanabilirler. Bu şekilde kaplanmış olduğu antijenin taşıyıcısı durumuna gelen eritrosit ya da parçacıklar, elektrolitli ortamda bu antijenlerin antikorları ile karşılaştıklarında aglütinasyon verirler. Dolaylı hemaglütinasyon denilen bu testler çok duyarlı olup, ortamda çok az antikor bulunması bile sonuç vermek için yeterlidir. *S. aureus* hücrelerinin yüzeyindeki clumping faktörü saptamak için fibrinojen ile sensitize edilmiş koyun eritrositleri bu amaçla kullanır (27).

#### Deoksiribonükleaz (DNA'se) testi

Bazı *S. aureus* suşları zayıf ya da şüpheli tüp koagülaz reaksiyonu oluşturabilirler ve nadiren gerçekten koagülaz negatif olabilirler. Bu vakalarda koagülaz ile çok iyi uyum gösteren ek testler yapmak gerekebilir. *S. aureus* endonükleolitik ve ekzonükleolitik aktiviteye sahip olan DNA'se ve termotabil nükleaz üretir (22,23). Bu enzimlerin her ikisi de nükleik asiti hidrolize eder. DNA'se içeren bakteriler, DNA içeren besiyerinde DNA'yı parçalayıp oligonükleotidler oluştururlar. Bu deneyde DNA'lı plak besiyerine saf kültürden çizgi ekimi yapıp 35°C'de 18-24 saat bekletildikten sonra plak yüzeyine 1 N HCl damlatılmasına dayanır. Bakteri DNA'se yapıyorsa ekim çizgisinin çevresinde saydam bir zon oluşur. Endikatör olarak besiyerine toluidin mavisi konulmuş ise DNA'se varlığında bakteriler ekim çizgisi çevresinde parlak pembe bir zon oluştururlar. Endikatör olarak methyl green konmuş besiyerinde ekim çizgisi etrafında besiyerinin yeşil rengi açılır (28, 32, 33).

#### Termotabil Endonükleaz Test

Bu test içinde aynı DNase test besiyeri kullanılır, yalnızca agara 3 mm delikler açılarak içine sıvı besiyeri konulur. 35°C'de bir gece inkübe edilir ve kuyucukların etrafını çevreleyen pembe zon görülür. Bazı koagülaz negatif stafilokoklar (*S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. capitis* ve *S. carnosus*) zayıf pozitif reaksiyon verebilirler. Bu sebeple *S. aureus* için testin özgüllüğü, *S. aureus* enzimine karşı monoklonal veya poliklonal antikorlarla seroinhibisyon, PZR ile amplifikasyon ya da termotabil endonükleazı kodlayan 'nuc geni' sekansı ile doğrulanmalıdır (17, 29).

#### Mannitol fermentasyonu

*S. epidermidis* ve diğer koagülaz negatif türlerin aksine, *S. aureus* mannitolü fermente edebilir. *S. aureus*'un dışkı, çevre ve nasal taşıyıcılarda taranmasında bu özelliği kullanılır. Kullanılan besiyeri “mannitol salt agar”dır. Bu besiyeri mannitol (% 1), NaCl (% 7.5), fenol kırmızısı ve peptonlar içerir. Bu yüksek tuz konsantrasyonu, enterokoklar dışındaki diğer mikroorganizmaların üremesini engeller ve seçici olarak stafilokoklar ürer. İzole edilen *S. aureus* kolonileri, çevresinde mannitolden asit oluşumunu gösteren sarı bir zon varlığı ile saptanabilir. Nadiren başka stafilokok türleri de mannitolden asit üretebilir. Bu sebeple bu besiyerinde üretilen mannitol pozitif organizmalar kanlı agar besiyerine pasajlanıp koagülaz üretimi açısından test edilmelidir (17).

#### *Staphylococcus aureus*'a Özgü Enzimlerin Tespiti

Guzman ve arkadaşları proteinA ve *S. aureus*'un tüm suşlarında üretilen *S. aureus* endo-N-asetilglukozaminidaz (SaG)'ı aynı anda tespit eden enzim immunoassay yöntemini geliştirmişlerdir. Bu testin özgüllüğü ve duyarlılığı %100 tespit edilmiştir. Özellikle clumping faktör ve/veya protein A'sı eksik olan suşların tanımlanmasında faydalıdır (17).

#### Ticari Sistemler ve Moleküler Testler

Stafilokokların tanısında ticari sistemler de kullanılmaktadır. BD Phoenix 100(BD Microbiology System), API Staph (BioMerieux- Vitek), Minitek Gram pozitif panel (), ID 32 Staph (BioMerieux), Rapidec Staph (BioMerieux-Vitek), Vitek1 (BioMerieux) ve Vitek 2 sistem (BioMerieux) örnek olarak verilebilir (1, 2). Ayrıca Matrix-Associated Laser Desorption/Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) yöntemi ile çalışan otomatize sistemler de bakteri identifikasyonunda laboratuvarlarda kullanılmaktadır.

Bazen *S. aureus* izolatları koagülaz ve diğer biyokimyasal testlerde şüpheli sonuçlar verirler ya da metisilin/oksasilin duyarlılık testlerinin sonuçları şüpheli olabilir. Bu durumlarda alternatif metotlarla tanının doğrulanmasına ihtiyaç duyulur. Metisilin/oksasilin duyarlılığını belirleyen hızlı moleküler testler ile aynı anda *S. aureus*'a özgül hedeflerin tespiti MRSA izolatlarının hızlı tanısına olanak verir (29).

*S. aureus*'un tanısı için kullanılan moleküler yöntemlerin çoğu PZR bazlıdır. Nükleaz (*nuc*), koagülaz (*coa*), protein A (*spa*), *femA* ve *femB*, *Sa442*, 16 S rRNA ve yüzey ilişkili fibrinojen bağlayan protein genleri gibi türe özgü bölgeleri amplifiye eden birçok primer geliştirilmiştir (30). Stafilokokal metisilin direncinin tespiti için *mecA* ve 16S rRNA gibi spesifik gen bölgelerini değerlendiren multipleks PZR yöntemi de mevcuttur (31). Ayrıca epidemiyolojik araştırmalar için MRSA suşları arasında antibiyotip, bakteriyofaj

tiplendirilmesi, kapsül tiplendirilmesi gibi fenotipik ve “pulsed field” jel elektroforezi (PFGE), kromozomal DNA restriksiyon analizi gibi genotipik farkları esas alan testler de yapılmaktadır(1,2,17). Bu ve diğer alternatif moleküler metotlar, son yıllarda tanı ve duyarlılık testlerini kombine ederek geliştirilmiş ve rutin laboratuvarların kullanımına sunulmuştur. Fakat bu yöntemlerin ek maliyet yükünden dolayı, diğer yöntemlerle şüpheli sonuçlar alındığı zaman doğrulama amaçlı yapılması önerilmektedir (29).

## 2.6 Epidemiyoloji

Stafilokoklar her yerde bulunabilirler. İnsanların derilerinde koagülaz negatif stafilokoklar vardır ve nemli deri kıvrımlarının *S. aureus*’la geçici kolonizasyonu yaygındır. Yeni doğanda kesilmiş göbek kordonu, deri ve perineal bölgenin *S. aureus*’la kolonizasyonuna sık rastlanır. *S. aureus* ve KNS’ler orofarinks, gastrointestinal sistem (GİS) ve ürogenital sistemde de bulunurlar. Büyük çocuk ve erişkinlerde kısa süreli veya kalıcı *S. aureus* taşıyıcılığı, ön nazofarinkste orofarinksten daha yaygındır. Normal sağlıklı erişkinlerin yaklaşık %15’inde nazofaringial *S. aureus* taşıyıcılığı bulunmakla birlikte yatan hastalar, sağlık personeli, ekzematöz deri hastalığı olanlar ve sürekli ilaç kullananlarda daha yüksektir. Mukozal epitele bu mikroorganizmaların yapışması stafilokokal hücre yüzey adezinleri tarafından sağlanır (23). Stafilokokların deri ve nazofarinkste bulunmalarından dolayı yayılması kolaydır ve birçok hastane kaynaklı infeksiyondan sorumludurlar. Stafilokoklar yüksek ısı, dezenfektanlar ve antiseptik solüsyonlara duyarlıdır ancak, kuru yüzeylerde uzun süre canlılıklarını sürdürebilirler. Bu mikroorganizmalar duyarlı kişilere direkt temas ve kontamine materyallerle transfer edilebilir (23).

Metisiline dirençli *S. aureus* infeksiyonları 1970’lerin sonlarına doğru öncelikle Avrupa’da daha sonra Amerika’da endemik olarak görülmeye başlanmıştır. Daha az sıklıkta olmakla birlikte, MRSA’lar yaşlı bakım evleri, kreşler ve kronik intravenöz ilaç kullanıcıları gibi toplum kaynaklı infeksiyonlarda da etken olabilmektedir. Nazokomiyal infeksiyonların yaklaşık 2/3’ü yoğun bakım birimlerinde görülmektedir. Metisiline dirençli stafilokokların kolonizasyon veya infeksiyon oluşturmada, uzun süreli hospitalizasyon, çeşitli antibiyotiklerle ve uzun süreli tedavi, metisiline dirençli stafilokoklarla kolonize veya infekte hastalarla aynı kapalı ortamda bulunma hastalara ait önemli risk faktörlerini oluşturmaktadır

(35). Yanık birimlerindeki hastalarda bu risk oldukça yüksektir. Bu nedenle, nazokomiyal kökenli *S.aureus* infeksiyonlarının identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık paternlerinin erken ve doğru olarak tespiti son derece önemlidir (35). Son yıllarda, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de hastanede yatan hastalardan izole edilen *S. aureus* suşlarında metisilin direncinde ciddi artışlar saptanmaktadır (36).

Son yıllarda toplum kökenli MRSA (TK-MRSA) infeksiyonları da giderek önem kazanmaya başlamıştır. TK-MRSA infeksiyonları sağlıklı kişilerde, özellikle çocuk ve genç erişkinlerde görülür. Çoğunluğu Panton-Valentine toksini taşıyan bu suşlar daha çok deri-yumuşak doku infeksiyonları ve pnömoniye yol açarlar (37, 38).

MRSA kolonizasyonu ve infeksiyonunu önlemek amacıyla el yıkama eğitimi ve antibiyotik kullanımının kısıtlanması hastanelerde daha etkin ve maliyeti düşük yöntemlerdir. Burun taşıyıcılığının önlenmesinde seçilmiş olgularda mupirosin kullanımı ile birlikte vücudun klorheksidinli sabunlarla yıkanması etkili olabilmektedir (39, 40).

#### **2.6.1 *S. aureus*'un oluşturduğu infeksiyonlar**

*S. aureus* 'un neden olduğu infeksiyonları dört grup içinde incelemek mümkündür;

- Deri infeksiyonları
- Septisemi-endokardit
- Organ infeksiyonları
- Toksinlerle oluşan hastalıklar

Klinik şekiller arasında birinden diğerine geçiş olabilmektedir. Basit deri infeksiyonu letal bakteriyemi ile sonuçlanabilir veya devamında metastatik infeksiyon odakları gelişebilir. Ayrıca toksin salgılayan bir suşa toksik şok sendromuna neden olabilir (34).

#### **Deri-Yumuşak Doku İnfeksiyonları**

*S. aureus* temel olarak piyogenik eksuda veya apse gelişimini indükler. Tutulan anatomik yapıya göre değişik klinik formlar oluşabilir (34).

1. İmpetigo; epidermisin tutulumu
2. Follikülit; superfisyal dermisin tutulumu

3. Fronkül; karbonkül, hidradenitis süpurativa: derin dermisin tutulumu

4. Erizipel; sellülit, fasiit: subkutan dokuların tutulumu.

### Bakteriyemi

Son yıllarda *S. aureus*'a bağlı kan-dolaşımı infeksiyonu insidansı giderek artış göstermektedir. Genelde iki gruba ayrılmaktadır:

1. Hastanede kazanılmış bakteriyemi; hastaneye yatıştan iki günden sonra kazanılan bakteriyemi.

2. Toplumdan kazanılmış bakteriyemi; hastaneye yatışın ilk iki gününde veya başvuru esnasında saptanan bakteriyemi.

Bu iki grup giderek birbiriyle örtüşmeye başlamıştır. Bu yüzden “toplumdan kazanılmış bakteriyemi” yerine “toplum başlangıçlı bakteriyemi” olarak adlandırmanın daha doğru olacağı düşünülmektedir (34).

Hem toplum hem de hastane kökenli bakteriyemiler, uygun antibiyotik tedavisine rağmen yüksek morbidite ve mortalite ile seyrederek. Periferik emboli bulguları ve beraberinde infektif endokardit bulunması, mortalitenin çok yüksek olabileceğine işaret eder. Önemli süpuratif komplikasyonları vardır; osteomyelit, septik artritis, menenjit, infektif endokardit ve diğer tüm visseral organlarda stafilokokal infeksiyonlar ortaya çıkabilir. Süpuratif olmayan komplikasyonları ise; septik şok ve diseminan intravasküler koagülasyondur (34).

Nozokomiyal *S. aureus* bakteriyemisi daha çok intravasküler veya üriner kateter varlığı gibi invazif medikal girişimler ile ilişkilidir. Ancak *S. aureus* bakteriyemisi hastanelerde gelişen tüm febril septik atakların ayırıcı tanısında düşünülmelidir (34).

### Endokardit

Doğal kapakta gelişen infektif endokardit *S. aureus* bakteriyemisinin en ciddi komplikasyonlarından biridir. Valv replasmanı yapılsa da uygun antibiyoterapiye rağmen letal seyredebilir. Eskiden predispozan faktör olarak romatizmal kalp hastalığı başta gelirken artık yerini intravenöz ilaç kullanımı, diyaliz, intravasküler protez, yaşlı hastalarda kapak sklerozu, nozokomiyal kazanım gibi faktörlere bırakmıştır (41, 42).

### Pnömoni ve Ampiyem

*S. aureus* toplumdan kazanılmış pnömonilerin % 10'undan sorumlu iken hastanede kazanılmış pnömonilerde %20-30 oranında izole edilmiştir (43). Toplum kökenli *S. aureus* pnömonisi daha çok viral alt solunum yolu infeksiyonlarından sonra, bakımevlerinde kalan 75 yaşından büyük yaşlı hastalarda, diyabet ve alkolizm gibi predispozan faktörlere sahip hastalarda görülür. İnflüenza epidemilerinden sonra insidansı artar. Hastane kökenli *S. aureus* pnömonisi entübasyon veya aspirasyon ile ilişkili meydana gelir, ancak sağ kalp endokarditi veya bakteriyemi ile hematojen yayılımla da ulaşabilir (43). Osteomyelit %50-70 oranında etken *S. aureus* 'dur. Hematojen yayılım veya kirli kontaminasyon sonucu kemiği infekte eder (34).

### Septik artrit

Çocuk ve erişkin nongonokokal artritlerinde *S. aureus* en sık sorumlu olan etkindir. Lokal travma sonucu, hematojen veya iyatrojenik olarak gelişebilir. Erişkinlerde romatoid artrite sekonder gelişebilir (25).

### Stafilokokal Haşlanmış Deri Sendromu

Eksfoliatin A ve B salgılayan suşlar tarafından oluşturulur. Geniş bir klinik spektruma sahiptir. Ciddi sepsis, sıvı elektrolit kaybı sonucunda hipovolemi, sepsis sendromu ve % 1-10 oranında ölüm görülür. Tutulan deri bölgesinde *S. aureus* gösterilemez. Büllöz impetigo en sık görülen formudur. İnfanlarda tanımlanan Ritter hastalığında, eksfoliatif toksinle ilişkili deri lezyonlarının yanı sıra nazofarinks, umblikus ve üriner sistemin tutulumu söz konusudur (44).

### Toksik Şok Sendromu (TSS)

Başlıca bulguları yüksek ateş, hipotansiyon, bol sulu ishal, eritroderma, mental konfüzyon ve renal yetmezlik olan ciddi bir tablodur. TSS ilk olarak 1980 yılında kadınlarda tampon kullanımı ile ilişkilendirilmiştir. Menstruasyon ile ilişkili olmayan TSS'lu hastalarda stafilokoklar vücudun diğer bölgelerinden izole edilebilmektedir. Normal popülasyonda TSST-1'e karşı koruyucu antikor titreleri % 90'dan fazla oranda bulunurken TSS'lu hastaların % 90.5'ten fazlasında akut dönem serumlarında koruyucu antikor bulunmadığı ve konvelesan dönemde de %50'sinde koruyucu antikor oluşmadığı görülmüştür (45).

## Besin Zehirlenmeleri

Genelde salgınlar şeklinde görülür. Enterotoksin B ve diğer enterotoksinlere bağlı olarak gelişir. Toksin ısıya dirençli olup kaynatma veya pişirme ile inaktive olmaz. Sıtılı tatlılar, konserveler, etli yiyecekler, patates salataları ve dondurma en sık rastlanan sorumlu besinlerdir. 2-6 saatlik inkübasyon süresinden sonra bulantı, kusmayla başlayıp ishale devam eder. Ateş ve nörolojik bulgu yoktur. Prognoz iyi olup tüm semptomlar sekiz saatte düzelir (34).

## **2.7 Antibiyotik Duyarlılığı**

### 2.7.1. Beta laktam antibiyotiklere direnç

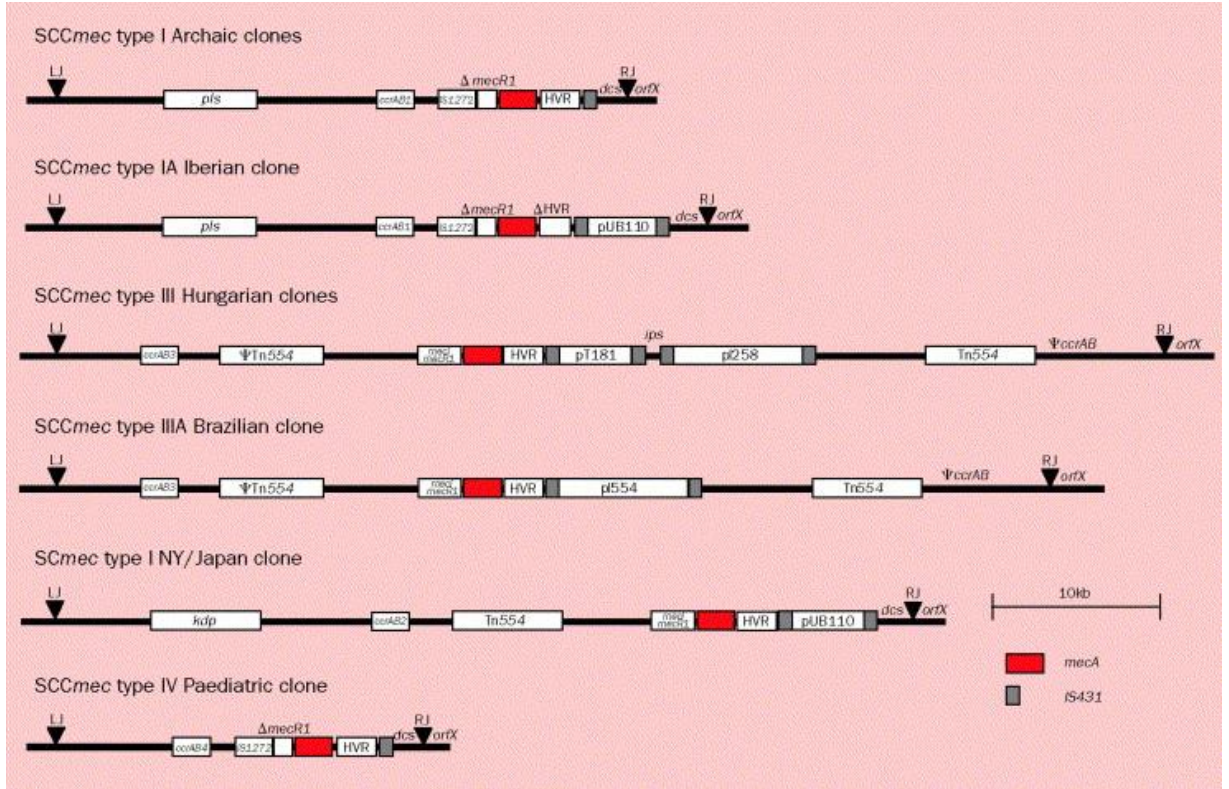
Klinik kullanıma girdiği dönemlerde penisiline hemen tüm *S. aureus* kökenleri duyarlı iken, 1944 yılından başlayarak plazmid kökenli beta laktamaz üretimine bağlı ortaya çıkan penisilin direnci hızla yayılmış ve 1970 yılından sonra tüm dünyada penisiline duyarlı köken oranı çok azalmıştır. Günümüzde, özellikle hastane kaynaklı izolatlarda bu oran % 5'in altına düşmüştür (46).

Stafilokoklarda penisilin direnç mekanizması indüklenebilir beta laktamaz (penisilinaz) üretimidir. Beta laktamaz salgılanmasını sağlayan blaZ geni büyük bir plazmid içinde bulunan aktarılabılır bir elementin parçasıdır. Bu genin ekspresyonunun düzenlenmesinden ise blaR1 ve blal adlı iki gen sorumludur. blaZ ile blaR1 ve blal arasında da bir operatör bölge bulunmaktadır. Ortamda bir beta laktam antibiyotik bulunmadığı durumlarda, blal geninin ürünü olan blal proteini bu operatör bölgeye bağlanıp, blaZ 'den RNA (ribonükleik asit) transkripsiyonunu baskılar. Böylece beta laktamaz enzimi üretimi düşük düzeylerde tutulur. blaR1 geninin ürünü olan blaR1 proteini ise bakterinin hücre içi ve dışı arasında ilişkide olacak şekilde sitoplazmik membranda yerleşmiştir. Bu proteinin bakterinin hücre dışında kalan bölümünde penisilin bağlayıcı bir bölge yer almaktadır. Ortamda beta laktam antibiyotik bulunduğu durumlarda, blaR1 proteini hücre dışında bulunan penisilin bağlayıcı bölgesi aracılığı ile antibiyotiği tanır ve blaR1 proteininin hücre içinde kalan çinko metalloproteinaz bölge inaktif proenzimden, aktif proteaza dönüşür. Bu enzimde blal proteinini parçalayarak operatör bölgeye bağlanmasını engeller. Bu bağlanmanın olmaması sonucu blaZ geninin transkripsiyonu serbest kalır ve beta laktamaz enzimi üretimi artar (47).

Stafilokoklarda metisilin direncinin mekanizması beta laktam antibiyotiklere düşük afinite gösteren farklı PBP'lerin (PBP2a) sentezlenmesi veya beta laktamazların aşırı yapımıdır. Bu nedenle metisiline dirençli bir stafilokok beta laktam antibiyotikler ile karşılaştığında, diğer tüm PBP'ler antibiyotik tarafından bloke edilse bile PBP2a düşük afinite nedeni ile beta laktam antibiyotiği bağlamaz ve hücre duvarı sentezini sürdürür. Bu nedenle metisiline dirençli olan bir stafilokok kökeninin, duyarlılık testi yapılmaksızın tüm beta laktam grubu antibiyotiklere dirençli olduğu kabul edilir. Ayrıca, direnç genlerinin birlikte taşınması nedeniyle, metisiline dirençli stafilokok kökenleri sadece beta laktam antibiyotiklere değil, diğer birçok antibiyotiğe de dirençli olabilir (47, 48). Metisiline dirençli stafilokoklar, metisiline duyarlılardan farklı olarak PBP2a'yı kodlayan 76 kDa'lık mecA genine sahiptirler. mecA geni, stafilokoksik kaset kromozomu (staphylococcal cassette chromosome-SCC) olarak tanımlanan bir genomik adacığın parçasıdır. Bu adacıkta mecA geninin yanı sıra diğer antimikrobiyallere dirence neden olan genler de bulunabilir ve SCCmec olarak adlandırılır (49). Tüm elemanın hareketine aracılık edebilen rekombinazlar (ccrA ve ccrB ) ve beta laktam direncine aracılık eden mecA geni en önemli SCCmec genleridir. Bazı SCCmec'lerde mecA geninden önce mecR1 ve mecI regülatör determinantları bulunabilir. mecR1 bir membran reseptörünü, mecI ise bir gen reseptörünü kodlar. Beta laktam antibiyotiklerin varlığında membran mecR1 reseptörünün hücre dışındaki parçası, onun intrasitoplazmik parçasının otokatalitik parçalanmasını tetikler. Serbestleşen intrasitoplazmik peptid, metalloproteaz olarak görev yaparak mecI reseptörünü parçalar, böylece gen ekspresyonu üzerindeki baskı kalkar ve PBP2a sentezi artar. PBP2a sentezinin bu şekilde düzenlenmesinin nedeni, PBP2a'nın aşırı yapımının bakteri için toksik olabilmesidir. MecR1 ve mecI'nın stafilokokların beta laktamaz geni olan blaZ'nin düzenlenmesinde görev yapan blaR1 ve blaI ile homolojisinin yüksek olması nedeniyle mecA regülatör genlerinin blaZ sisteminden alındığı düşünülmektedir. Ancak, beta laktam antibiyotiklerle karşılaşmadan sonra PBP2a'nın ekspresyonu (48 saate kadar uzayabilir) beta laktamaz (15 dakika içinde gerçekleşir) kadar hızlı ve güçlü bir biçimde indüklenemez. Bunun nedeni beta laktam antibiyotiklerin mecR1 geninin ürünü olan mecR1 membran reseptörünü etkin biçimde aktive edememeleridir. Bu nedenle mecA geni taşımaclarına karşı pre-MRSA adı verilen bazı suşlar metisiline duyarlı olabilirler. MecI veya mecA promotor/operatör bölgelerinde mutasyon veya delesyonu olan suşlarda ise, mecI'nın baskılaması ortadan kalkar ve konstitütif PBP2a sentezi gerçekleşir. Antibiyotik kullanımının seçici baskısına bağlı olarak seleksiyona uğrayan bu bakterilerde homojen veya heterojen metisilin direnç fenotipi gelişir. Homojen direnç fenotipinde koloniyi oluşturan mikroorganizmaların tümünde yüksek düzey

(MİK>128mg/L) metisilin direnci varken, heterojen fenotipte ise bakterilerin az bir kısmında (1/10 6) yüksek düzey metisilin direnci eksprese edilmektedir (47, 48, 49, 50, 51).

Günümüzde 11 tip SCCmec tanımlanmıştır (49). SCCmec Tip 1 bilinen ilk MRSA suşudur (Jevons suşu) ve diğer antibiyotiklere direnç geni bulundurmamaktadır. Tip 2 ve 3'ün özelliği ise çoklu ilaca dirençli olmaları ve özellikle hastane ortamından izole edilmeleridir. Tip 4 SCCmec tipik olarak toplumdan kazanılmış stafilokoklarda tanımlanmıştır. Boyutları hastane kökenlerinden daha küçüktür (yaklaşık 15 kb) ve çok sayıda antibiyotik direnç geni taşımadığından mobilize olması daha kolaydır (50, 51, 52).



Şekil 1 . SCCmec tipleri I-IV

MecA geninin ürünü, 76 kDa ağırlığında bir protein olan ve PBP2a ya da PBP2 adı verilen bir enzimdir. Bu yüksek molekül ağırlıklı transpeptidaz enzimi diğer PBP'ler gibi hücre duvarı peptidoglikanlarının çapraz bağlarının oluşumunu katalizler, ancak metisilin ve diğer beta laktam antibiyotiklere çok düşük afinite gösterir. Bu nedenle PBP2'ye sahip olan stafilokok kökenleri tüm beta laktam antibiyotiklere intrensek olarak dirençlidirler. PBP2'nin fonksiyon

görebilmesi için bazı substratlara gereksinimi vardır ve bu substratların oluşumunu etkileyen faktörler metisilin direncini etkileyebilir (46, 49).

Metisilin direnci fenotipik olarak üç şekilde ortaya çıkmaktadır;

a) Homojen direnç; kolonideki her bakterinin aynı ve yüksek derecede metisilin direnci göstermesi durumudur. Hepsinde de *mecA* geni vardır ve PBP2a sentezlenmektedir.

b) Heterojen direnç; klinikte daha sık görülmektedirler. Kolonideki tüm bakteriler *mecA* taşırlar ancak  $10^6$  ile  $10^8$  bakteriden birinde yüksek metisilin direncine rastlanmaktadır. Bu direnç indüklenebilir özelliktedir ve fem “factors essential for the expression of methicillin resistance” sisteminin neden olduğu düşünülmektedir.

c) Eagle-tip dirençte ise suşlar düşük metisilin konsantrasyonlarında metisiline duyarlı iken, yüksek konsantrasyonlarda dirençlidirler. Bu tip direncin, sağlam *mecA* regülatör genlerinin yüksek metisilin konsantrasyonlarında PBP2a sentezini indüklemeleri sonucu olduğu düşünülmektedir (61).

Bunun dışında aşırı miktarda  $\beta$ -laktamaz salgılanması sınırda (borderline) metisilin direncine neden olmaktadır. Metisilin  $\beta$ -laktamaz enzimine dayanıklıdır. Ancak, McDougal ve arkadaşları (63), metisiline direnç gelişimine aşırı miktarda  $\beta$ -laktamaz üretiminin de neden olabileceğini göstermişlerdir. Bu suşlar BORSA (Borderline resistant *S. aureus*) olarak adlandırılırlar (63). Klinik veriler, yapılan çalışmalar ve hayvan deneyleri *mecA* geni negatif ve PBP2a üretmeyen borderline rezistan suşların neden olduğu infeksiyonların,  $\beta$ -laktam antibiyotiklerle etkili bir şekilde tedavi edilebildiğini göstermiştir (72).

Ayrıca PBP’lerdeki yapısal değişiklikler; orta düzeyde metisilin direncine neden olmaktadır. Bu MRSA suşları  $\beta$ -laktamaz üretmezler ve *mecA* geni taşımazlar. Ancak metisiline dirençlidirler. Bu direnç türünün mekanizmasının, PBP’lerin yapısındaki mutasyonel değişikliklerle ilgili olduğu düşünülmektedir. Son yıllarda  $\beta$  -laktamaz negatif olup, *mecA* geni taşımadıkları halde, metisiline dirençli kökenler saptanmıştır. Bu izolatlarda, mevcut PBP’lerin B-laktam antibiyotiklere düşük afinite gösterdikleri görülmüştür. Bunun sonucu olarak bu tip dirençli suşlara MODSA (Modified resistant *S. aureus*) adı verilmektedir (64, 73). BORSA ve MODSA suşları genetik olarak MRSA suşlarından farklı olup klinik ve epidemiyolojik önemleri bilinmemektedir (74). Tedavi başarısızlıklarını engellemek için farklı BORSA suşlarına karşı beta-laktam doz stratejileriyle ilgili daha ileri araştırmalara ihtiyaç vardır (75).

Metisilin direncinde ‘‘fem faktörleri’’ adı verilen bir protein grubunu kodlayan genlerin de rol oynadığı düşünülmektedir. Bu genler, ‘‘factors essential for the expression of methicillin resistance’’ (fem) ya da ‘‘auxiliary’’ (aux) olarak tanımlanmışlardır ve mecA gen bölgesinden farklı bir bölgede yer almaktadır. Fem faktörleri 20 kadar proteini ifade eder. PBP2a’yı etkilememektedirler ancak çoğu peptidoglikan yapımında görev alır. Peptidoglikan zincirleri arasına glisin rezidüleri ekleyerek pentaglisin yapısını oluştururlar (65). Fem faktörlerinin enzimatik aktiviteleri vardır. Doğrudan ya da direkt olarak metisilin direncine etki ederler (66). Fem sitesindeki mutasyonlar, peptidoglikan yapının değişmesi ile sonuçlanmakta ve  $\beta$ -laktamaz ile metisilin direncini etkileyebilmektedir (67).

#### 2.7.2 Kinolon Direnci

Gram-negatif bakterilere karşı çok düşük MİK değerlerine sahip olan kinolonlar için gram pozitif bakterilerde MİK değerleri oldukça yüksektir ve terapötik doza yakındır. Sınırdaki aktif bu ilaçların MRSA gibi problemli gram pozitif bakterilerin tedavisinde kullanımı dirençli kökenlerin seçilmesini sağlamıştır. Kinolon direnci ilaç eflüks pompası norA ’nın fazla ekspresyonu ya da hedef topoizomera IV ve DNA girazdaki yapısal mutasyonlara bağlı olarak gelişmektedir (59).

#### 2.7.3 Makrolid-Linkozamid-Streptogramin Direnci (MLS)

*S. aureus* kökenlerinde en sık rastlanan MLS direnç mekanizmaları ribozom modifikasyonu ve ilaç eflüks pompası indüksiyonudur. Ribozom modifikasyonu ‘‘ erm geni’’ tarafından kodlanan 23S rRNA’ya metil gruplarının eklenmesi ile olur. Transpozon veya plazmid gibi mobil elementler üzerindedir ve bazı ilaçlar tarafından indüklenebilir. Sadece makrolidler iyi indükleyicilerdir, ancak bir kez indüklendikten sonra Linkozamid ve StreptograminB’lere de çapraz direnç gelişir. Hastane kaynaklı MRSA’larda MLSB direnci çok yüksek oranlarda (>%90) vardır (60).

#### 2.7.4 Aminoglikozidlere Karşı Direnç

Gentamisin, netilmisin ve tobramisin stafilokoklara karşı en aktif aminoglikozidlerdir. Rifampin gibi; aminoglikozidlerin de tek başlarına kullanımları, yüksek direnç gelişme riski nedeniyle kısıtlıdır.  $\beta$ -laktam antibiyotikler ve vankomisin ile sinerjistik etki göstermeleri nedeniyle birlikte kullanılmaları önerilmekle birlikte in vitro olarak sinerjistik etkileşim görülmesine rağmen in vivo olarak bu etki bilinmemektedir (68).

Bazı MRSA suşları aminoglikozid-modifiye edici enzimler üretmektedir. Tobramisin MRSA suşlarına etkisizdir. Çünkü mecA, yapısında tobramisin direncinden sorumlu aadD geni içermektedirler. Ayrıca gentamisine karşı plazmid kaynaklı direnç de yaygın olarak görülmektedir (68).

Aminoglikozid direnci ilaç molekülündeki amino grubunu asetilleyen asetiltransferazlar, hidroksil grubunu fosforile eden fosfotransferazlar veya hidroksil grubunu adenile eden nükleotidiltransferazlar aracılığıyla olur (69).

#### 2.7.5 Rifampin Direnci

Rifampin, oldukça potent ve bakterisidal bir antistafilokokal antibiyotiktir. RNA polimeraz enzimini inhibe ederek protein sentezini bozar. Diğer antibiyotiklerin daha az ulaşabildikleri doku ve abselere iyi dağılım gösterir. Ancak tek başına kullanıldığında RNA polimerazın B-alt grubunda noktasal mutasyonlar sonucu yüksek seviyede direnç gelişimi görülebilmektedir. Bu nedenle stafilokok infeksiyonlarında rifampinin tek başına kullanımı önerilmemektedir. Stafilokokal prostetik kalp kapağı endokarditlerinde nafsilin ve vankomisin tedavi protokolünün bir komponenti olarak kullanılması önerilmemektedir. Ayrıca vankomisine cevap alınamayan MRSA infeksiyonlarında benzer tedavi protokollerine ek olarak kullanılabileceği rapor edilmiştir, ancak rifampinin bu kullanımıyla ilgili fazla bilgi yoktur (70, 71).

#### 2.7. 6 Glikopeptid Direnci

Metisiline dirençli stafilokok, *Clostridium difficile* ve enterokok infeksiyonlarının tedavisinde artan glikopeptid kullanımı son yıllarda vankomisine dirençli stafilokokların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Vankomisine karşı duyarlılık azalması ilk olarak daha az virülen olduğu düşünülen koagülaz negatif stafilokoklarda bildirilmiştir (53).

1997 yılında ilk olarak Japonya'dan Hiramatsu ve arkadaşları tarafından SA-VRS suşu bildirilmiştir. MİK değeri 8 µg/ml olan bu suş ilk VISA (vankomisine orta düzeyde duyarlı *S. aureus*) olarak literatürde yerini almıştır (54). Bu olgu bildirimini Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Japonya, Fransa, İngiltere ve Almanya'dan bildirilen VISA'lar izlemiştir. Bu suşların ortak özellikleri hepsinin MRSA olması ve klonal olmamalarıdır (55). VISA suşlarında orta düzey glikopeptid direnci, peptidoglikan duvar yapısını etkileyen kromozomal mutasyonlardan kaynaklanır. Bu suşlarda hücre duvarı daha kalın ve düzensizdir. Çapraz bağ

sayısı azalmış ve vankomisini bağlayabilecek serbest D-Ala-D-Ala kalıntısı artmıştır. Buna ilaveten VISA'lar glikopeptid tedavisine yanıtızsızlığa yol açabilmektedirler (56, 57).

VRSA (vankomisine dirençli *S. aureus*) suşları yayılım ve direnç açısından VISA'lardan farklıdır. VISA'lardaki kromozal dirençten farklı olarak VRSA suşlarında direnç *Enterococcus faecalis*'teki vanA operonunun konjugal transferi sonucu gelişmiştir. İlk VRSA vakasında hastanın infekte kronik bacak ülserinden VRSA ile birlikte vankomisine dirençli enterokok (VRE) izole edilmiştir. Bu suşta vanA ve mecA genleri tespit edilmiştir. VanA tipi dirençte mekanizma terminal peptiddeki D-Ala-D-Ala'nın yerini D-Ala-D-Lac'ın alması ve vankomisin bu yapıya bağlanamamasıdır. VRSA'lardaki vankomisin MİK değeri  $\geq 128$  µg/ml olarak bildirilmektedir (58).

Metisiline dirençli SA epidemiyolojisi ve MRSA klonları arasındaki evrimsel ilişkinin daha iyi anlaşılması için moleküler tiplendirme metodları çalışmalarda artan sıklıkta kullanılmaktadır. mecA genini belirlemede polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) altın standart olarak kabul edilmektedir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Çalışmaya alınan suşlar

Ocak 2009 – Ekim 2014 tarihleri arasında, Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarında poliklinik ve yatan hastaların kan, yara, apse, biyopsi, BOS, steril vücut sıvıları (periton, plevra, perikard, sinoviyal), balgam, bronkoalveoler lavaj, trakeal aspirat ve idrar gibi çeşitli klinik örneklerinden izole edilen, Triptik Soy Broth besiyerinde -80 °C'de stoklanan toplam 179 *S. aureus* suşu çalışmaya dahil edildi.

#### 3.2. *S. aureus* suşlarının üretimi ve saklanması

Çalışmanın başlangıcında Triptik Soy Agar besiyerinde stoklanmış olan *S. aureus* suşları kanlı agara ekilip 35°C'de 24 saat inkübe edilerek yeniden saf kültür elde edildi. Koloni morfolojisi, Gram boyama, katalaz ve koagülaz testleriyle, suşların *S. aureus* oldukları doğrulandı ve şüpheli suşlar çalışmadan çıkarıldı. *S. aureus* olduğu doğrulanan suşlar, Triptik Soy Broth besiyerine alınarak -20 °C'de saklandı.

### Katalaz testi

Bir lam üzerine bir iki damla % 3'lük hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) damlatıldı. Kanlı agar besiyerinde üretilen *S. aureus* kolonileri besiyeri yüzeyinden, besiyerine dokunulmaksızın plastik öze yardımıyla dikkatlice alınarak karıştırıldı. Katalaz enzimine sahip olan bakterilerin hidrojen peroksitten su ve oksijen oluşturması sonucunda gaz kabarcıkları gözlemlendi (19,24).

### Koagülaz testi

*S. aureus*'un diğer stafilocoklardan ayırt edilmesinde kullanılan en önemli testtir. Koagülaz deneyi tüp ve lam şeklinde iki temel yöntem ile yapılır. Bu çalışmada tüp koagülaz yöntemi kullanıldı. Bu yöntem uluslararası alt komite tarafından önerilen standartlar doğrultusunda aşağıdaki sıra takip edilerek yapıldı.

- 1- Bir deney tüpü içerisinde serum fizyolojik ile 1/5 oranında sulandırılmış plazma konuldu.
- 2- Kanlı agar besiyerinde 24 saatlik inkübasyon sonrasında üremiş bir koloni, öze ile alınıp plazma içerisinde ezilerek emülsifiye edildi.
- 3- Tüpler 35 °C'de inkübasyonda tutulurken 4'üncü saate kadar her yarım saatte bir pıhtı oluşup oluşmadığına bakıldı. Pıhtı oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirildi.
- 4- İlk 4 saat sonunda pıhtı oluşmayan tüpler bir gece oda ısısında bekletildikten sonra yeniden okundu. Bu süre içerisinde de koagülasyon vermeyen suşlar koagülaz negatif olarak kabul edildi (24).

### **3.3 Disk diffüzyon yöntemi**

Rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında en çok kullanılan antibiyotik duyarlılık yöntemidir. Yöntemin temeli, standart ve birçok bakterinin üreyebildiği Mueller-Hinton Agar besiyeri yüzeyine yayılarak yapılan ekim üzerine yine standart olarak hazırlanmış ve çeşitli antibiyotikler emdirilip kurutulmuş, kuru disklerin yerleştirilmesi ve 35 °C'de bir gecelik inkübasyondan sonra disk etrafında oluşan inhibisyon zonlarının ölçülmesiyle mikroorganizmaların antibiyotiklere duyarlılığının test edilmesine dayanır (24).

Bu çalışmamızda izole edilen *S. aureus* suşlarında metisilin direncinin incelenmesi için sefoksitin duyarlılıkları bir disk diffüzyon yöntemi olan Kirby-Bauer yöntemi ile gerçekleştirildi. Bakteri süspansiyonu, CLSI (2014) önerileri doğrultusunda 24 saatlik bakteri kültüründen %0.9'luk NaCl içinde 0.5 McFarland ( $1 \times 10^8$  CFU/ml) bulanıklığına eşit olacak

şekilde, direkt koloni süspansiyonu yöntemi ile hazırlandı ve 4 mm kalınlığındaki Mueller-Hinton agar besiyeri yüzeyine eküvyon yardımıyla yayıldı. Besiyeri yüzeyi kuruduktan sonra sefoksitin (30µg) (Oxoid, İngiltere) diskleri yerleştirildi. Mueller-Hinton agar besiyerinde 35 °C’de 24 saatlik inkübasyondan sonra disklerin zon çapları ölçüldü. Disk diffüzyon testlerinin değerlendirilmesinde sefoksitin için dirençli ve duyarlı zon çapları sırasıyla  $\leq 21$  mm ve  $\geq 22$  mm olarak kabul edildi (68). Ayrıca klindamisin, eritromisin, gentamisin, levofloksasin, rifampin, tetrasiklin, TMP/SXT, nitrofurantoin, rifampin, linezolid, teikoplanin ve vankomisin duyarlılıkları da tespit edildi. Kalite kontrol suşu olarak *S. aureus* ATCC 25923 kullanıldı.

### **3.4. BD Phoenix 100 (Becton Dickinson, ABD) otomatize sistem ile değerlendirme**

Bakteri identifikasyonunda kullanılan Phoenix ID panelleri klasik metodların modifikasyonuna dayanan testlerden oluşmaktadır. Bu testler, substratların fermentasyon, oksidasyon, degradasyon ve hidrolizini içermektedir. Phoenix otomatize sistemi bakteri tanımlamasında tek karbon kaynağı substratları kullandığı gibi kromojenik ve florojenik substratları da kullanmaktadır. Oluşan substrat reaksiyon profiline göre Phoenix veri tabanının oluşturduğu organizma tanımlaması ve doğruluk yüzdeleri sonuç raporuna yansıtılır. Antibiyotik duyarlılığının belirlenmesinde ise broth mikrodilüsyon yöntemini baz alan Phoenix AST panelleri kullanılmaktadır. Bu sistemde antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi antimikrobiyal ajanın çift kat dilüsyonlu farklı konsantrasyonlarında bakteriyel üremenin olup olmamasına göre yapılır. Duyarlılık raporunda, elde edilen MİK değerleri ile kategorik uyum sonuçları duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak verilir.

Çalışmamızda Phoenix sistemi ile değerlendirme, üretici firmanın (talimatları doğrultusunda yapıldı:

- Her bir örnek için Phoenix ID Broth tüpü etiketlendi.
- Kanlı agar besiyerinde 18-24 saatte üremiş aynı morfolojideki koloniler, aseptik olarak steril eküvyonlu çubuk ile alınarak Phoenix ID Broth içerisine aktarıldı.
- Tüp kapatılarak 5 saniye vortekslendi.
- Hava kabarcıklarının yüzeye çıkması için 10 saniye beklendi.

- Tüp, PhoenixSpec (BD, ABD) nefelometreye yerleştirildi ve 0.5 McFarland bulanıklığa ayarlandı. Bakteri süspansiyonunun yoğunluğu düşükse izole edilen kolonilerden eklendi ve tekrar bulanıklık ölçüldü. ID Broth içerisinde standart hale getirilmiş bakteri süspansiyonu, hazırlandıktan sonra 60 dakika içerisinde kullanıldı.
- Hastanın Phoenix AST Broth tüpü etiketlenip içerisine 1 damla AST indikatör solüsyonu eklendi ve alt-üst edilerek karıştırıldı. AST indikatör solüsyonu ışıktan etkilendiğinden, solüsyona indikatör eklenmesinden sonraki iki saat içinde kullanıldı.
- Bir pipet yardımıyla 25 µl standardize bakteri süspansiyonu ID tüpünden AST Broth'una aktarıldı
- AST tüpü kapağı kapatılıp birkaç kez çevrilerek karıştırıldı. Hava kabarcıklarının yüzeye çıkması için birkaç saniye beklendi.
- ID Broth tüpünün tamamı panelin ID tarafındaki, AST Broth tüpü ise AST Broth tarafındaki doldurma yuvasına boşaltıldı ve panel kapağı sıkıca kapatıldı.
- Paneller inokülasyondan sonraki 30 dakika içerisinde cihaza yerleştirildi.
- İnkübasyon tamamlandıktan sonra örneklerle ait tür tanımlaması ve duyarlılık raporları alındı. Elde edilen oksasilin MİK değerlerinin  $\leq 0,5$  µg/ml olanlar MSSA ve  $> 2$  µg/ml olanlar MRSA olarak kabul edildi.

### **3.5. Moleküler Yöntem**

Multiplex PZR ile spa, mecA, mecC ve PVL gen bölgelerinin saptanması:

Çalışmamızda Stegger ve ark.'nın (168) çalışmalarında uyguladığı multiplex PZR yöntemini kullandık.

#### **DNA Eldesi ( Ekstraksiyon**

DNA elde etmek için Instagene Matrix (Biorad®, ABD) ekstraksiyon kiti kullanıldı. Protokol şu şekilde gerçekleştirildi:

- 24 saat inkübasyondan sonra üremiş olan S.aureus kolonilerinden 2-3 koloni alınıp, 1,5 ml'lik ependorf tüpüne konulmuş olan 100 µl lizis buffera (InstaGene Matrix, Biorad®) eklendi.
- 15 saniye vortekslendikten sonra 56°C'de 1 saat ısı bloğunda ısıtıldı.

- Yeniden vortekslenerek iyice karışması sağlandıktan sonra 95 °C’de 1 saat daha ısı bloğunda inkübe edildi.
- Sonra vortekslenip 13200 rpm’de 5 dakika santrifüjlendi.
- Üstte kalan süpernatant DNA örneği olarak kullanılmak üzere -20°C’de saklandı.
- DNA süspansiyonu PZR yapılacağı zaman, yeniden vortekslenip 13200 rpm’de 5 dakika santrifüj edildikten sonra kullanıldı.

#### PZR Kontrol Suşları

mecA(-) *S. aureus* ATCC 29213

mecA (+) *S.aureus* ATCC 49476

mecC (+) *S.aureus* ATCC 13552

PVL (+) *S.aureus* ATCC 49775

#### **Tablo 1. Multipleks PZR’da Kullanılan Primerler**

| <u>Primer adı</u>  | <u>Sekans</u>                         |
|--------------------|---------------------------------------|
| spa-1113F          | 5’ – TAAAGACGATCCTTCGGTGAGC – 3’      |
| spa-1514R          | 5’ – CAGCAGTAGTGCCGTTTGCTT – 3’       |
| mecA P4            | 5’ – TCCAGATTACAACCTTCACCAGG – 3’     |
| mecA P7            | 5’ – CCACTTCATATCTTGTAACG – 3’        |
| pvl-F              | 5’ – GCTGGACAAAACCTTCTTGGAATAT – 3’   |
| pvl-R              | 5’ – GATAGGACACCAATAAATTCTGGATTG – 3’ |
| mecALGA251 MultiFP | 5’ – GAAAAAAAGGCTTAGAACGCCTC – 3’     |
| mecALGA251 MultiRP | 5’ – GAAGATCTTTTCCGTTTTCAGC – 3’      |

#### Primer Karışımlarının Hazırlanması

a) Primermix-1 spa/mecA/mecALGA251/PVL Forward primerleri:

1. 900 µL H<sub>2</sub>O

2. 25 µL spa-1113F (100 µM)
3. 25 µL mecA-P4 (100 µM)
4. 25 µL PVL-F (100 µM)
5. 25 µL mecALGA251 MultiFP (100 µM)

b) Primermix-2 spa/mecA/mecALGA251/PVL Reverse primerleri:

1. 900 µL H<sub>2</sub>O
2. 25 µL spa-1514R(100 µM)
3. 25 µL mecA-P7 (100 µM)
4. 25 µL PVL-R (100 µM)
5. 25 µL mecALGA251 MultiRP (100 µM)

#### Master Mix Hazırlanması

Çalışmamızda master mix olarak, referans aldığımız yayında da belirtildiği gibi PZR ürününün, amplifikasyondan sonra direkt olarak jel elektroforezine yüklenebilmesini sağlayan DreamTaq™ Green PZR Master Mix (Thermo Scientifi ) markasını kullandık. Aşağıdaki tablo Master Mix hazırlama protokolünü göstermektedir.

**Tablo 2. Master Mix hazırlama protokolü**

| Solüsyon               | Miktar (1x) | Miktar (10x) |
|------------------------|-------------|--------------|
| PCR H <sub>2</sub> O   | 6,5 µl      | 65 µl        |
| 2xGreen PCR Master Mix | 12,5 µl     | 125 µl       |
| Primermix-1            | 2 µl        | 20 µl        |
| Primermix-2            | 2 µl        | 20 µl        |
| Total volüm            | 23 µl       | 230 µl       |

#### Amplifikasyon

Hazırlanan master mixten 23'er µl PZR tüplerine (mikrotüp) dağıtıldı. Her tüpe 2 µl ekstrakte edilen DNA ürünü konulup amplifikasyon işlemi için termal cyclor cihazına (Gene Amp PCR

System9700, Applied Biosystems) yerleştirildi ve aşağıda belirtilen şartlarda sıcaklık döngüsüne tabi tutuldu.

Sıcaklık döngüleri;

Denatürasyon 94° C' de 5 dakika 1 döngü

|              |                      |            |
|--------------|----------------------|------------|
| Denatürasyon | 94° C' de 30 saniye, | } 30 döngü |
| Bağlanma     | 58° C' de 1 dakika,  |            |
| Uzama        | 72° C' de 1 dakika   |            |

Final uzama 72° C' de 10 dakika 1 döngü

#### PZR ürününün agaroz jelde yürütülmesi

- Kullanılacak elektroforez tankının büyüklüğüne göre dökülecek jel miktarı belirlendi. 40 ml'lik tank için 1.2 gr agaroz, 90 ml'lik tank için 2.7 gr tartılıp üzerine 40 ml 0.5xTBE tamponu ilave edilerek %2'lik bir agaroz jel hazırlandı.
- Hazırlanan karışım mikrodalga fırında eritilerek soğumaya bırakıldı. 50 °C civarına kadar soğuyan agaroz her 10 ml ye 1.5 µl olacak şekilde ethidium bromide eklendi.
- Agaroz jelin döküleceği plate dengeli olacak şekilde hazırlanıp yürütülecek PZR ürünü sayısına bağlı olarak 8 'li, 12 'li veya 20'li tarak yerleştirildi.
- Agaroz jel plate üzerine dökülüp donması beklendi. Jel donduktan sonra platenin iki yanındaki lastikler ve taraklar dikkatli şekilde çıkartıldı. Agaroz jel, elektroforez tankına yerleştirildikten sonra üzerine kaplayacak şekilde tampon olarak 0.5x TBE buffer (Tris, Borik asit ve EDTA) ilave edildi.
- Her bir PZR ürününden 8-10 µl sırayla agaroz jele yüklendi. Ayrıca molekül büyüklükleri bilinen DNA marker (GeneRuler DNA Ladder 100bp) örneklerle karşılaştırma yapabilmek için jelin bir yuvasına yerleştirildi. 130 voltta 60 dakika elektroforez uygulandı.
- Elektroforez bittikten sonra jel bilgisayar destekli jel görüntüleme cihazında analiz edildi. Her bir PZR çalışmasında yer alan pozitif kontrollerin çalıştığı görüldükten sonra suşlarla ilgili değerlendirme yapıldı. Oluşan bantların fotoğrafları çekildi ve moleküler ağırlıkları kaydedildi.

#### Sonuçların Değerlendirilmesi

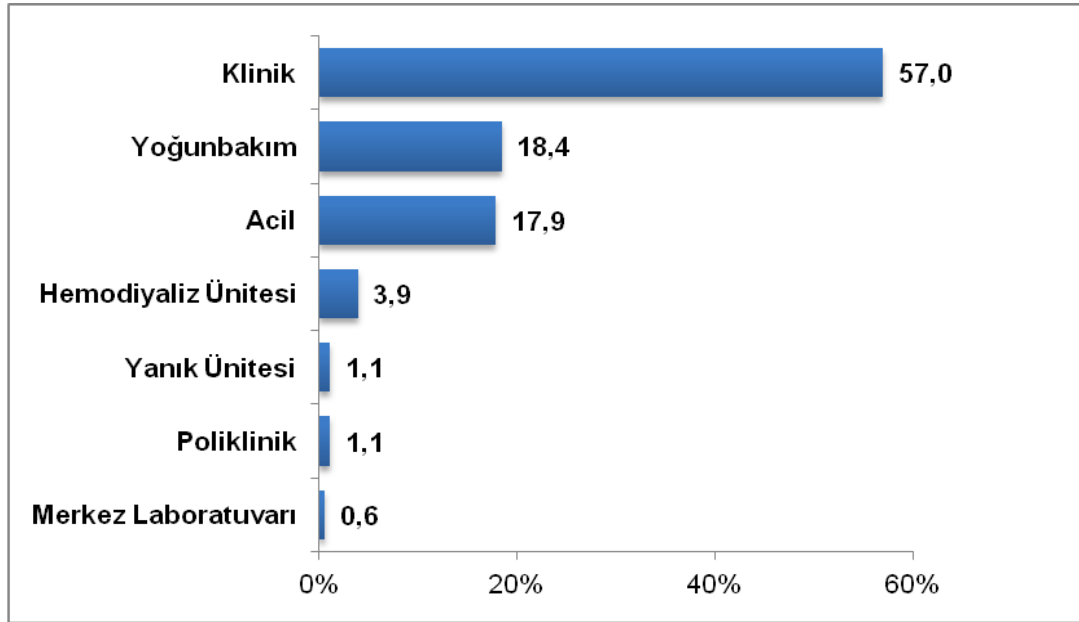
- Elde edilen 162 bç'lik DNA fragmentleri mecA geni pozitif, 138 bç'lik DNA fragmentleri mecC geni pozitif, 85 bç'lik DNA fragmentleri PVL geni pozitif olarak değerlendirildi.
- 180 bç ile 600 bç arasında suşa göre farklı büyüklüklerde oluşan DNA fragmentleri ise spa geni olarak değerlendirildi. Bu şekilde suşların *S.aureus* oldukları aynı moleküler yöntem içerisinde kanıtlandı.

### İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için SPSS 15.0 for Windows programı kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler; kategorik değişkenler için sayı ve yüzde olarak verildi. Kategorik değişkenlerin gruplar arasındaki bağımlı oranları Mc Nemar Analizi ile, bağımsız oranları Ki kare Analizi ile test edildi. Uygulana protokollerin uyumu Kappa katsayısı ile verildi. Testlerin etkinliği; duyarlılık; gerçekte pozitif olanlar arasında testin pozitif sonuç verme oranı, seçicilik; gerçekte negatif olanlar arasında testin negatif sonuç verme oranı, pozitif sonucun kestirim değeri; test hasta pozitif dediğinde, gerçekten pozitif olma olasılığı, negatif sonucun kestirim değeri; test negative dediğin de gerçekte negatif olma olasılığı, doğruluk; testin pozitif ve negative olarak toplam doğru oranı, pozitif olabilirlik oranı; bir testin pozitifte pozitif çıkma olasılığının, negatifte pozitif çıkma olasılığına oranı, negatif olabilirlik oranı; bir testin pozitifte negatif çıkma olasılığının, negatifte negatif çıkma olasılığına oranı olarak incelendi. İstatistiksel alfa anlamlılık seviyesi  $p<0,05$  olarak kabul edildi.

## **4. BULGULAR**

Çalışmaya 91'i MRSA 88'i MSSA olmak üzere toplam 179 *S.aureus* suşu dahil edildi. Kültürlerin %57'si kliniklerden (n=102), %18,4'ü (n=33) yoğun bakımlardan, %17,9'u (n=32) acilden, %3,9'u (n=7) hemodiyaliz ünitesinden, %1,1'i (n=2) yanık ünitesinden, %1,1'i (n=2) poliklinikten, %0,6'sı (n=1) merkez laboratuvarından geldi.



**Şekil 2.** *S.aureus* üreyen kültürlerin geldiği servislere göre dağılımı

Kültürlerin %26,3'ü kan, %20,7'si yara sürüntüsü, %14,0'ü abse, %8,4'ü bronkoalveolar lavaj, %8,4'ü idrar, %5,6'sı biopsi, %3,9'u kateter, %3,9'u trakeal aspirat, %3,9'u balgam, %3,4'ü BOS, %1,1'i sinovyal sıvı, %0,6'sı periton sıvısıydı.

**Tablo 3.** *S.aureus* üreyen kültürlerin örnek türlerine göre dağılımı

|                      | N  | Yüzde |
|----------------------|----|-------|
| Kan                  | 47 | 26,3  |
| Yara Sürüntüsü       | 37 | 20,7  |
| Abse                 | 25 | 14,0  |
| Bronkoalveolar Lavaj | 15 | 8,4   |
| İdrar                | 15 | 8,4   |
| Biopsi               | 10 | 5,6   |
| Kateter              | 7  | 3,9   |
| Trakeal Aspirat      | 7  | 3,9   |
| Balgam               | 7  | 3,9   |
| BOS                  | 6  | 3,4   |
| Sinovyal Sıvı        | 2  | 1,1   |
| Periton Sıvısı       | 1  | 0,6   |

**Tablo 4.** MRSA ve MSSA izolatlarının servislere göre sayı ve yüzdeleri

|                                     | mec A |       |      |       |
|-------------------------------------|-------|-------|------|-------|
|                                     | MRSA  |       | MSSA |       |
|                                     | N     | Yüzde | N    | Yüzde |
| Erişkin Yoğun Bakım Ünitesi         | 10    | 11,0  | 6    | 6,8   |
| Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği    | 8     | 8,8   | 8    | 9,1   |
| Acil Tıp Kırmızı Alan               | 6     | 6,6   | 7    | 8,0   |
| Çocuk Kliniği                       | 6     | 6,6   | 7    | 8,0   |
| Reanimasyon                         | 9     | 9,9   | 0    | 0,0   |
| Büyük Enfeksiyon Kliniği            | 3     | 3,3   | 5    | 5,7   |
| Plastik, Rekonst Ve Estetik Cerrahi | 3     | 3,3   | 5    | 5,7   |
| Yeni Doğan Yoğun Bakım              | 3     | 3,3   | 5    | 5,7   |
| Acil Tıp Sarı Alan                  | 2     | 2,2   | 6    | 6,8   |
| Genel Cerrahi Kliniği               | 4     | 4,4   | 3    | 3,4   |
| Hemodiyaliz Ünitesi                 | 3     | 3,3   | 4    | 4,5   |
| Nefroloji Kliniği                   | 3     | 3,3   | 4    | 4,5   |
| K.B.B Kliniği                       | 4     | 4,4   | 2    | 2,3   |
| Çocuk Cerrahisi Kliniği             | 4     | 4,4   | 1    | 1,1   |
| Beyin Cerrahi Yoğun Bakım           | 4     | 4,4   | 0    | 0,0   |
| Nöroloji Kliniği                    | 3     | 3,3   | 1    | 1,1   |
| Çocuk Gastro Kliniği                | 2     | 2,2   | 2    | 2,3   |
| Dahiliye Kliniği                    | 2     | 2,2   | 2    | 2,3   |
| Acil Çocuk Polikliniği              | 0     | 0,0   | 4    | 4,5   |
| Acil Tıp Polikliniği                | 3     | 3,3   | 0    | 0,0   |
| Çocuk Nefroloji Kliniği             | 1     | 1,1   | 2    | 2,3   |
| Yanık Ünitesi                       | 2     | 2,2   | 0    | 0,0   |
| Üroloji                             | 1     | 1,1   | 1    | 1,1   |
| Çocuk Hematoloji Kliniği            | 0     | 0,0   | 2    | 2,3   |
| Radyasyon Onkolojisi Kliniği        | 0     | 0,0   | 2    | 2,3   |
| Acil Çocuk Cerrahi Polikliniği      | 1     | 1,1   | 0    | 0,0   |
| Acil Dahiliye Polikliniği           | 1     | 1,1   | 0    | 0,0   |
| Acil Ortopedi Polikliniği           | 1     | 1,1   | 0    | 0,0   |
| Cerrahi Yoğun Bakım                 | 1     | 1,1   | 0    | 0,0   |
| Cildiye                             | 1     | 1,1   | 0    | 0,0   |
| Acil Tıp Yeşil Alan                 | 0     | 0,0   | 1    | 1,1   |
| Çocuk Enfeksiyon Yandal Polikliniği | 0     | 0,0   | 1    | 1,1   |
| Çocuk Göğüs Hastalıkları Kliniği    | 0     | 0,0   | 1    | 1,1   |
| Çocuk Onkoloji Kliniği              | 0     | 0,0   | 1    | 1,1   |
| Çocuk Yoğun Bakım Ünitesi           | 0     | 0,0   | 1    | 1,1   |
| Gastroentoloji Kliniği              | 0     | 0,0   | 1    | 1,1   |
| Koroner Yoğun Bakım                 | 0     | 0,0   | 1    | 1,1   |
| Merkez Laboratuvar                  | 0     | 0,0   | 1    | 1,1   |
| Periton Diyaliz Polikliniği         | 0     | 0,0   | 1    | 1,1   |

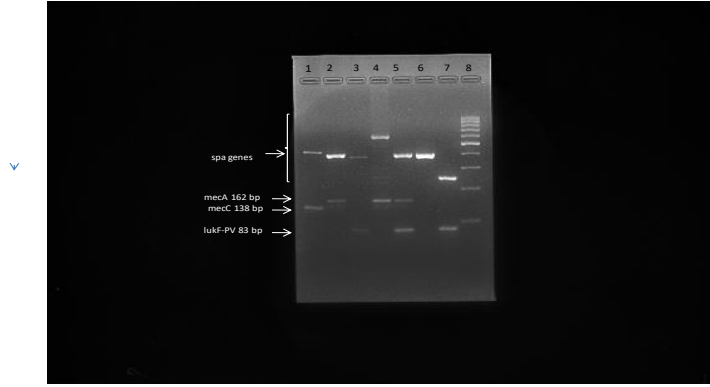


**Fig. 1:** *spa*, *mecA*, *mecC* ve *PVL* gen bölgelerini gösteren UV ışık altında görülen agaroz jel elektroforez fotoğrafı

Kolon 1: *mecC* (+) *S. aureus* CCUG 63582 ( 138 bç)

Kolon 2: *mecA* (+) *S. aureus* ATCC 49476 (162 bç)

Kolon 3: *PVL* (+) *S. aureus* ATCC 49775 (85 bç)

Kolon 4: *mecA*(+) *S. aureus*

Kolon 5: *mecA*(+), *PVL*(+) *S. aureus*

Kolon 6: *mecA*(-) *S. aureus*

Kolon 7: *mecA*(-), *PVL*(+) *S. aureus*

Kolon 8: 100 bp DNA marker

mecA/mecC gen varlığı baz alındığında izolatların % 50,8'i (n=91) MRSA, % 49,2'si (n=88) MSSA idi. Sefoksitin Disk Diffüzyon (SDD) sınıflaması mecA/mecC ile tam uyumluydu (Kappa=1,000). Phoenix sistemi MRSA/MSSA ayırımında 6 izolatta (% 3,4) yanlış sonuç verdi. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı (p=0,031 Kappa=0,933). mecA/mecC geni varlığına göre yöntemlerin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif yorumlama gücü değerleri sefoksitin disk diffüzyon yöntemini için tamamı % 100 bulunurken; Phoenix otomatize sistemin bu değerleri sırasıyla % 100, % 93.2, % 93.8 ve % 100 olarak bulundu (Tablo 6).

**Tablo 5. Sefoksitin Disk Diffüzyon (SDD) ve Phoenix ile belirlenen MRSA-MSSA sayı ve yüzdeleri**

|         |      | mecA/ mecC PZR |      |      |     |       |       |
|---------|------|----------------|------|------|-----|-------|-------|
|         |      | MRSA           |      | MSSA |     |       |       |
|         |      | N              | %    | N    | %   | p     | Kappa |
| SDD     | MRSA | 91             | 100  | 0    | 0,0 | 1,000 | 1,000 |
|         | MSSA | 0              | 0,0  | 88   | 100 |       |       |
| Phoenix | MRSA | 91             | 93,8 | 6    | 6,2 | 0,031 | 0,933 |
|         | MSSA | 0              | 0,0  | 82   | 100 |       |       |

**Tablo 6. SDD ve Phoenix için Duyarlılık, Özgüllük, PKD ve NKD değerleri**

|                | Duyarlılık | Özgüllük | PKD   | NKD   | Doğruluk | LR(+)  | LR(-) |
|----------------|------------|----------|-------|-------|----------|--------|-------|
| <b>SDD</b>     | 1,000      | 1,000    | 1,000 | 1,000 | 1,000    | -      | -     |
| <b>Phoenix</b> | 1,000      | 0,932    | 0,938 | 1,000 | 0,966    | 14,706 | 0,000 |

Çalışmaya alınan 179 *S. aureus* içerisinde 6 tane MRSA ve 6 tane MSSA suşunda olmak üzere toplam 12 adet PVL pozitif suş tespit edildi. MRSA izolatları apse, yara ve biyopsi olmak üzere deri ve yumuşak doku örneklerinden elde edilmişti. MRSA'lar içindeki altı örnek her bir bölümden birer tane olmak üzere ortopedi, KBB, genel cerrahi, çocuk

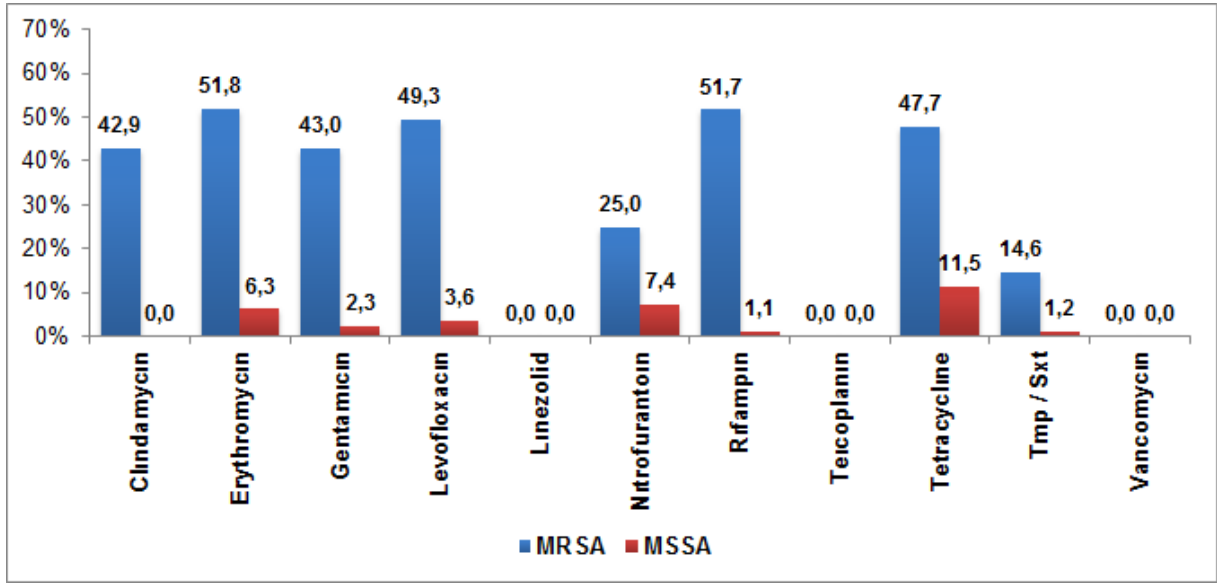
cerrahisi, çocuk onkoloji ve çocuk enfeksiyon hastalıkları servislerinden gelmişti. PVL (+) MSSA'lar ise KBB, enfeksiyon hastalıkları, ortopedi, plastik cerrahi ve çocuk enfeksiyon hastalıkları polikliniklerinden gelen deri ve yumuşak doku örneklerinden izole edilmişti. Bu verilere göre MRSA lar içinde PVL pozitiflik oranı % 6.5, MSSA'lar içinde ise % 7.4 olarak saptandı.

MRSA ve MSSA suşlarının hiçbirinde mecC genine sahip suş tespit edilmedi.

MSSA ve MRSA suşlarında gentamisine direnç sırasıyla % 2 ve % 37, tetrasikline % 11 ve % 48, levofloksasine % 4 ve % 49, trimetoprim/sülfametoksazole % 1 ve % 15, eritromisine % 6 ve % 52 olarak bulundu. MRSA ve MSSA gruplarında klindamisin, eritromisin, gentamisin, levofloksasin, rifampin, tetrasiklin ve TMP/SXT rezistans oranlarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. MRSA grubunda antibiyotiklerde rezistans oranı yüksekti. Vankomisin ve linezolid direnci saptanmadı (Tablo 7).

**Tablo 7. MRSA ve MSSA izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları**

|                |   | Toplam |       | MRSA |       | MSSA |       | p      |
|----------------|---|--------|-------|------|-------|------|-------|--------|
|                |   | N      | Yüzde | N    | Yüzde | N    | Yüzde |        |
| Klindamisin    | R | 33     | 21,2  | 33   | 42,9  | 0    | 0,0   | <0,001 |
|                | S | 121    | 77,6  | 44   | 57,1  | 77   | 97,5  |        |
|                | I | 2      | 1,3   | 0    | 0,0   | 2    | 2,5   |        |
| Eritromisin    | R | 49     | 29,9  | 44   | 51,8  | 5    | 6,3   | <0,001 |
|                | S | 112    | 68,3  | 41   | 48,2  | 71   | 89,9  |        |
|                | I | 3      | 1,8   | 0    | 0,0   | 3    | 3,8   |        |
| Gentamisin     | R | 39     | 22,7  | 37   | 43,0  | 2    | 2,3   | <0,001 |
|                | S | 131    | 76,2  | 49   | 57,0  | 82   | 95,3  |        |
|                | I | 2      | 1,2   | 0    | 0,0   | 2    | 2,3   |        |
| Levofloksasin  | R | 39     | 24,8  | 36   | 49,3  | 3    | 3,6   | <0,001 |
|                | S | 118    | 75,2  | 37   | 50,7  | 81   | 96,4  |        |
| Linezolid      | R | 0      | 0,0   | 0    | 0,0   | 0    | 0,0   | 1,000  |
|                | S | 169    | 98,8  | 83   | 98,8  | 86   | 98,8  |        |
|                | I | 2      | 1,2   | 1    | 1,2   | 1    | 1,2   |        |
| Nitrofurantoin | R | 10     | 16,9  | 8    | 25,0  | 2    | 7,4   | 0,092  |
|                | S | 49     | 83,1  | 24   | 75,0  | 25   | 92,6  |        |
| Rifampin       | R | 46     | 26,4  | 45   | 51,7  | 1    | 1,1   | <0,001 |
|                | S | 128    | 73,6  | 42   | 48,3  | 86   | 98,9  |        |
| Teikoplanin    | R | 0      | 0,0   | 2    | 3,6   | 0    | 0,0   | -      |
|                | S | 106    | 97,2  | 54   | 96,4  | 50   | 100   |        |
| Tetrasiklin    | R | 40     | 28,0  | 31   | 47,7  | 9    | 11,5  | <0,001 |
|                | S | 103    | 72,0  | 34   | 52,3  | 69   | 88,5  |        |
| TMP/SXT        | R | 13     | 7,8   | 12   | 14,6  | 1    | 1,2   | 0,001  |
|                | S | 154    | 92,2  | 70   | 85,4  | 84   | 98,8  |        |
| Vankomisin     | R | 0      | 0,0   | 0    | 0,0   | 0    | 0,0   | -      |
|                | S | 165    | 100,0 | 78   | 100,0 | 87   | 100,0 |        |



Şekil 4. MRSA ve MSSA gruplarında antibiyotik direnç oranları

## 5. TARTIŞMA

*Staphylococcus aureus*, intrinsek virulansı, yaşamı tehdit edici infeksiyonlara neden olabilmesi ve çevresel koşullara üstün adaptasyon yeteneğiyle en çok ilgi çeken patojenlerden biri olma özelliğini korumaktadır. Nozokomiyal infeksiyonların en başta gelen sebepleri arasında yer alan *S. aureus* toplum kökenli infeksiyonlarda da her geçen gün daha fazla yer edinmektedir (76). Bu mikroorganizmanın 1944 yılında penisilinaz yapımıyla başlayan antibiyotiklere karşı direnç geliştirme mekanizması, günümüzde birçok antibiyotiğe karşı da gelişmiş olup artık endişe verici boyuta ulaşmıştır. Özellikle metisiline dirençli stafilokok enfeksiyonlarında yaygın olarak kullanılan glikopeptitlere karşı gelişmiş olan direnç bildirimleri de olayın ciddiyetini açıkça göstermektedir. Bu noktada stafilokoklar çoklu antibiyotik direnci gösteren tedavileri zor olan “sorunlu” mikroorganizmalar konumundadır (77). MRSA suşlarının etken olduğu infeksiyonların morbidite ve mortalitesinin yüksek olması ve yüksek ek maliyet olmak üzere birçok problemi beraberinde getirmesi, çoklu antibiyotik direnci gösteren stafilokokların prevalansının hemen her ülkede izlenmesine ve konuya ilişkin çok merkezli çalışma programlarının düzenlenmesine neden olmuştur (35).

Bunun için sanayileşmiş ülkeler başta olmak üzere birçok ülke MRSA yayılımını önlemek için kendi ulusal rehberlerini oluşturmuşlardır (78). Pek çok Avrupa ülkesini kapsayan bakteremi ve serebrospinal infeksiyonların insidansı için gerçekleştirilen EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) çalışmasına göre MRSA oranları ülkeden ülkeye %5- % 100 arasında farklılık göstermektedir. EARSS 2008 (79) verilerine göre MRSA oranı Danimarka, Estonya, Finlandiya, İzlanda, Hollanda, Norveç ve İsveç'te % 5'in altındadır. Avusturya, Lüksemburg ve Slovenya'da MRSA oranı % 10'un altında saptanmıştır. Belçika, Litvanya, Çekoslovakya, Fransa, Almanya, Macaristan, Polonya ve İsviçre'de metisiline direnç % 10 ile % 25 arasında saptanırken, Hırvatistan, Bulgaristan, İngiltere, İrlanda, İspanya, İtalya, Kıbrıs, Romanya, Türkiye ve Yunanistan'da % 25 ve üzerinde tespit edilmiştir. Malta ve Portekiz'de ise bu oran % 50'lere ulaşmıştır (11). Bazı Asya ülkelerinde ise MRSA oranı % 50'yi aşmaktadır. Özellikle Sri Lanka (% 86.5), Güney Kore (% 77.6), Vietnam (% 74.1), Tayvan (% 65), Tayland (% 57) ve Hong Kong (% 56.8) olmak üzere Doğu Asya'da yüksek oranlarda metisilin direnci görülmektedir (80).

ARMed çalışmasında en düşük MRSA oranları Lübnan (% 12), Tunus (% 18) ve Fas'da (% 19); en yüksek MRSA oranları Ürdün (% 56), Kıbrıs (% 55) ve Mısır'da (% 52) saptanmış, Türkiye'deki direnç % 39 olarak bildirilmiştir (81). SENTRY antimikrobial sürveyans çalışmasında 12,324 Gram pozitif suşun % 53'ü kan kültüründen izole edilmiş ve metisilin direnci % 40 oranında gözlenmiştir (82). Gales ve ark. (83) 2,218 kan kültürü izolatının dahil edildiği sürveyans çalışmasında MRSA oranını % 31 olarak belirlemiştir.

Bu oran Kore'de % 64 (84), Tayvan'daki bir hastanede direnç oranı yaklaşık % 77 olarak bulunmuştur (85). Kuzey Amerika'da % 38-50 (86,87), Orta Doğu'da % 33-40 ve Hindistan'da % 18-43 olarak rapor edilmiştir. Jamaika ve Küba'daki oran % 10'un altındadır. Yine bu oran Güney Amerika'da % 10-66 (88), Avrupa'da % 25-58 olarak bildirilmiştir (89,90).

Türkiye'de ise metisilin direnci açısından çeşitli çalışmalarda değişik oranlar bildirilmiştir. Ülkemizde 1996-1999 yılları arasında yapılan dokuz ayrı çalışmada bildirilen metisilin direnç oranlarının ortalaması % 47,5 olarak hesaplanmış, 2000-2003 yıllarında ise sekiz ayrı çalışma sonuçlarının ortalaması da bu orana çok yakın (% 46,6) bulunmuştur (35,91).

Ancak ülkemizde 2003-2004 yıllarında hastanede yatan hastalardan izole edilen *S. aureus* suşlarına ilişkin verileri içeren yayınlar, metisilin direncinin artarak %52'ye yükseldiğini göstermiştir (35). Bozca ve ark.'ları 2005-2006 yılları arasında çeşitli hasta örneklerinden elde edilen 720 *S. aureus* izolatının %34'ünü MRSA olarak saptarken (94), Güner ve Gürlü 2001-2006 yılları arasında cerahat ve yara örneklerinden izole edilen toplam 1373 *S. aureus* suşunun %29'unu MRSA olarak bulmuşlardır (95).

Dündar ve ark. *S. aureus* izolatlarında metisilin direncini 2005, 2006 ve 2007 yıllarında sırasıyla % 34, % 14 ve % 21 olarak saptamıştır. Kurutepe ve ark. ile Gürsoy ve ark. metisilin direncini % 32 saptarken; Türk Dağı ve ark. % 43, Tuncer ve ark. % 48 olarak tespit etmişlerdir. Sesli Çetin ve ark. yoğun bakım hastalarına ait suşlarda metisilin direncini % 69 olarak bildirmiştir (96, 97, 98, 99, 100, 101). Güngör ve ark.'nın yaptıkları çalışmada ise *S. aureus* izolatlarında % 32 oranında metisilin direnci saptanmıştır (102). Yine son yıllarda kan kültürü izolatları arasında yapılan Yılmaz ve arkadaşlarının çalışmasında bu oran % 28.4 olarak tespit edilmiştir (103).

2014 yılı verilerine göre hastanemiz laboratuvarında klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* larda metisilin direnci % 26 olarak bildirilmiştir.

MRSA'larda görülen çoklu antibiyotik direnci dikkate alındığında, doğru antibiyotik seçimi için öncelikle metisiline dirençli stafilokok suşlarının hızlı ve doğru tanımlanması gerekmektedir. MRSA'ların hatalı olarak duyarlı saptanması tedavi başarısızlıklarına neden olurken benzer şekilde metisiline duyarlı stafilokokların da dirençli tanımlanması gereksiz yere glikopeptid antibiyotiklerin kullanılması ve toksik etkilerine maruz kalınmasına, ayrıca tedavi maliyetinin artmasına yol açmaktadır (107, 108).

*Staphylococcus aureus* kökenlerindeki metisilin direnci, *mecA* gen kompleksi tarafından kodlanan değişmiş bir penisilin bağlayan protein olan PBP2a ile ilişkilidir (109, 110). Çoğunlukla MRSA izolatları PBP2a denilen ek bir penisilin bağlayan protein üretir. PBP2a betalaktamlara metisilin'in asıl fizyolojik hedefi olan PBP2'den daha düşük afinitelidir. PBP2a, *mecA* geni tarafından kodlanır (111). *MecA* geninin transkripsiyonu, homolog düzenleyici genler olan *mecR1-mecI* ve *blaR1-blaI* olarak farklı iki kromozomal bölge tarafından regüle edilir. *mecA* 'nın transkripsiyonunu *mecR1* ve *blaR1* uyarırken *mecI* ve *blaI* baskılamaktadır. Genetik baskılayıcı ve uyarıcıların ekspresyonunun kontrolündeki heterojenlikten dolayı metisilin direncinin tanımlanması zordur (112).

Bu nedenle stafilokoklarda, metisilin direncini belirleyebilmek için PZR ile *mecA* geninin tespiti altın standart olarak kabul edilmektedir (113). Bunun için *mecA*'yı hedefleyen in-house PZR'ların yanı sıra özellikle MRSA oranının yüksek olduğu bölgelerde real-time PZR metoduyla çalışan ticari sistemler de kullanıma girmiştir (114, 115). Metisilin direncini belirlemede *mecA* dışında farklı gen bölgelerini hedefleyen primerlerin kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. SCCmec elementini hedefleyen bir forward primer ile *orfX* gen bölgesini hedefleyen bir reverse primerin kullanıldığı bir çalışmada tek bir primer çifti ile farklı SCCmec tiplerine sahip MRSA'ların saptanabileceği belirtilmiştir. Ancak bu yöntemin, *SCCcap1* içeren *S. aureus* M standart suşunda tanımlandığı gibi, SCC bölgesine sahip olmasına rağmen bu kaset içerisinde *mecA* gen bölgesi bulundurmeyen *S. aureus* izolatları için yanlış dirençli sonuç verilebileceği belirtilmiştir (116). Bunun yanında son yıllarda yapılan bir çalışmada, *orfX-SCCmec* bölgesinin kendi içinde yeni ortaya çıkan çok çeşitli varyasyonlarının bulunması ile çoğu laboratuvar tarafından kullanılan primerlerin bu yeni bölgeleri hedefleyememesine bağlı olarak yanlış negatif sonuçların oluşabileceği belirtilmiştir. Çalışmada kullanılan ve *orfX-SCCmec* bölgesinin hedeflendiği rekombinant polimeraz amplifikasyon metodunun da % 4 oranında yanlış saptanmıştır (117).

Tüm bunlara ek olarak 2011 yılında, insan ve inek MRSA izolatlarından, *mecC* adında SCCmec XI elementi içinde yer alan yeni bir *mecA* homoloğu (*mecA-LGA251* ; %70 nükleotit benzerliğine sahip) geni bulunmuştur. Bu keşfin ardından tek başına *mecA* geninin tespitinin de metisilin direncinin saptanmasında altın standart olma özelliğini sağlamada yetersiz kalacağı bazı yazarlar tarafından belirtilmiştir (174). Xiaoliang ve ark. ait son yıllarda yapılan çalışmada da MRSA tesbitinde *mecA* ve *mecC* genlerinin her ikisinin saptanmasının altın standart olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada oksasiline ve sefoksitin disk difüzyon ve E-test ile dirençli bulunan ve betalaktamaza resistan penisilinlere direnç gösteren dört *S. aureus* suşu tespit edilmiştir. Bu suşlardaki direncin moleküler altyapısı tüm genom sekanslama yöntemi ile de incelenmiş ve *mecA/mecC* geni içermedikleri saptanmıştır. Bu verilere dayanarak *mecA/mecC* ve PBP2a'yı saptayan yöntemlerle dahi bazı dirençli izolatların gözden kaçabileceği şeklinde dikkat çekici bir sonuca da varılmıştır (118).

Fenotipik yöntemlerin metisilin direncini saptamadaki duyarlılıklarını araştıran birçok çalışma yapılmıştır (119). Bu çalışmalarda PZR yöntemi ile *mecA* geni analizi referans alınarak, oksasiline disk difüzyon (ODD) ve sefoksitin disk difüzyon yöntemlerinin (SDD) MRSA tespitindeki duyarlılıkları incelenmiştir. Oksasiline ve sefoksitin disk difüzyon yönteminin duyarlılığını sırasıyla Valesco ve ark. % 94,1 - % 100; Swenson ve ark. % 91 - %

99; Felten ve ark. % 96,4 - % 100; Mimica ve ark. % 96 - % 98; Salimnia ve ark. % 93,3- % 99,7 olarak bildirmişlerdir (107, 120, 121, 122, 123).

Bu çalışmalarda da gösterildiği gibi oksasiline PBP2a üretiminin zayıf bir indükleyicisi, sefoksitin ise mecA gen ekspresyonunun güçlü bir indükleyicisi olduğu (124) göz önünde tutularak, mecA aracılı metisilin direncinin tespitinde sefoksitin disk difüzyon testinin, oksasilin disk difüzyon testinden daha etkin olduğunu belirtilmiştir (109, 120).

Bu sebeple CLSI 2013 tarihinden itibaren *S. aureus*'larda metisilin direncinin saptanmasında oksasilin disk difüzyon yöntemini önermemektedir. Bunun yerine sefoksitin DD testi yapılmasını ya da oksasilin MİK değerinin belirlenmesini tavsiye etmektedir (197).

Broekema ve ark. 1611 *S. aureus* izolatı ile yaptıkları çalışmada sefoksitin disk difüzyon metodunun duyarlılığı % 97,3, özgüllüğü % 100 olarak saptanmıştır (125). Anand ve ark. SDD testinin duyarlılığını % 100 olarak tespit etmiş, PZR imkanının bulunmadığı birimlerde SDD testinin iyi bir alternatif olabileceğini belirtmişlerdir (126).

Rashed ve ark. ait çalışmada sefoksitin disk difüzyon metodunun duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla % 97,6 ve % 100 olarak bulunurken (127), Bhutia ve ark. nın yaptığı çalışmada ise bu değerler % 86,2 ve % 83,3 olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada MRSA saptanmasında güvenilir bir sonuç elde etmek için birkaç yöntemin birlikte kullanılması, ayrıca çelişkili sonuçlarla karşılaşıldığında genotipik bir metodun da uygulanabilir olması gerektiği sonucuna varılmıştır (128).

Datta ve ark. SDD, ODD, OAT ( Oksasilin Agar Tarama) ve PBP2a Lateks aglütinasyon testi olmak üzere dört ayrı metodu mecA PZR ile karşılaştırdıkları çalışmada SDD için duyarlılık ve özgüllüğü % 98,5 ve % 100 olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca sefoksitin zon çapının 20-22 mm olması durumunda MRSA'ların gözden kaçırılmaması için izolatların lateks aglütinasyon gibi duyarlılığı yüksek başka bir metotla daha test edilmesini önermişlerdir (129).

Son yıllarda yapılan, 95 MSSA ve 91 MRSA olmak üzere toplamda 186 *S. aureus* örneğinin değerlendirildiği ve referans metot olarak PZR'nin kullanıldığı bir başka çalışmada ise broth mikrodilüsyon ve sefoksitin disk sırasıyla % 98,9 ve % 94,7 olacak şekilde en yüksek spesifiteye ve % 100 ve % 98,9 olacak şekilde en yüksek sensitiviteye sahip bulunmuşlardır. Diğer metotlarla karşılaştırıldığında özellikle sefoksitin disk testinin,

uygulanmasının kolay oluşu ve özel donanım gerektirmeyişi sebebiyle klinik laboratuvarlarda tercih edilebileceği sonucuna varılmıştır (130).

MRSA tespitinde kullanılan çeşitli yöntemlerin karşılaştırıldığı ülkemizdeki çalışmalarda, sefoksitin disk diffüzyon (SDD) testinin duyarlılığı % 98-100, özgüllüğü ise % 99-100 oranları arasında saptanmıştır. Telli ve ark. bu değerleri % 98,8 - % 98,3 olarak bildirmişlerdir (131).

Toplam 416 *S. aureus* izolatının metisilin direncinin PZR ile mecA geni taranarak değerlendirildiği Adalet ve arkadaşlarının çalışmasında ODD, SDD ve OAT metotlarının duyarlılık ve özgüllükleri sırasıyla: % 100 ve % 89, % 99.50 ve % 100, % 99.50 ve % 100 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada MRSA sayısı 210 olarak belirtilmiştir (132).

Özel ve arkadaşları disk diffüzyon yöntemiyle metisilin direncini araştırdıkları çalışmada, *S. aureus* için sefoksitin diskinin duyarlılık, özgüllük, PPD ve NPD değerlerini sırasıyla % 94.3, % 100, % 100 ve % 96 olarak bulmuşlardır (133).

Son yıllarda yapılan, Iraz ve ark. ait 214 *S. aureus* suşunu içeren çalışmada SDD metodunun duyarlılık, özgüllük, PPD ve NPD değerleri sırasıyla % 96.5, % 98.4, % 97.6, % 97.6 olarak saptanırken; Uzun ve arkadaşlarına ait çalışmada ise bu testin duyarlılığı % 98.3 ve özgüllüğü % 100 olarak bulunmuştur (134, 135). Çoban ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada sefoksitin disk diffüzyon yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü % 100 olarak belirtilmiştir (136).

Biz de çalışmamızda, sefoksitin disk diffüzyon metodu ile mecA(+) 91 MRSA suşunun tamamını dirençli, mecA(-) 88 MSSA suşunun da tümünü duyarlı olarak saptadık ve testin duyarlılık ve özgüllüğünü % 100 olarak tespit ettik.

Günümüzde artık birçok mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılan otomatize tanı sistemlerinin, MRSA tespitindeki duyarlılıkları da araştırılmıştır. Otomatize sistemin önemli bir avantajı tür düzeyinde identifikasyon ve metisilin direncinin saptanmasında geleneksel fenotipik metotlara kıyasla zaman kazancı sağlamasıdır. Bu yöntemle *S. aureus* izolatlarının identifikasyonu için ortalama 4 (2-12) saat, antibiyotik duyarlılık sonuçları için ise ortalama 6 (3-15) saat yeterli olabilmektedir (137).

Yamazumi ve ark. tarafından yürütülen bir çalışmada, otomatize Vitek GP sistemi ve MRSA lateks aglütinasyon testi sonuçları mikrodilüsyon, oksasilin agar tarama ve mecA gen

varlığı ile karşılaştırılmıştır. MRSA lateks aglütinasyon testi, otomatize Vitek GP sistemi ve oksasilin agar tarama testlerinin sırasıyla duyarlılıkları % 96.9, % 98, % 98 ve özgüllükleri % 100, % 100 ve % 98 olarak bulunmuştur (138).

Sakoulas ve ark. 107 (MSSA) ve 203 MRSA ile yaptıkları çalışmada Vitek-1 ve Vitek-2 otomatize sistemlerinin duyarlılıklarını sırasıyla % 99 ve % 99.5, özgüllüklerini ise % 100 ve % 97.2 olarak saptamışlardır (140). Aynı otomatize sistemi değerlendiren başka bir çalışmada duyarlılık ve özgüllük sırasıyla % 94 ve % 100, SDD testi için ise her ikisi de % 100 olarak bulunmuştur (121).

Spanu ve ark.'larının yaptığı çalışmada, 223 *S. aureus* izolatının tamamında mecA gen pozitifliği ile uyumlu olarak Phoenix (Becton Dickinson, ABD) otomatize sisteminin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif yorumlama gücü % 100 olarak saptanmıştır (137).

Başka bir çalışmada, Phoenix otomatize sistemindeki sefoksitin MİK değeri kullanılarak sistemin duyarlılığı % 91, özgüllüğü ise % 100 olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, oksasilin MİK değerleri kullanıldığında aynı otomatize sistemin duyarlılığı % 67.1 ve özgüllüğü ise % 96.4 olarak bulunmuştur (120). Otomatize sistemle % 67 gibi oldukça düşük duyarlılık değerleri saptandığından, MRSA tanısı için sefoksitin disk diffüzyon gibi ikinci bir ek yöntemin kullanılması tavsiye edilmiştir.

Donay ve ark.'larının Phoenix otomatize sisteminin performansını değerlendirdikleri, gram negatif ve gram pozitif olmak üzere farklı türde birçok mikroorganizma ile birlikte 46 adet *S. aureus* suşunu da test ettikleri çalışmalarında bir adet *S. aureus* suşu mecA geni pozitif olmasına rağmen otomatize sistemle duyarlı bulunmuştur (140).

Biyokimyasal olarak atipik olan fakat PZR analizi ve antibiyotik duyarlılıkları açısından MRSA olarak adlandırılan suşlarla yapılan ve üç ayrı otomatize sistemin değerlendirildiği bir çalışmada ise, Phoenix (Becton Dickinson, ABD) otomatize sisteminin MRSA tanımlanmasında kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (141).

Roisin ve arkadaşları, Vitek 2 otomatize sistemin duyarlılık ve özgüllüğünü tüm MRSA izolatlarında sırasıyla % 97.5 ve % 100, SDD testinin sırasıyla % 98.7 ve % 100 olarak saptamışlardır (142). Eş zamanlı olarak iki otomatize sistemin metisilin direncini saptamadaki performanslarının değerlendirildiği bir çalışmada, Phoenix otomatize sisteminin duyarlılığı % 99.8 ve özgüllüğü % 100 bulunmuş; Vitek (bioMerieux Vitek, Mo.) sistemiyle

birlikte her iki otomatize sistemin de klinik örneklerden MRSA tanımlanmasında güvenilir olduğu sonucuna varılmıştır (143).

Mencacci ve ark. metisilin direncini belirlemede BD Phoenix sisteminin performansını 1066 *Staphylococcus aureus* ve 1121 koagülaz negatif stafilokok izolatı ile test etmişler ve bu otomatize sistemin duyarlılığını her ikisi için % 100 bulurken, özgüllüğünü *S. aureus* için % 99.8, KNS'ler için ise % 88.4 olarak bulmuşlardır (144). Yanlış pozitif bulunan bir *S. aureus* suşu PBP2a lateks aglütinasyon testi ile negatif, oksasilin makrodilüsyon testi ile duyarlı bulunmuş ve sonuç olarak suşun metisilin duyarlı olduğuna karar verilmiştir. Buna göre sistemin *S. aureus* için sadece bir major hata verdiği belirtilmiştir. Aslında sefoksitin ve oksasilin MİK değerleri ayrı ayrı değerlendirildiğinde sistemin 6 *S. aureus* suşunu yanlış duyarlı okuduğu belirtilmiş ancak her iki MİK değeri birlikte değerlendirildiğinde Phoenix'in sonuç raporunu doğru verdiği ifade edilmiştir. Yine çalışmada 2005 yılında üretilen bu sistemin, metisilin için duyarlılık ve direnci gösteren MİK değerlerinin 2006 yılında düşürülerek değiştirildiği ve bu değişiklik ile sistemin performansının arttığı belirtilmiştir. Aynı zamanda sistemin optimal performansının oksasilin ve sefoksitin MİK değerlerinin her ikisini aynı anda sunmasından kaynaklandığının altı çizilmiştir (144).

Bukhari ve ark. ait 1106 *S. aureus* izolatını içeren çok merkezli bir çalışmada Phoenix sisteminin duyarlılık ve özgüllüğünü % 96.2 ve % 93.3 olarak tespit etmişlerdir. Yanlış pozitif sonuçların gereksiz vankomisin kullanımına neden olduğu vurgulanmış, yanlış negatif sonuçlardan kaçınmak için ise moleküler yöntemlerin kullanılması gerektiği yorumunu yapmışlardır (145).

Ülkemizde de otomatize sistemlerin performansını değerlendiren çalışmalar mevcut olmakla birlikte Phoenix sistemi ile ilgili yayınların sayısı oldukça azdır. Atay ve arkadaşları mecA gen analizinin sonuçlarını disk diffüzyon testi, Vitek otomatize sistem ve PBP2a lateks aglütinasyon yöntemleri ile karşılaştırmışlardır. Sırasıyla metisilin direnci tanısında bu yöntemlerin % 100, % 90 ve % 100 duyarlılık gösterdiklerini bildirmişlerdir. Otomatize sistemin özgüllüğü ise % 80 olarak bulunmuştur. Otomatize sistem ve lateks aglütinasyon testini, MRSA taraması için güvenilir testler olarak değerlendirmişlerdir (146).

Dr. Aygül Turaç Biçer'e ait tez çalışmasında Vitek-2 otomatize sistem ile tanımlanıp antibiyotik duyarlılıkları belirlenen 90 *S. aureus* ve 90 KNS izolatının metisilin direnci, PZR yöntemi ile değerlendirmiştir. Sonuç olarak otomatize sistemin duyarlılık ve özgüllüğü %

95.45 ve % 95.65 olarak tespit edilmiştir. Çalışmada otomatize sistemde yanlış pozitif sonuç olasılığının, yanlış negatif sonuç olasılığından yüksek oluşu daha önceki çalışmalarla uyumlu bulunmuştur. Ayrıca Vitek 2 sistemde sonuçların çalışmada kullanılan diğer fenotipik yöntemlere göre daha kısa sürede tespit edildiği belirtilmiştir (147).

Sevgican ve arkadaşları BD Phoenix sistemi ile tanımladıkları 100 *S. aureus* ve 100 KNS suşunu içeren çalışmalarında oksasilin ve sefoksitin disk diffüzyon ile oksasilin ve sefoksitin E-test yöntemlerini mecA PZR ile karşılaştırmışlardır. Sefoksitin disk diffüzyon metodu ile 98 mecA pozitif ve 2 adet mecA negatif *S. aureus* izolatının tamamı doğru olarak tanımlanmıştır. Otomatize sistem ise iki suшта yanlış ve yanlış direnç bildirmiştir. Çalışmada kullanılan suşların, rutin olarak kullanılan otomatize sistem ile metisiline dirençli olarak saptanmasına karşı, çok küçük bir oranda da olsa mecA geni içermemesi; mecA yönünden yanlış pozitif sonuçlar elde edilebileceğini, ancak farklı direnç mekanizmalarının bu durumun sebebi olabileceği, o nedenle dikkatli olumması gerektiği belirtilmiştir (148).

Iraz ve ark. ait çalışmada Phoenix otomatize sistemi 82 mecA pozitif suştan sadece bir tanesini MSSA olarak yanlış tanımlarken, 128 mecA negatif izolattan üç tanesi MRSA olarak yanlış tanımlamıştır. Buna göre otomatize sistemin duyarlılığı % 98,8 özgüllüğü % 97.6 olarak belirlenmiştir. CLSI 2011 kriterlerine göre otomatize sistemin, oksasilin için  $\leq 0,25$  µg/ml MİK değerlerine sahip izolatları MSSA ve  $\geq 2$  µg/ml MİK değerlerine sahip izolatları ise MRSA olarak değerlendirmesi, düşük düzeyde dirence sahip BORSA ve MODSA gibi izolatları değerlendirmede yetersiz kaldığı belirtilmiştir. Bu durumda otomatize sistemin, *S. aureus* 'lardaki metisilin direncini saptamada ve tedaviye yön vermede yetersiz kalabileceği sonucuna varılmıştır (149).

Son yıllarda yapılan metisilin direncinin belirlenmesinde sefoksitin disk diffüzyon testi, otomatize sistem (Phoenix, BD, ABD) ve kromojenik besiyerinin karşılaştırıldığı Uzun ve arkadaşlarına ait çalışmada ise otomatize sistemin duyarlılığı % 100, özgüllüğü % 97.4 olarak saptanmıştır (150). Çekin ve ark. nın 206 *S. aureus* izolatının metisilin direncini Phoenix otomatize sistem ve real-time PZR metodu ile çalışan BD GeneOhm MRSA (Becton Dickinson Diagnostics GeneOhm, ABD) yöntemiyle karşılaştırdıkları çalışmalarında otomatize sistemin duyarlılık, özgüllük, PPD ve NPD değerlerini sırasıyla % 100, % 100, % 100 ve % 100 olarak bulmuşlardır. Bu sonuçlara dayanarak otomatize sistemin rutin mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılabilecek pratik ve güvenilir bir yöntem olduğu sonucuna varılmıştır (151).

Bizim çalışmamızda Phoenix sistemi, 91 mecA(+) *S. aureus* suşunun tamamını MRSA olarak doğru tanımlarken, 6 adet mecA(-) izolatı yanlış dirençli olarak sonuçlandırdı. Yanlış duyarlı sonuca rastlanmadı. Bu verilere göre sistemin duyarlılık, özgüllük, PPD ve NPD değerleri sırasıyla % 100, % 93.2, % 93.8 ve % 100 olarak bulundu. Otomatize sistemlerin duyarlılıklarının yüksek olup özgüllüklerinin buna nisbeten daha düşük olduğunu gösteren diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında bizim sonuçlarımızın da benzer olduğu görülmektedir. Yanlış dirençli sonuç vermenin vankomisin başta olmak üzere diğer glikopeptidlerin gereksiz kullanımına ve bununla birlikte VISA ve VRSA suşlarında artışa neden olacağı aşikardır. Bu yüzden otomatize sistemin MRSA olarak değerlendirdiği suşlarda moleküler testlerle mecA gen varlığının gösterilmesi, bu imkan yoksa sefoksitin disk diffüzyon testinin uygulanması önerilmektedir.

Yeni keşfedilen mecC geninin (152, 153) sadece *S. aureus* 'ta değil koagülaz negatif stafilokoklarda da bulunduğunu gösteren yayınlar mevcuttur (154). Literatürdeki kavram kargaşasını önlemek için artık mecC olarak adlandırılması kararlaştırılan bu gen (155) son yıllarda İngiltere, Danimarka, Hollanda, Fransa, Almanya ve İsveç gibi birçok Avrupa ülkesinden bildirilmiştir (156, 157, 158, 159, 160).

Şimdiye kadar bu geni içeren suşlara hem insanlarda hem de farklı hayvan türlerinde rastlanmıştır (161, 162). Avrupa'da yapılan bir çalışmada *S. aureus* 'lar içinde mecC(+) suş oranı % 0.5 belirtilmesine karşılık, suşun asıl kaynağı ve epidemiyolojisi hakkında çok az bilgi bulunmaktadır (152). Yapılan çeşitli çalışmalarda, mecC içeren MRSA ile enfekte olan inek, koyun gibi hayvanların, MRSA enfeksiyonları açısından insanlara bulaşta yeni bir zoonotik kaynak olduğu belirtilmiştir (163).

Danimarka'da yapılan bir çalışmada 1988 yılından bu yana izole edilmiş MRSA'lar mecC varlığı yönünden araştırılmış, 2003'e kadar sadece iki adet bu özellikte suş bulunurken 2003-2011 yılları arasında bu sayının artarak 110'a çıktığı belirtilmiştir. Aynı çalışmada mecC içeren MRSA'ların, hayvanlar (özellikle çiftlik hayvanları) ve insanlar arasında geçiş yapabileceği de ifade edilmiştir (164). mecC pozitif MRSA'ların prevalansının yukarıdaki çalışmada da gösterildiği gibi bir Avrupa ülkesi olan Danimarka'da artıyor oluşu, diğer Avrupa ülkelerinde de bu suşların varlığının geçmişe yönelik araştırılması konusunda tetikleyici olmuştur. İngiltere, İspanya ve İsviçre'de yapılan çalışmalar bu açıdan dikkat çekicidir (165, 166, 167).

Bu genin varlığının mecA üzerinden metisilin direncini saptayan konvansiyonel ve moleküler metotlarla saptanamaması tüm dünyada endişe yaratmıştır. Bu tür izolatların metisilin duyarlı olarak raporlandığı ve tedavide yetersiz kaldığı bildirilmiş ve bu problemin çözülebilmesi için son zamanlarda hem ticari hem de in-house PZR yöntemleri geliştirilmiştir (167, 168).

İsviçre’de ilk mecC pozitif MRSA tesbit edildikten sonra bu bölge hakkında mecC gen varlığının araştırılması için bir PZR protokolü oluşturulmuştur. 2005-2011 yılları arasında izole edilmiş tüm MSSA ve MRSA suşlarının retrospektif olarak değerlendirildiği çalışmada mecC genine rastlanmamış ve bu genin o bölgedeki hasta popülasyonunda nadir olduğu sonucuna varılmıştır (167).

İngiltere’de Paterson ve ark. prospektif olarak yaptıkları çalışmada 2010 MRSA suşu içinde 9 tane mecC pozitif izolat bularak prevalansı % 0.45 olarak belirlemişlerdir. İngiliz Antimikrobiyal Kemoterapi Cemiyeti (BSAC) standartlarına göre yaptıkları sefoksitin ve oksasilin disk difüzyon testine göre bu dokuz izolatın tümünü dirençli saptamışlardır. MİK değerleri oksasilin için 8-32 µg/ml, sefoksitin için ise 8-16 µg/ml arasında bulunmuş, betalaktam dışı antibiyotiklere direncin de nadir olduğu bildirilmiştir. İzolatlar ayrıca üç farklı ticari firmaya ait PBP2a lateks aglütinasyon testleri ile test edilip negatif bulunmuştur. Bu veriye dayanarak lateks aglütinasyon yöntemi ile mecC-MRSA saptanmasının zor olduğu yorumu yapılmıştır. (165).

Deplano ve ark.’na ait Belçika’da yapılan araştırmada ise retrospektif olarak 4869 *S. aureus* izolatı mecC varlığı yönünden araştırılmıştır. mecC içeren izolatlarda da fenotipik olarak direnç durumu ve toksin geni varlığı test edilmiştir. Genotiplendirme ise spa tiplendirme ve MLST kullanılarak gerçekleştirilmiştir. mecA negatif fakat sefoksitin dirençli olan (MİK 16-64 µg/ml), 9 *S. aureus* suşunun mecC geni içerdiği tesbit edilmiştir. Oksasilin MİK değerleri 4-64 µg/ml olarak belirlenen izolatların tamamı, betalaktam dışı antibiyotiklerin hepsine hassas bulunmuştur. mecC oranının düşük olduğu belirtilen çalışmada izolatların üç ayrı genetik kökene sahip olduğuna dikkat çekilmiştir (169).

ABD ordusunda görevli askeri personelden izole edilen 102 metisiline dirençli *S. aureus* izolatının in-house PZR yöntemiyle incelendiği bir çalışmada ise suşların tümü mecA pozitif bulunurken mecC içeren suşa rastlanmamıştır (170).

Slovenya’da hastanede yatan bir hastada mecC (+) MRSA saptanması üzerine 2006 ile 2013 yılları arasında izole edilen 395 adet toplum kaynaklı MRSA taranmış ve 6 adet mecC (+) MRSA daha bulunmuştur. Bu suşların düşük oksasilin MIC değerine sahip olup, mecA geni içermemeleri sebebiyle laboratuvarıda saptanamamalarının büyük bir problem olduğu belirtilmiştir (171).

İspanya’da yapılan bir araştırmada ilk kez, 2008 ve 2013 yılları arasında izole edilmiş *S. aureus* ‘lar içinde toplam 7 tane mecC içeren MRSA suşuna rastlanılmıştır. Bu izolatlarla SCCmec, PFGE, MLST tiplendirme yöntemleri uygulanmış, toksin genleri araştırılmıştır. İzolatlar sefoksitin disk diffüzyon metodu ile de incelenmiş ve dirençli bulunmuştur. Çalışmada ayrıca mecC-pozitif MRSA sepsisi geçiren bir hastanın hayatının kaybettiği belirtilerek bu suşların insanlarda ciddi enfeksiyonlara sebep olduğu ifade edilmiştir. Bundan dolayı ortaya çıkan bu bakterilerin saptanmasında daha kolay ve ucuz olan kültür bazlı duyarlılık testlerinin yapılabilmesi ihtiyacı bir kez daha vurgulanmıştır (166).

mecC aracılı metisilin direncini belirlemede kültür bazlı duyarlılık testlerinin değerlendirildiği Skov ve ark.’na ait bir çalışmada sefoksitin ve oksasilinin mecC pozitif *S. aureus* saptamadaki güvenilirliği test edilmiştir. 62 adet mecC pozitif *S. aureus* izolatının sefoksitin ve oksasilin duyarlılığı sıvı mikrodilüsyon, agar dilüsyon, Etest ve disk diffüzyon metotları kullanılarak araştırılmıştır. Sefoksitin, Becton Dickinson ve Oxoid firmalarına ait Mueller-Hinton besiyeri ile yapılan sıvı mikrodilüsyon, agar dilüsyon ve disk diffüzyon testlerinde tüm mecC pozitif izolatları saptadığı ancak Etest metodunda bir izolatı yanlış duyarlı verdiği belirtilmiştir. bioMérieux’a ait Mueller-Hinton agarın ise bu izolatları saptamada yetersiz kaldığı (% 26-47 arasında yanlış duyarlı sonuç), İso-Sensitest ve Columbia agar ile yapılan agar dilüsyonda da bir adet yanlış duyarlılık olduğu tesbit edilmiştir. İso-Sensitest kullanılarak yapılan sefoksitin disk diffüzyonu da izolatların % 29’unu kaçırmıştır. Oksasilin için ise, sadece Columbia agar + % 2 NaCl agar dilüsyon metodu, tüm izolatları başarılı bir şekilde saptamıştır. Sonuç olarak mecC (+) suşların saptanmasında sefoksitin oksasilinden daha güvenilir olduğu belirtilmiştir (172).

Cartwright ve ark. ise rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında sıkça kullanılan bir otomatize sistemin mecC pozitif izolatları tanımlamadaki başarısını araştırmışlardır. 896 *S. aureus* suşu üzerinden yapılan çalışmada Vitek-2 otomatize sistemin verdiği oksasilin duyarlı/sefoksitin dirençli sonucunun mecC pozitif izolatlar için % 88.7 duyarlılık ve % 99.5 özgüllüğe sahip olduğu saptanmıştır. Bu antibiyotik duyarlılık profilinin, mecC(+) MRSA

saptanmasında moleküler yöntemlere göre daha masrafsız bir tarama metodu olabileceği belirtilmiştir (173).

Almanya’da yapılan bir çalışmada multipleks bir PZR yönteminin (hyplex MRSA Plus; Amplex Diagnostics GmbH, Munich, Germany) performansı 51 mecC-pozitif MRSA, 240 mecA- pozitif MRSA ve 50 mecA ve mecC-negatif metisilin duyarlı *S. aureus* (MSSA) izolatı ile değerlendirilmiştir. Direnç genlerinin yanı sıra *S. aureus* için identifikasyon geni(nuc) ve PVL toksin genini de hedefleyen yöntemin duyarlılık ve özgüllüğü hem mecA hem mecC için % 100 olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada, mecC’nin keşfinden önce MRSA tanısında mecA geninin gösterilmesinin metisilin direncinin saptanmasında kesin kriter olarak düşünüldüğü belirtilmiştir. *nuc*, *eap*, *spa* gibi *S. aureus* identifikasyon genlerinden biri ile mecA direnç genini hedefleyen PCR stratejilerinin MRSA izolatlarının doğrulanmasında altın standart olarak kullanılmakta olduğu ancak mecC’nin keşfiyle bu tür MRSA’ların tedavi açısından klinisyenleri; direnci doğru saptama açısından da mikrobiyoloji laboratuvarlarını zora soktuğu belirtilmiştir (174).

İspanya’da hayvanlardan ve kentsel atık sularından izole edilmiş 360 metisiline duyarlı *S. aureus* ile yapılan çalışmada 4 adet mecC(+) izolat tespit edilmiştir. Oksasilin ve sefoksitin MİK’leri EUCAST önerilerine göre sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiş, ek olarak oksasilin için MicroScan otomatize sistemi kullanılmıştır. Oksasilin MİK değerleri 4 izolatın tümü için duyarlı kategorisinde bulunurken, iki izolat sefoksitine dirençli (MİK 8 ve 16 µg/ml), diğer ikisi ise duyarlı (MİK 4 µg/ml) olarak saptanmıştır. Bu verilerin önceki yayınlarla uyumlu olduğu belirtilerek, mecC varlığının oksasilin veya sefoksitin direnç fenotipleriyle her zaman bağlantılı olmadığı ve belirsiz sonuçların mecC içeren izolatları saptamayı engelleyebileceği vurgulanmıştır (175).

Ülkemizde MRSA’larda mecC geni saptanması ile ilgili çok az sayıda yayın bulunmaktadır (176, 177). Dolayısıyla bu etkenin ülkemizdeki insan ve hayvan izolatlarındaki prevalansı hakkında gerekli ve yeterli bilgiye sahip değiliz. Ancak bu suşun insanlarda hayatı tehdit edici enfeksiyonlara sebebiyet verebileceği, hayvanlardan insanlara geçme potansiyeline sahip olduğu ve MRSA saptanmasına yönelik rutin laboratuvar tetkikleri ile saptanamadığı göz önüne alındığında en kısa zamanda epidemiyolojik verilere ihtiyacımız olduğu aşıkardır.

Pakaştıçalı ve arkadaşlarına ait çalışmada kistik fibrozlu hastaların solunum yollarından izola edilen *S. aureus* suşları multipleks PZR yöntemiyle çalışılmış, 78 *S. aureus*

suşunun 11 tanesi MRSA olarak tanımlanmıştır. Bu suşların tamamının mecA(+) olduğu ve mecC genine rastlanmadığı belirtilmiştir (176). Dokuz Eylül Üniversitesi'nde yapılan bir çalışmada ise toplam 34 MRSA izolatında in-house PZR yöntemiyle mecC varlığı araştırılmış ve bu geni içeren bir suşa rastlanmamıştır (177).

T.C Sağlık Bakanlığı'nın Ocak 2014'te yayınladığı Ulusal Mikrobiyoloji Standartları rehberinde *S. aureus* 'larda metisilin direncinin saptanmasına yönelik fenotipik ve genotipik yöntemlerin laboratuvarlarda nasıl uygulanacağına dair algoritmalar bulunmaktadır. Bu rehberde de mecA geni içermeyen ancak metisiline dirençli izolatların gözden kaçabileceği, bu konuda dikkatli olunması gerektiği vurgulanmıştır (178).

Biz, 91'i MRSA olmak üzere toplam 179 *S. aureus* izolatını değerlendirdiğimiz çalışmamızda, *S. aureus*'a özgü spa geni ile mecA, mecC ve PVL olmak üzere dört ayrı gen bölgesini hedefleyen bir in-house multipleks PZR yöntemini kullandık. Sonuç olarak MRSA veya MSSA izolatlarımızın hiçbirinde mecC geni tesbit etmedik. Çalışmamız mecC araştırılması üzerine ülkemizde yapılmış yayınlar arasında en kapsamlısı olmakla birlikte, Avrupa'da yapılan çalışmalar göz önüne alındığında araştırmamıza dahil edilen suş sayısının az olduğunu ve ülkemize ait prevalans verileri için daha kapsamlı çalışmalar yapılması gerektiğini düşünüyoruz.

*S. aureus* 'un neden olduğu enfeksiyonların patogeneğinde, bakteriye ait yüzeyel komponentlerin yanı sıra çok sayıdaki ekstraselüler proteinler, virülans faktörü olarak rol oynamaktadır. Bunlar arasında yer alan Panton-Valentin lökositidin (PVL) toksini, temel savunma hücreleri olan nötrofiller, monositler ve makrofajlarda por oluşumuna yol açarak bu hücrelerin parçalanmasına ve nekroza neden olmaktadır (179). Bu toksin, ciddi deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ile genç ve daha önce sağlıklı olan bireylerde yüksek mortalite ile seyreden ciddi nekrotizan pnömoniye yol açabilmektedir (180, 181, 182). PVL pozitif suşların, son iki dekada dünyada artan klonal yayılımı, önemli halk sağlığı sorunlarına neden olmaktadır (183, 184). Avrupa'da PVL pozitif *S. aureus* prevalansının artması da ayrıca dikkat çekicidir (185, 186). PVL özellikle toplum kökenli *S. aureus* suşlarında gözlenmektedir ancak yapılan çalışmalar bu suşların hastane ortamlarına hızla yayılmaya başladığını göstermektedir. Morbidite ve mortalitesi yüksek olan PVL pozitif suşların hastane ortamında yayılması, salgınlar oluşturmaları, antibiyotiklere karşı direnç genlerini kazanarak, daha dirençli, daha virülan suşların ortaya çıkma riskini artırmaktadır (187).

Türkiye’de yapılan farklı çalışmalarda PVL’nin *S. aureus* izolatlarında saptanma oranının % 2- 3.9 arasında değiştiği bildirilmektedir (188). Özkul ve arkadaşları kan, yara ve solunum örneklerinden izole edilen 79 metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) izolatının 6’sında (% 7.5) PVL toksinini pozitif bulurken, 75 MRSA izolatının hiçbirisinde PVL genini saptamamışlardır (189).

Karahan ve arkadaşları, MRSA suşlarının % 3’ünde ve MSSA suşlarının % 9’unda PVL pozitifliği bulurken; Gülmez ve arkadaşları ise deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından elde edilen 285 hastane kaynaklı *S.aureus* izolatının % 2’sinde PVL pozitifliği saptamışlardır. (190, 191).

Kırdar ve arkadaşları 37 HK-MRSA, Tekeli ve arkadaşları kan kültürlerinden izole edilen 100 HK- MRSA izolatında yaptıkları çalışmalarda PVL pozitifliği belirlememişlerdir (192, 193). Akoğlu ve ark. ise 110 HK-MRSA suşu ile yaptıkları çalışmada PVL pozitiflik oranının % 12.7 olarak saptamışlardır (194).

147 *S. aureus* suşuyla yapılan bir başka çalışmada bulunan 6 adet PVL pozitif *S.aureus* suşunun toplum kaynaklı olduğu belirtilmiş; hastane kaynaklı örneklerde PVL saptanmamış olmasına rağmen, bu toksini taşıyan suşların ek virülans özelliği kazandığı bilindiğinden HK-MRSA suşlarında da bu toksinin varlığının takip edilmesi gerektiği yorumu yapılmıştır (195).

Son yıllarda yapılan Duman ve ark. ait çalışmada, TK 13 (% 15) ve HK 6 (% 3) *S.aureus* suşu PVL pozitif olarak saptanmıştır. PVL pozitif TK suşların tamamı MSSA, HK suşların ise 5’i MSSA, 1’i MRSA olarak tanımlanmıştır (196).

Biz çalışmamızda 179 *S. aureus* içerisinde 6 tane MRSA ve 6 tane MSSA suşunda olmak üzere toplam 12 adet PVL pozitif suş tespit ettik. MRSA izolatları apse, yara ve biyosi olmak üzere deri ve yumuşak doku örneklerinden elde edilmişti. Altı örnek her bir bölümden birer tane olmak üzere Ortopedi, KBB, genel cerrahi, çocuk cerrahisi, çocuk onkoloji ve çocuk enfeksiyon hastalıkları servislerinden gelmişti. PVL (+) MSSA’lar ise KBB, enfeksiyon hastalıkları, ortopedi, plastik cerrahi ve çocuk enfeksiyon hastalıkları polikliniklerinden gelen deri ve yumuşak doku örneklerinden izole edilmişti. PVL pozitif MRSA’ların tamamının hastanede yatan ve PVL pozitif MSSA’ların tamamının da poliklinik hastalarından izole edilmiş olması dikkat çekiciydi.

Bu verilere göre MRSA lar içinde PVL pozitiflik oranını % 6.5, MSSA'lar içinde ise % 7.4 olarak saptadık. MSSA'lar için ülkemizde yapılmış çalışmalarda % 7.5-9 arasında değişen PVL pozitiflik oranı ile bizim pozitiflik oranımızın uyumlu olduğunu tespit ettik. Bunun yanında önceki çalışmalarda MRSA'lar için ortalama % 3 olarak bulunan PVL pozitiflik oranı göz önüne alındığında bizim elde ettiğimiz oranın daha yüksek olduğunu saptadık. Bu verinin de PVL pozitif MRSA'ların sayısında artış olduğunu belirten diğer çalışmalarla uyumlu olduğunu tespit ettik.

Bunların dışında metisiline dirençli stafilokok suşlarının tüm beta laktam antibiyotiklere ve beta laktam/beta laktamaz inhibitör kombinasyonlarına direnç gösterdiği bilinmektedir. Yapılan çalışmalarda metisiline dirençli suşlarda, aminoglikozid ve kinolonlar başta olmak üzere birçok antibiyotiğe karşı çoklu ilaç direnci saptanmıştır (104).

Duman ve ark. ait bir çalışmada izole edilen metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve metisilin duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA) suşları sırası ile siprofloksasin'e % 66.6 ve % 5.45, gentamisin'e % 41.3 ve % 8.2, eritromisin'e % 58.7 ve % 6.4, trimetoprim/sülfametoksazol'e % 20.6 ve % 1.8, klindamisin'e %36.5 ve %6.4, rifampin'e % 61.9 ve % 15.5 oranında dirençli oldukları belirlenmiştir. Vankomisin ve teikoplanin'e ise direnç saptanmamıştır (105). Türk Dağı ve ark. yaptığı çalışmada MSSA ve MRSA suşlarında gentamisine duyarlılık sırasıyla % 99 ve % 21, tetrasikline % 98 ve % 53, siprofloksasine % 97 ve % 12, trimetoprim/sülfametoksazole % 96 ve % 84, eritromisine % 87 ve % 29 olarak bulunmuştur. Bu farkların istatistik olarak anlamlı olduğu ifade edilmiştir. Vankomisin ve linezolid ise suşların tümü duyarlı bulunmuştur (99). Aytaç ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise izole edilen 264 *S. aureus* suşunda sefoksitin direnci 169 (% 64) suşta bulunmuştur. İzole edilen suşların tamamı vankomisin ve linezolidde duyarlı olarak saptanmıştır. Metisiline dirençli *S. aureus* suşlarında TMP/SXT ve eritromisin direnç oranları sırasıyla % 35 ve % 78 bulunmuştur. Metisiline duyarlı olanlarda bu antibiyotiklere direnç oranları % 10 ve % 25 olarak bulunmuştur (106).

Bizim çalışmamızda MSSA ve MRSA suşlarında gentamisine direnç sırasıyla % 2 ve % 37, tetrasikline % 11 ve % 48, levofloksasine % 4 ve % 49, trimetoprim/sülfametoksazole % 1 ve % 15, eritromisine % 6 ve % 52 olarak bulundu. Tüm bu verilere paralel olarak metisilin direnci ile birlikte levofloksasin, eritromisin, gentamisin ve tetrasikline karşı direnç oranlarında, metisiline duyarlı suşlara nazaran anlamlı artışlar gözlemlendi. Vankomisin ve linezolidde dirençli suş saptanmadı (Tablo 6).

Sonuç olarak *S. aureus*'larda *mecA* kontrolündeki metisilin direncinin belirlenmesinde, sefoksitin disk diffüzyon yönteminin, uygulamasının kolay ve diğer yöntemlere göre maliyetinin düşük oluşu göz önüne alındığında rutin laboratuvar kullanımı için uygun olabileceğini düşünmekteyiz. Phoenix otomatize sistemin ise duyarlılığının yüksek olmasına rağmen özgüllüğünün nisbeten düşük olması sebebiyle yanlış pozitif sonuç verme ihtimali olduğu için mümkünse moleküler yöntemler ile *mecA* gen varlığının teyit edilmesi gerekmektedir.

Ayrıca her ne kadar *S. aureus* 'lar içindeki oranı düşük olsa da (% 0.5) yeni ortaya çıkan *mecC* geni kontrolündeki MRSA'ların gözden kaçmaması, metisiline duyarlı olarak yanlış raporlanan tedaviye yanıtızsız *S. aureus* enfeksiyonlarının sebeplerinin araştırılması ve ülkemiz için epidemiyolojik verilerin elde edilebilmesi için bu geni saptayan moleküler yöntemlerin laboratuvarlarda daha sıklıkla yer bulması gerekmektedir.

Özellikle Avrupa'da yapılan prevalans çalışmalarına karşılık ülkemizde çok az veriye sahip olduğumuz dikkate alındığında bu konuyla ilgili daha geniş çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

Bizim çalışmamızda kullandığımız multipleks in-house PZR yöntemiyle, elde edilen izolatin, *spa* genine bakılarak *S. aureus* olup olmadığı, *mecA* ve *mecC* genlerine bakılarak metisilin direnci varlığı ve aynı zamanda invaziv enfeksiyonlardan sorumlu PVL genini içerip içermediği belirlenmiş olmaktadır. Böylece klinisyene enfeksiyondan sorumlu *S. aureus* suşunun virulansı ve metisilin direnci hakkında kapsamlı ve güvenilir sonuçlar sunulabilmektedir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Bannerman TL. *Staphylococcus, Micrococcus* and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In Murray PR., Baron EJ., Jorgensen JH., Pfaller MA., Tenover FC., Tenover FC. (Ed.) *Manual of Clinical Microbiology* . 9th Ed. Washington: DC, 2005: 384-404.
2. Peacock SJ. *Staphylococcus*. In Borriello SP, Murray PR, Funke G. (Ed). *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*. 10th Ed. Hodder Arnold, London, United Kingdom.2005: 771-832.
3. Shopsin B, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis*, 2001; 7:323-326.
4. Grüneberg RN. Anti-Gram positive agents: What we have and what we would like. *Drugs* 1997; 6:29-38.
5. Şardan YÇ. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* infeksiyonlarının epidemiyolojisi ve kontrolü. *Hastane İnfek Derg*, 2000; 4:205-207.
6. Ploy M, Grelaud C, Martin C et al. First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. *Lancet*, 1998; 351:1212.
7. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet*, 1997; 350:1670-1673.
8. Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin-United States 1997. *MMWR*, 1997; 46:765-766.
9. McManus J. Vancomycin resistant *staphylococcus* reported in Hong Kong. *BMJ*, 1999; 318:626.
10. Mi-Na K, Pai CH, Woo JH et al. Vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* in Korea. *J Clin Microbiol*, 2000; 38:3879-3881.
11. Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus* resistant to vancomycin-United States, 2002. *MMWR*, 2002; 51:565-7.
12. Centers for Disease Control and Prevention. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* Pennsylvania, 2002. *MMWR*, 2002; 51:902.
13. Tevfik Cengiz A. Stafilokoklar. İçinde: Ustaçelebi Ş. (ed) Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş kitabevi, Ankara 2003 : 339-348.

14. Looney, W. J. Small colony variants of *Staphylococcus aureus*. Br J Biomed Sci, 2000; 57:317-322
15. Brooks G.F, Butel J. S, Morse S. A. The Staphylococci. İçinde: Brooks G.F, Butel J. S, Morse S. A. (ed). Medical Microbiology. 12. baskı New York: Javets, Melnick & Adelberg's; 2004:223-230.
16. Waldvogel FA. Staphylococcus aureus (Including Staphylococcal Toxic Shock). Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Mandell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases. New York: Churchill Livingstone; 2000: 2069-2092.
17. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E. W, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Gram-Positive Cocci. İçinde: Washington C. Winn Jr. (ed). Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6. baskı. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2006: 623-67
18. Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Staphylococcus aureus: Mikrobiyoloji, Patogenez ve Epidemiyoloji. İçinde: Gram Pozitif Bakteri Enfeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp, 2004: 9-71
19. Riordan KO, Lee JC. Staphylococcus aureus capsuler polysaccharides. Clin Microbiol Rev. 17: 218-234: 2004
20. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Staphylococcus* and related organisms. Mosby Inc. St. Louis: 202-216: 2002
21. Que A, M Philippe *Staphylococcus aureus* (including staphylococcal toxic shock). In:Mandel GL, Bennet JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases.7th. ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2010; 2543–2579
22. Joklik WK, Willet HP, Amos DB, Wilfet C. Zinsser Microbiology. Twentieth Edition, Appleton and Lange, 401-416, (1992)
23. Muray PR, Rosenthal KS, Pfaller PA. Medical Microbiology;4thed. Philadelphia:Elsevier. 2005:203-12;221-36
24. Bilgehan H. Staphylococcus. Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları.Fakülteler Kitapevi Barış Yayınları. İzmir: 240-266: (2000)
25. Dündar V, Dündar DE. Stafilokoklar. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi.Cilt 2.Topçu AW, Söyletir G, Doganay M. Nobel Tıp Kitapevleri.İstanbul: 1507-1516: (2002)
26. Cengiz T. Staphylococcus. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ustaçelebi Ş. Güneş Kitabevi . Ankara: 339-347. (1999)
27. Bilgehan H. Temel mikrobiyoloji ve bağışıklık bilimi. 10. baskı. İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi. 2002:361-530.

28. Bilgehan H. Klinik mikrobiyolojik tanı. 3. baskı. İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi. 2002;425-54;649-712
29. Brown Derek F.J. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). J Antimicrob Chemother. 56: 1000-1018: (2005)
30. Ünal S. Stafilokoklarda metisilin ve enterokoklarda vankomisin direncinin belirlenmesi. ANKEM Derg. 21 (Ek 2): 166-170: (2007)
31. Grisold AJ, Leitner E, Mühlbauer G, Marth E, Kessler HH. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous confirmation by automated nucleic acid extraction and real-time PCR. J Clin Microbiol. 2002;40(7):2392-7
32. Gudding R. Differentiation of staphylococci on the basis of nuclease properties. J Clin Microbiol. 1983;18(5):1098-101
33. Langlois BE, Harmon RJ, Akers K, Aaron DK. Comparison of methods for determining DNase and phosphatase activities of staphylococci. J Clin Microbiol. 1989;27(5):1127-9.
34. Moreillon P, Que Y, Glauser MP. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock). Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases 6th edition Volume 2, Elsevier Inc. 2005; 2321-52.
35. Derbentli Ş. Stafilokoklarda antibiyotik direnci. ANKEM Derg. 2005;19(Ek-2):54-60
- 36- Durupınar B. Antibiyotiklere dirençte yeni eğilimler. Klimik Dergisi 2001;14(2):47-56
37. Maltezou H, Giamarellou H. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. Int J Antimicrob Agents, 2006; 27:87-96.
38. Boyle-Vavra Daum R.S. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Panton-Valentine leukocidin. Lab Invest, 2007; 87:3-9.
39. Haddadin AS, Fappiano SA, Lipset PA. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the intensive care unit. Postgrad Med J, 2002; 78:385-392.
40. ULUTÜRK Rüçhan, ÖZKANTAR G. Ülkü, FİNCANCI Muzafer, YARDIMCI A. Cem, DESTANOĞLU Özden. Yoğun Bakım Ünitesinde Yatan Hastalarda Metisiline Dirençli *Staphylococcus Aureus* Nazal Kolonizasyonu ve Hastane Enfeksiyonu İlişkisi. İstanbul Tıp Derg -2010;11(4):159-163

41. Abbott KC, Agodoa LY,. Hospitalizations for bacterial endocarditis after initiation of chronic dialysis in the United States. *Nephron*. 2002; 91: 203-9.
42. Moreillon P, Que YA. Infective endocarditis. *Lancet*. 2004; 363: 135-49.
43. Osiyemi O, Dickinson G. Gram-positive pneumonia. *Curr Infect Dis Rep*. 2000; 2: 207-14.
44. Tünger A. Staphylococcus aureus: mikrobiyoloji, patogenez ve epidemiyoloji. Önemli ve sorunlu gram-pozitif bakteri infeksiyonları 2004; 9-22.
45. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of Staphylococcus aureus. *Clin Microbiol Rev*. 2000;13: 16-34.
46. Dündar V. Metisiline Dirençli Stafilokok İnfeksiyonları. *Klinik Dergisi Cilt 13, Özel Sayı 2000*; 26-7
47. Stefani S, Agodi A. Molecular epidemiology of antibiotic resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2000; 13: 143-53.
48. Dowson CG. Coffey TJ, Spratt BG. Origin and molecular epidemiology of penicillin-binding protein mediated resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Trends Microbiol*. 1994; 2: 361-66
49. Ito T, Kuwahara-Arai K, Katayama Y, Uehara Y, Han X, Kondo Y, Hiramatsu K. Staphylococcal Cassette Chromosome mec (SCCmec) analysis of MRSA. *Methods Mol Biol*. 2014;1085:131-48.
50. Rice LB, Bonomo RA, Genetic and biochemical mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents, In Lorian V (Eds). *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Lippincott Williams & Wilkins, USA. 2005; p:441-508.
51. Hawkey PM. Molecular epidemiology of clinically significant antibiotic resistance genes. *Br J Pharmacol*. 2008;153: 406-13.
52. Summers AO. Genetic linkage and horizontal gene transfer, the roots of the antibiotic multi-resistance problem. *Anim Biotechnol*. 2006; 17: 125-35.
53. Schwalbe RS, Stapleton JT, Gilgan PH. Emergence of Vankomicin-resistance in coagulase-negative staphylococci. *N Eng J Med* 1987; 316: 927-31.

54. Tünger A. Staphylococcus aureus : mikrobiyoloji, patogenezi ve epidemiyoloji. Önemli ve sorunlu gram-pozitif bakteri infeksiyonları 2004; 9-22.
55. Tenover FC, Biddle JW, Lancaster MV. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in Staphylococcus aureus . Emerg Infect Dis. 2001; 7: 19.
56. Fridkin SK, Hageman J, McDougal LK, Mohammed J, Jarvis WR, Perl TM, Tenover FC, for the Vancomycin-Intermediate Staphylococcus aureus Epidemiology Study Group. Epidemiological and Microbiological Characterization of Infections Caused by Staphylococcus aureus with Reduced Susceptibility to Vancomycin, United States, 1997-2001. Clin Infect Dis. 2003; 36: 429-39.
57. Sieradzki K, Roberts RB, Haber SW. The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin resistant Staphylococcus aureus infection. N Eng J Med. 1999; 340: 517-23
58. Sievert DM, Boulton ML, Stoltman G, Johnson D. Staphylococcus aureus Resistant to Vancomycin - United States, 2002. MMWR. 2002; 51: 565-67.
59. Hooper DC. Fluoroquinolone resistance among gram-positive cocci Lancet Infect Dis 2002;2: 530-8.
60. Gönüllü N, Karaköse AR, Çatal F, Küçükbaşmacı Ö, Altınkum S, Torun MM. Klinik örneklerden izole edilen stafilokok suşlarının makrolid ve linkozamid direnç fenotipleri, Türk Mikrobiyol Cem Derg 2009;39(1-2):12-5.
61. Salmenlinna S. Molekular Epidemiology of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Finland. Academic dissertation. Faculty of Medicine, University of Helsinki, Haartman Institute. Helsinki, 2002.
63. Senda Mezghani Maalej, Faouzia Mahjoubi Rhimi, Marguerite Fines, Basma Mnif, Roland Leclercq and Adnene Hammami. Analysis of Borderline Oxacillin-Resistant Staphylococcus aureus (BORSA) Strains Isolated in Tunisia. Journal of Clinical Microbiology 2010;p. 3345–3348
64. Tomasz A., Drugeon H.B., De Lencastre H.M., Jabes D., McDougal L., Bille J., New mechanism for methicillin resistance in S. aureus: clinical isolates that lack the PBP 2a gene

and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding proteins with modified penicillinbinding capacity, *Antimicrob. Agents. Chemother.* 1989;33:1867-9.

65. Rohrer, S., K. Ehlert, M. Tschierske, H. Labischinski, and B. Berger-Bächi. The essential *Staphylococcus aureus* gene *fmhB* is involved in the first step of peptidoglycan pentaglycine interpeptide formation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1999;96:9351-9355.

66. Berger-Bächi B, Rohrer S. Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Arch Microbiol.* 2002;178(3):165-71.

67. Sancak Banu. *Staphylococcus aureus*'ta metisilin ve vankomisin direnci. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2007; 38:127-134

68. Chambers HF. Methicillin Resistance in *Staphylococci*: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. *Clin Microbiol Rev* 1997;10:781-91.

69. Öztürk R. Antimikrobik ilaçlara karşı direnç gelişme mekanizmaları ve günümüzde direnç durumu. İstanbul: İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi sempozyum dizisi No:31. Kasım 2002; 83–100).

70. Krut O, Sommer H, Kronke M. Antibiotic-induced persistence of cytotoxic *Staphylococcus aureus* in non-phagocytic cells. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:167– 73.

71. Schmitz FJ, Fluit AC, Hafner D, et al. Development of resistance to ciprofloxacin, rifampin and mupirocin in methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:3229–31.

72. Nelson, L. C. S. Cockram, G. Lui, R. Lam, E. Lam, R. Lai, and M. Ip. 2006. Community case of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Emerg. Infect. Dis.* 12:172-174.

73. Jehl F, Chomarat M, Weber M, Gerard A. Antibiyotik Duyarlılık Testinden Reçeteye. Çev: Söyletir G, Bal Ç, Gür D, Wilke Topçu A. 2. Baskı İstanbul: Bio Merieux Yayınları Mart 2003; 78–83

74. Derbentli Ş. Stafilokoklarda Antibiyotik Direnci: 2003-2004 Türkiye Haritası. *ANKEM Dergisi* 2005;19(Ek2)54-60

75. Croes S, Beisser PS, Terporten PH, Neef C, Deurenberg RH, Stobberingh EE. Diminished in vitro antibacterial activity of oxacillin against clinical isolates of borderline oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2010 Jul;16(7):979-85

76. Zhu LX, Zhang ZW, Wang C, Yang HW, Zhang Q, Cheng J. Evaluation of the CLSI cefoxitin 30-microg disk- diffusion method for detecting methicillin resistance in staphylococci. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12(10): 1039-42.
77. Nezahat GÜRLER. Hastane İnfeksiyonlarına Yol Açan Sorunlu Mikroorganizmalar Nelerdir? Sorun Oluşturma Nedenleri Nelerdir? 4. Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi – 2005
78. Humphreys H. National guidelines for the control and prevention of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus* – what do they tell us?. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13:846-53
79. Köck R, Bcker K, Cookson B et al. Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe, *Euro Surveill* 2010;15(41):19688.
80. Sancak B. MRSA direnç mekanizmaları: dünyada ve Türkiye’de epidemiyolojisi, *ANKEM Derg* 2012;26(Ek:2):38-47.
81. Borg MA, De Kraker M, Scicluna E et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in invasive isolates from southern and eastern Mediterranean countries, *J Antimicrob Chemother* 2007;60(6):1310-5
82. . Sader HS, Moet GJ, Jones RN. Antimicrobial resistance among Gram-positive bacteria isolated in Latin American hospitals, *J Chemother* 2009; 21(6):611-20.
83. Gales A, Sader H, Ribeiro J, Zoccoli C, Barth A, Pignatari A. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive bacteria isolated in Brazilian Hospitals participating in the SENTRY Program (2005-2008), *Brazilian J Infect Dis* 2009;13(2):90-8.
84. Bin Kim H, Hee-Chang J, Jung Nam H et al. Invitro activities of 28 antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolates from tertiary-care hospitals in Korea: a nationwide study. *Antimicrob Agent Chemother* 2004;48:1124-7.
85. Hsueh P-R, Teng LJ, Chen W-H et al. Increasing prevalence of MRSA causing Nosocomial infections at a un 101- Kuehnert MJ, Hill HA, Kupronis BA, Tokars JJ, Solomon SL, Jernigan DB. Methicillin-resistant-*Staphylococcus aureus* hospitalizations, United States. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(6):868-72

86. Jones ME, Draghi DC, Karlowsky JA, Sahm DF, Bradley JS. Prevalence of antimicrobial resistance in bacteria isolated from central nervous system specimens as reported by U.S. hospital laboratories from 2000 to 2002. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2004;3:3.
87. de Oliveira Conterno L, Wey SB, Castelo A. Staphylococcus aureus bacteremia: comparison of two periods and a predictive model of mortality. *Braz J Infect Dis.* 2002;6(6):288-97.
88. Fluit AC, Wienders CL, Verhoef J, Schmitz FJ. Epidemiology and susceptibility of 3,051 Staphylococcus aureus isolates from 25 university hospitals participating in the European SENTRY study. *J Clin Microbiol.* 2001;39(10):3727-32.
89. Hsueh PR, Teng LJ, Chen WH, Pan HJ, Chen ML, Chang SC, Luh KT, Lin FY. Increasing prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus causing nosocomial infections at a university hospital in Taiwan from 1986 to 2001. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Apr;48(4):1361-4.
90. Salgado CD, Farr BM, Calfee DP. Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus: a meta-analysis of prevalence and risk factors. *Clin Infect Dis.* 2003;36(2):131-9
91. Derbentli Ş. Cerrahi infeksiyonlarda dirençli gram pozitif bakteri sorunu. *ANKEM Derg .* 18(Ek 2): 215-221: (2004).
94. Bozca B, Coşkun SA, Biçer KÇ, Genç VE, Özgenç O. Stafilokoklarda metisilin direnç oranlarının saptanması. *ANKEM Derg* 2007;21(Ek1):S26.
95. Güner S, Gürler N. 2001-2006 yıllarında cerehat ve yara örneklerinden izole edilen stafilokok suşlarında metisilin direnci. *ANKEM Derg* 2007;21(Ek1):S27.
96. Dünder D, Sönmez Tamer G. Klinik örneklerden izole edilen Staphylococcus aureus suşlarının antimikrobial duyarlılıkları: Üç yıllık değerlendirme *ANKEM Derg* 2009;23(1):8-12
97. Kurutepe S, Sürücüoğlu S, Gazi H, Teker A, Özbakkaloğlu B. Metisiline-dirençli ve duyarlı Staphylococcus aureus suşlarının antibiyotiklere direnç oranları, *İnfeksiyon Derg* 2007;21(4):187-91

98. Gürsoy NF, Ersoy Y, Günel S, Kuzucu Ç. Kan kültürlerinden izole edilen Staphylococcus aureus suşlarının antibiyotiklere direnç durumlarının değerlendirilmesi, *ANKEM Derg* 2009;23(1):26-9.
99. Türk Dağı H, Arslan U, Tuncer İ. Kan kültürlerinden izole edilen Staphylococcus aureus suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları, *ANKEM Derg* 2011;25(2):84-8
100. Tuncer İ, Kalem F, Çoşar M, Arslan U. Antibiotic susceptibility of Staphylococcus aureus strains isolated from bloodstream infections, *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2009;39(1-2):22-6.
101. Sesli Çetin E, Kaya S, Pakbaş İ, Demirci M. Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları, *İnönü Üniv Tıp Fak Derg* 2007;14(2):69-73.
102. Serdar GÜNGÖR, Berrin KARAAYAK UZUN, Süreyya GÜL YURTSEVER, Nurten BARAN. Kan kültürlerinden izole edilen S.aureus suşlarında antibiyotiklere direnç. *ANKEM Derg* 2012;26(4):171-175
103. Soner Yılmaz, Ramazan Gümral, Mustafa Güney, Orhan Bedir, Aylin Üsküdar Güçlü, Serhat Duyan, Ahmet Celal Başustaoğlu. Evaluation of microorganisms isolated from blood cultures and their susceptibility to antibiotics in two year period. *Gulhane Med J.* 2013; 55(4): 247-252
104. Doğruman A F, Akca G, Sipahi B, Sultan N: Kan örneklerinden soyutlanan stafilokok suşlarının antibiyotiklere direnç durumları, *ANKEM Derg* 2005;19(1):14-6.
105. Yücel Duman, Ayfer Serindağ, Mehmet S.Tekerekoğlu. Klinik örneklerden İzole Edilen Staphylococcus aureus'ların Antimikrobiyallere Direnç Durumu .İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2009;16 (3):145-148
106. Asiye ALTINÖZ AYTAZ, Şükrü ÖKSÜZ, İdris ŞAHİN, C. Elif ÖZTÜRK, Fatma AVCIOĞLU. Kan Kültürlerinden izole edilen S.aureus suşlarında antibiyotiklere direnç. *ANKEM Derg* 2013;27(2):60-63
107. Velasco D, Tomas M.M, Cartelle M, Beceiro A, Perez A, Molina F et al. Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in Staphylococcus aureus. *J Antimicrob Chemother* . (2005) 55: 379-382

108. Hasbek M, Hakgüdener Y, Kaya S, Bakıcı ZM. Stafilokoklarda metisilin direncinin farklı yöntemlerle belirlenmesi ve çoğul antibiyotik direnci. C.Ü Tıp Fakültesi Dergisi 2002;24(4): 179-184
109. Cauwelier B, Gordts B, Descheemaeker P, Van Landuyt H. Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004; 23: 867-8.
110. Cosimo Fuda, Maxim Suvorov, Sergei B. Vakulenko, and Shahriar Mobashery. The Basis for Resistance to Beta-Lactam Antibiotics by Penicillin binding Protein 2a of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Biological Chemistry*, 2004; 279: 40802-40806
111. Chambers HF. Methicillin Resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. *Clinical Microbiology Reviews* 1997;10:781-91.
112. Perez L.R.R, Antunes A.L.S, Barth A.L, Azvedo P.A. Variations of agar screen test for detection of methicillin resistance in staphylococci: focus on cefoxitin. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 26: 267-270: (2007)
113. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 24th Informational Supplement M100-S24, 2014. CLSI, Wayne, PA.
114. G. E. Fosheim, A. C. Nicholson, V. S. Albrecht, and B. M. Limbago. Multiplex Real-Time PZR Assay for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and Associated Toxin Genes. J Clin Microbiol Aug. 2011, p. 3071–3073
115. Kim JU, Cha CH, An HK, Lee HJ, Kim MN. Multiplex real-time PCR assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains suitable in regions of high MRSA endemicity. J Clin Microbiol. 2013 Mar;51(3):1008-13
116. C. Cuny and W. Witte. PCR for the identification of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains using a single primer pair specific for SCCmec elements and the neighbouring chromosome-borne orfX. Clin Microbiol Infect 2005; 11: 834–837
117. Grant A. Hill-Cawthorne, Lyndsey O. Hudson, Moataz Fouad Abd El Ghany, Olaf Piepenburg, Mridul Nair, Andrew Dodgson, Matthew S. Forrest, Taane G. Clark, Arnab Pain1. Recombinations in Staphylococcal Cassette Chromosome mec Elements Compromise

the Molecular Detection of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. (2014) PLoS ONE 9(6): e101419. doi:10.1371/journal.pone.0101419

118. Xiaoliang Ba, Ewan M. Harrison, Giles F. Edwards, Matthew T. G. Holden, Anders Rhod Larsen, Andreas Petersen, Robert L. Skov, Sharon J. Peacock, Julian Parkhill, Gavin K. Paterson and Mark A. Holmes. Novel mutations in penicillin-binding protein genes in clinical *Staphylococcus aureus* isolates that are methicillin resistant on susceptibility testing, but lack the *mec* gene. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 594–597

119. Cesur S, Yildiz E, Irmak H, et al. Evaluation of oxacillin resistance screening agar and chromogenic MRSA agar media for the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44(2): 279-284.

120. Swenson JM, Lonsway D, McAllister S, Thompson A, Jevitt L, Zhu W, Patel JB. Detection of *mecA* -mediated resistance using reference and commercial testing methods in a collection of *Staphylococcus aureus* expressing borderline oxacillin MICs. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 58: 33-39: (2007).

121. Felten A, Grandry B, Lagrange PL, Casin I. Evaluation of three techniques for the detection of low level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : a disk diffusion method with cefoxitin and moxolactam, the Vitek-2 system and the MRSA-screen latex agglutination test. *J. Clin. Microbiol*. 40: 2766-2771: (2002)

122. Mimica BJ, Berezin EN, Carvalho RLB et al. Detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from pediatric patients: is the cefoxitin disk diffusion test accurate enough? *Braz J Infect Dis* . 11 (4): 415-417: (2007)

123. Salimnia H, Brown WJ. Comparison of Phoenix oxacillin and cefoxitin MIC's Microscan oxacillin MIC, oxacillin and cefoxitin disk diffusion, and *mecA* gen detection. Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) 2005 konferansı poster sunusu.

124. Rohrer S, Tschierske M, Zbinden R, Berger-Bächi B. Improved methods for detection of methicillin-resistant *S. aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2001;20(4):267-70

125. Nicole M. Broekema, Tam T. Van, Timothy A. Monson, Steven A. Marshall, and David M. Warshauer. Comparison of Cefoxitin and Oxacillin Disk Diffusion Methods for Detection of *mecA*-Mediated Resistance in *Staphylococcus aureus* in a Large-Scale Study. *J Clin Microbiol.*, Jan. 2009, p. 217–219

126. KB Anand, P Agrawal, S Kumar, K Kapila Comparison of cefoxitin disc diffusion test, oxacillin screen agar, and PCR for *mecA* gene for detection of MRSA.. Indian J Med Microbiol. 2009 Jan-Mar;27(1):27-9
127. Rashed HA, Afifi NA, Abdel-Raheem MS, Abdel-Rahman MZ. Comparison of different phenotypic and molecular methods for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care patients. Egypt J Immunol. 2010;17(2):45-55.
128. Bhutia KO, Singh TS, Biswas S, Adhikari L. Evaluation of phenotypic with genotypic methods for species identification and detection of methicillin resistant in *Staphylococcus aureus* Int J Appl Basic Med Res. 2012 Jul;2(2):84-91.
129. Priya Datta, Neelam Gulati, Nidhi Singla, Hena Rani Vasdeva, Kiran Bala, Jagdish Chander and Varsha Gupta. Evaluation of various methods for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains and susceptibility patterns. Journal of Medical Microbiology (2011), 60, 1613–1616
130. Farahani A, Mohajeri P, Gholamine B, Rezaei M, Abbasi H. Comparison of different phenotypic and genotypic methods for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. N Am J Med Sci. 2013 Nov;5(11):637-40
131. Telli M, Sümerkan B, Eşel D. *Staphylococcus aureus*'ta metisilin direncinin belirlenmesinde sefoksitin disk, oksasilin disk, oksasilin agar tarama ve PBP2A lateks testlerinin karşılaştırılması. Infeks Derg . 20(2): 93-96: (2006)
132. Adaleti R, Nakipoglu Y, Karahan ZC, Tasdemir C, Kaya F. Comparison of polymerase chain reaction and conventional methods in detecting methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Infect Dev Ctries. 2008 Feb 1;2(1):46-50.
133. Ozel G, Aslan V, Bahar Erdem G, Cagatay M, Sencan I, Mert A. Comparison of oxacillin, cefoxitin, ceftizoxime, and moxalactam disk diffusion methods for detection of methicillin susceptibility in staphylococci. Mikrobiyol Bul 2011; 45(2): 258-65
134. Iraz Meryem, Tekerekoglu Mehmet Sait, Otlu Baris, Ay Selma. Comparison of an automated system with four phenotypic methods for the detection of methicillin-resistant

*Staphylococcus aureus*. African Journal of Microbiology Research Vol. 6(4), pp. 764-769, 30 January, 2012

135. UZUN Berrin, ŞENER Aslı Gamze KARATAŞ, GÜNGÖR Serdar, AFŞAR İlhan, ERGİN Özlem YÜKSEL, DEMİRCİ Mustafa. *Staphylococcus aureus* Suşlarındaki Metisilin Direncinin Belirlenmesinde Sefoksitin Disk Diffüzyon Testi, Otomatize Sistem ve Kromojenik Besiyerinin Karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul 2013; 47(1): 11-18

136. Coban AY, Darka O, Taşdelen Fişgin N, Aksakal Tanyel E, Cetinkaya Sensoy E, Hepsert SA, Birinci A, Durupinar B. : use of cefoxitin disc diffusion method for the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. Mikrobiyol Bul. 2007 Jan;41(1):109-13.

137. Spanu T, Sanguinetti M, D’Inzeo T et al. Identification of methicillin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci responsible for bloodstream infections with the Phoenix<sup>TM</sup> system. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2004;48:221-27.

138. Yamazumi T, Marshall SA, Wilke WW, Diekema DJ, Pfaller MA, Jones RN. Comparison of the Vitek Gram-Positive Susceptibility 106 card and the MRSA- screen latex agglutination test for determining oxacillin resistance in clinical bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2001;39(1):53-6.

139. Sakoulas G, Gold HS, Venkataraman L, Degirolami PC, Eliopoulos GM, Qian Q. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* : Comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA* positive susceptible strains. J Clin Microbiol . 39: 3946-3951: (2001)

140. J.-L. Donay, D. Mathieu, P. Fernandes, C. Pr´egermain, P. Bruel, A. Wagnier, I. Casin,1 F. X. Weill, P. H. Lagrange, and J. L. Herrmann. Evaluation of the Automated Phoenix System for Potential Routine Use in the Clinical Microbiology Laboratory. J Clin Microbiol, 2004, p. 1542–1546

141. Ishii Y, Alba J, Maehara C, et al. Identification of biochemically atypical *S. aureus* clinical isolates with three automated identification systems. J Med Microbiol 2006; 55(4): 387-92.

142. Roisin S, Nonhoff C, Denis O, Struelens M. Evaluation of new Vitek 2 card and disk diffusion method for determining susceptibility of *Staphylococcus aureus* to oxacillin. *J Clin Microbiol* 2008; 46(8): 2525-8.
143. Junkins AD, Lockhart SR, Heilmann KP, et al. BD and Vitek 2 detection of *mecA*-mediated resistance in *Staphylococcus aureus* with cefoxitin. *J Clin Microbiol* 2009; 47(9): 2879- 82.
144. Antonella Mencacci, Ines Montecarlo, Francesca Gonfia, Amedeo Moretti, Angela Cardaccia, Senia Farinelli, Maria Rita Pagliochini, Angela Giuliani, Michela Basileo, Maria Bruna Pasticci, Francesco Bistoni. . Comparison of the BD Phoenix System with the Cefoxitin Disk Diffusion Test for Detection of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative *Staphylococci*. *J Clin Microbiol* 2009; p. 2288–2291.
145. Bukhari SZ, Ahmed S, Zia N. Antimicrobial susceptibility pattern of *Staphylococcus aureus* on clinical isolates and efficacy of laboratory tests to diagnose MRSA: a multi-centre study. *J Ayub Med Coll Abbottabad*. 2011 Jan-Mar;23(1):139-42.
146. Atay T, Gulay Z. Comparison of PBP2a latex agglutination test with disk diffusion, *mecA* PCR and Vitek for the detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *ANKEM* 2004; 18(4): 205-8.
147. Dr. Aygöl TURAÇ BİÇER, Hastane izolatu *S.aureus* ve koagülaz negatif stafilokok suşlarında metisilin direncini farklı yöntemlerle araştırılması. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi 2009.
148. Emine SEVGİCAN, Melda SINIRTAŞ, Cüneyt ÖZAKIN, Suna GEDİKOĞLU. *Staphylococcus* türlerinde metisilin direncinin farklı yöntemlerle saptanması. *İnfeksiyon Dergisi* 2009; 23 (2): 63-68
149. Iraz Meryem, Tekerekoglu Mehmet Sait, Otlu Baris, Ay Selma. Comparison of an automated system with four phenotypic methods for the detection of methicillin- resistant *Staphylococcus aureus*. *African Journal of Microbiology Research* Vol. 6(4), pp. 764-769, 30 January, 2012
150. Berrin UZUN, Aslı Gamze KARATAŞ ŞENER, Serdar GÜNGÖR, İlhan AFŞAR, Özlem YÜKSEL ERGİN, Mustafa DEMİRCİ. *Staphylococcus aureus* Suşlarındaki Metisilin

Direncinin Belirlenmesinde Sefoksitin Disk Diffüzyon Testi, Otomatize Sistem ve Kromojenik Besiyerinin Karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul 2013; 47(1): 11-18

151. Cekin Y, Yazisiz H, Kuskucu MA, Ongut G, Baysan BO, Kilinckaya H, Ogunc D, Midilli K, Ozen NS, Colak D. Evaluation of the BD Phoenix system for detection of methicilin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates in comparison to BD GeneOhm MRSA assay. Clin Lab. 2014;60(5):863-7

152. Garcia-Alvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, Walpole E, Brooks K, Pickard DJ, Teale C, Parkhill J, Bentley SD, Edwards GF, Girvan EK, Kearns AM, Pichon B, Hill RL, Larsen AR, Skov RL, Peacock SJ, Maskell DJ, Holmes MA. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the United Kingdom and Denmark: a descriptive study. Lancet Infect. Dis. 2011;11:595–603./

153. Shore AC, Deasy EC, Slickers P, Brennan G, O’Connell B, Monecke S, Ehricht R, Coleman DC.. Detection of staphylococcal cassette chromosome *mec* type XI encoding highly divergent *mecA*, *mecI*, *mecR1*, *blaZ* and *ccr* genes in human clinical clonal complex 130 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 2011;55:3765–3773.

154. Harrison EM, Paterson GK, Holden MT, Morgan FJ, Larsen AR, Petersen A, Leroy S, De Vlieghe S, Perreten V, Fox LK, Lam TJ, Sampimon OC, Zadoks RN, Peacock SJ, Parkhill J, Holmes MA .A *Staphylococcus xylosus* isolate with a new *mecC* allotype. Antimicrob Agents Chemother. 2013 Mar;57(3):1524-8. doi: 10.1128/AAC.01882-12. Epub 2012 Dec 28.

155. Ito T, Hiramatsu K, Tomasz A, de Lencastre H, Perreten V, Holden MT, Coleman DC, Goering R, Giffard PM, Skov RL, Zhang K, Westh H, O’Brien F, Tenover FC, Oliveira DC, Boyle-Vavra S, Laurent F, Kearns AM, Kreiswirth B, Ko KS, Grundmann H, Sollid JE, John JF, Jr, Daum R, Soderquist B, Buist G. 2012. Guidelines for reporting novel *mecA* gene homologues. Antimicrob. Agents Chemother. 56:4997–4999

156. Kriegeskorte A, Ballhausen B, Idelevich EA, Köck R, Friedrich AW, Karch H, Peters G, Becker K.. Human MRSA isolates with novel genetic homolog, Germany. Emerg. Infect. Dis. 2012;18:1016–1018.

157. Cuny C, Layer F, Strommenger B, Witte W.. Rare occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC130 with a novel *mecA* homologue in humans in Germany. *PLoS One* 6: 2011 ; 24360. doi:10.1371
158. Hellmann J, Olsson-Liljequist B. 2012.. A report on Swedish antibiotic utilisation and resistance in human medicine. Swedish Institute for Communicable Disease Control, Solna, Sweden.
159. Laurent F, Chardon H, Haenni M, Bes M, Reverdy ME, Madec JY, Lagier E, Vandenesch F, Tristan A.. MRSA harboring *mecA* variant gene *mecC*, France. *Emerg. Infect. Dis.* 2012;18:1465–1467.
160. Medhus A, Slettebo JS, Marstein L, Larssen KW, Sunde M. 2013. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with the novel *mecC* gene variant isolated from a cat suffering from chronic conjunctivitis. *J. Antimicrob. Chemother.* 68:968–969.
161. Loncaric I, Kübber-Heiss A, Posautz A, Stalder GL, Hoffmann D, Rosengarten R, Walzer C *mecC*- and *mecA*-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from livestock sharing habitat with wildlife previously tested positive for *mecC*-positive MRSA. *Vet Dermatol.* 2014 Apr;25(2):147-8.
162. Ariza-Miguel J, Hernández M, Fernández-Natal I, Rodríguez-Lázaro D. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Harboring *mecC* in Livestock in Spain. *J Clin Microbiol.* 2014 Nov;52(11):4067-9.
163. Paterson GK, Harrison EM, Holmes MA. The emergence of *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* 2014 Jan;22(1):42-7. doi: 10.1016
164. Petersen A, Stegger M, Heltberg O, Christensen J, Zeuthen A, Knudsen LK, Urth T, Sorum M, Schouls L, Larsen J, Skov R, Larsen AR. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the novel *mecC* gene in Denmark corroborates a zoonotic reservoir with transmission to humans. *Clin Microbiol Infect.* 2013 Jan;19(1):E16-22.
165. G. K. Paterson<sup>1</sup>, F. J. E. Morgan, E. M. Harrison<sup>1</sup>, E. J. P. Cartwright, M. E. Torok, R. N. Zadoks, J. Parkhill, S. J. Peacock and M. A. Holmes. Prevalence and characterization of human *mecC* methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in England. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 907–910

166. García-Garrote F, Cercenado E, Marín M, Bal M, Trincado P, Corredoira J, Ballesteros C, Pita J, Alonso P, Vindel A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene: emergence in Spain and report of a fatal case of bacteraemia. *J Antimicrob Chemother.* 2013
167. Basset P, Prod'hom G, Senn L, Greub G, Blanc DS. Epub 2013 Feb 4. Very low prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene in western Switzerland. *J Hosp Infect.* 2013 Mar;83(3):257-9.
168. Stegger M, Andersen PS, Kearns A, Pichon B, Holmes MA, Edwards G, Laurent F, Teale C, Skov R, Larsen AR. Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecALGA251*. *Clin. Microbiol. Infect.* 2012. 18:395–400
169. Deplano A, Vandendriessche S, Nonhoff C, Denis O. Genetic diversity among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying the *mecC* gene in Belgium. *J Antimicrob Chemother.* 2014 Jun;69(6):1457-60
170. Anuradha Ganesan, Katrina Crawford, Katrin Mende, Clinton K. Murray, Bradley Lloyd, Michael Ellis, David R. Tribble, Amy C. Weintrobe. Evaluation for a Novel Methicillin Resistance (*mecC*) Homologue in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates Obtained from Injured Military Personnel. *Journal of Clinical Microbiology* 2013. p. 3073–3075
171. Dermota U, Zdovc I, Strumbelj I, Grmek-Kosnik I, Ribic H, Rupnik M, Golob M, Zajc U, Bes M, Laurent F, Mueller-Premru M: Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the *mecC* gene in human samples in Slovenia. *Epidemiol Infect.* 2014 Jul .
172. Skov R, Larsen AR, Kearns A, Holmes M, Teale C, Edwards G, Hill R. Phenotypic detection of *mecC*-MRSA: cefoxitin is more reliable than oxacillin. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Sep
173. Edward J. P, Gavin K. Paterson, Kathy E. Raven, Ewan M. Harrison, Theodore Gouliouris, Angela Kearns, Bruno Pichon, Giles Edwards, Robert L. Skov, Anders R. Larsen, Mark A. Holmes, Julian Parkhill, Sharon J. Peacock, M. Estée Török. Use of Vitek 2

Antimicrobial Susceptibility Profile To Identify *mecC* in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2013 Aug;51(8):2732-4

174. Karsten Becker, Anders R. Larsen, Robert L. Skov, Gavin K. Paterson, Mark A. Holmes, Artur J.Sabat, Alexander W.Friedrich, RobinKöck, GeorgPeters,André Kriegeskorte. Evaluation of a Modular Multiplex-PCR Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Detection Assay Adapted for *mecC* Detection. Journal of Clinical Microbiology. 2013. p. 1917–1919

175. Porrero MC, Valverde A, Fernández-Llario P, Díez-Guerrier A, Mateos A, Lavín S, Cantón R, Fernández-Garayzabal JF, Domínguez L. *Staphylococcus aureus* carrying *mecC* gene in animals and urban wastewater, Spain. Emerg Infect Dis. 2014 May;20(5):899-901.

176. Pakaştıçalı Nagehan, Kaya Gamze, Kipritçi, Tamay Öner Zeynep. Kistik Fibrozlu Hastaların Solunum Yolu Örneklerinde Metisiline Duyarlı *Staphylococcus aureus* ve Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* Prevalansları ve Antibiyotik Duyarlılıkları. Poster Sunum; 8. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi. Ankara .2014

177. Alkım Yolcu, Meral Biçmen, Zeynep Gülay. Metisiline dirençli *S.aureus*larda *mecC* geninin Araştırılması. Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı-Araştırma Ödülü

178. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları Sayfa 7 /22 AMD Testleri / Mikrobiyolojik Tanımlama AMD-MT-01 / Sürüm: 1.0 / 01.01.2014

179. Voyich JM, Otto M, Mathema B, et al. Is Pantone-Valentine leukocidin the major virulence determinant in community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* disease? J Infec Dis 2006; 194: 1761-70.

180. Boyle-Vavra S, Daum RS. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Pantone-Valentine leukocidin. Lab Invest 2006; 87(1): 3-9

181. Gillet-Vittori L, Afanetti M, Dupont A, Gondon E, Dupont D. Life-threatening Pantone-Valentine leukocidin-associated staphylococcal infections in children. A broad spectrum of clinical presentations. Arch Pediatr. 2014 Oct 2.

182. Chen J, Luo Y, Zhang S, Liang Z, Wang Y, Zhang Y, Zhou G, Jia Y, Chen L, She D . Community-acquired necrotizing pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* producing Panton-Valentine leukocidin in a Chinese teenager: case report and literature review. *Int J Infect Dis*. 2014 Sep;26:17-21.
183. Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect Dis* 2001; 7(2): 178-82.
184. Chini V, Petinaki E, Foka A, Paratias S, Dimitracopoulus G, Sipiliopoulou I. Spread of *Staphylococcus aureus* clinical isolates carrying Panton–Valentine leukocidin genes during a 3-year period in Greece. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 29-34.
185. Anne Tristan, Michele Bes, Helene Meugnier, Gerard Lina, Bülent Bozdogan, Patrice Courvalin, Marie-Elisabeth everdy, Mark C. Enright, François Vandenesch, and Jerome Etienne. Global Distribution of Panton-Valentine Leukocidin positive Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis*. 2007 Apr; 13(4): 594–600
186. Health Protection Agency. PLV-*Staphylococcus aureus* infections: an update. Health Protection Report 2011; 5(7): news.Available from:<http://www.hpa.org.uk/hpr/archives/2011>.
187. Löffler B, Hussain M, Grundmeier M, et al. *Staphylococcus aureus* panton-valentine leukocidin is a very po- tent cytotoxic factor for human neutrophils. *PLoS Pathog* 2010; 6(1)
188. Cirit OS. *Staphylococcus aureus* klinik izolatlarında Panton-Valentin lökosidin varlığının araştırılması. Uzmanlık Tezi, 2009. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Samsun
189. Özkul H, Öktem MA, Gülay Z. Investigation of the presence of Panton-Valentin leucocidin (PVL) in *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical samples. *Mikrobiyol Bul* 2007; 41: 357-62.
190. Karahan ZC, Tekeli A, Adaleti R, et al. Investigation of Panton-Valentine leukocidin genes and SCCmec types in clinical *Staphylococcus aureus* isolates from Turkey. *Microb Drug Resist* 2008; 14(3): 203-10.
191. Gülmez D, Sancak B, Ercis S, Karakaya J, Haşçelik G. Investigation of SCCmec types and Panton-Valentine leukocidin in community-acquired and nosocomial *Staphylococcus aureus* strains: comparing skin and soft tissue infections to the other infections. *Mikrobiyol Bul*. 2012 Jul;46(3):341-51.

192. Kirdar S, Arslan U, Tuncer I, Findik D, Bozdoğan B. Investigation of the clonality and Pantón-Valentine leukocidin toxin among nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Mikrobiyol Bul* 2009; 43(4): 529-33. 32.
193. Tekeli A, Koyuncu E, Dolapçı I, Akan OA, Karahan ZC. Molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from blood cultures between 2002-2005 in Ankara University Hospital. *Mikrobiyol Bul* 2009; 43(1): 1-10.
194. AKOĞLU Hadim, ZARAKOLU, ALTUN Pınar Belgin, ÜNAL Serhat. Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesinde 2004-2005 yıllarında hastane kaynaklı metisiline dirençli *S.aureus* suşlarının epidemiyolojik ve moleküler özellikleri. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44: 343-355
195. YILMAZ Soner, KILIÇ Abdullah, KARAGÖZ, BEDİR Alper Orhan, ÜSKÜDAR Aylin GÜÇLÜ, BAŞUSTAOĞLU. Ahmet Celal Hastane ve Toplum Kaynaklı *Staphylococcus aureus* İzolatlarında Çeşitli Virülans Faktörlerinin Gerçek Zamanlı PCR Yöntemiyle Araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2012; 46(4): 532-545
196. DUMAN Yücel, TEKEREKOĞLU Mehmet Sait, OTLU Barış. Toplum ve Hastane Kökenli *Staphylococcus aureus* Klinik İzolatlarında Pantón-Valentine Lökosidin Varlığının ve Klonal İlişkinin Araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47(3): 389-400
197. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI document M100-S23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013

