

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN KOAGÜLAZ
NEGATİF STAFİLOKOKLARDA *sasX*, ACME VE ÇEŞİTLİ
VİRULANS FAKTÖRLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
DR. BÜŞRA DÖNMEZ**

**DANIŞMAN
PROF. DR. MELEK DEMİR**

DENİZLİ - 2023

**T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN KOAGÜLAZ
NEGATİF STAFİLOKOKLARDA *sasX*, ACME VE ÇEŞİTLİ
VİRULANS FAKTÖRLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ
DR. BÜŞRA DÖNMEZ**

**DANIŞMAN
PROF. DR. MELEK DEMİR**

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 26.05.2022 tarih ve
2022TIPF014 nolu kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ - 2023

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanma aşamasından itibaren tüm süreçlerde bilgi ve deneyimleriyle beni yönlendiren, destek olan danışman hocam sayın Prof. Dr. Melek Demir'e

Asistanlık eğitim sürecinde bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım anabilimdalı başkanım Prof. Dr. İlknur Kaleli ve bölüm hocalarım Prof. Dr. Çağrı Ergin, Doç. Dr. Sedef Zeliha Öner, Doç. Dr. Ergun Mete, Doç. Dr. Ahmet Çalışkan ve Dr. Öğr. Üyesi. Mustafa Şengül'e

Asistan arkadaşlarım; Dr. Hatice Er, Dr. Saniye Küçükakın Yaka, Dr. Gözde Gülcan Ünal, Dr. Hatice Özdemir, Dr. Burhan Özkan, Dr. Esra Karaday, Dr. Nilay Genç, Dr. Merve Günay, Dr. Mehmet Atça, Dr. Deniz Dereli, Dr. Betül Aydın ve Dr. Hacer Sena Uzan'a

Tezimin istatistik çalışmalarındaki desteği için Dr. Ceyda Gökçen Gökdeniz'e ve beraber çalıştığım tüm mesai arkadaşlarıma

Her zaman sevgi ve desteklerini yanı başımda hissettiğim aileme teşekkürlerimle.

Ve teşekkürlerin en büyüğü, ilki ve sonu en sevdiğime ...

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

ONAY SAYFASI	III
TEŞEKKÜR	IV
İÇİNDEKİLER	V
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ	IX
ÖZET.....	XI
SUMMARY.....	XIV
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
KOAGULAZ NEGATİF STAFİLOKOKLAR	3
Koagülaz Negatif Stafilocoklarda Virulans Faktörleri ve Patogeneze...5	
Koagülaz Negatif Stafilocokların Neden Olduğu Enfeksiyonlar.....	18
Koagülaz Negatif Stafilocokların Laboratuvar Tanısı	23
GEREÇ VE YÖNTEM	25
BULGULAR	36
TARTIŞMA.....	58
SONUÇLAR	79
KAYNAKLAR.....	82

SİMGELER VE KISALTMALAR

Aap	: Birikimle ilişkili protein
ACME	: Arjinin Katabolik Mobil Element
AMP	: Antimikrobiyal peptit
ATCC	: Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu
AtlE/ L/ WM	: Yüzey ilişkili otolizin/adezin
Bap	: Biyofilm ilişkili protein
BHI	: Brain heart infüzyon
Bhp	: Biyofilm ilişkili protein homoloğu
Ccr	: Rekombinaz kodlayan genler
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
ClfA/B	: Kümelenme faktörü
eDNA	: Ekstraselüler DNA
Embp	: Hücre dışı matriks bağlayıcı protein
EUCAST	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
Fbe	: Fibrinojen bağlayıcı protein
FnBPA/B	: Fibronektin bağlayıcı protein
H2O2	: Hidrojen peroksit
IS256	: Ekleme dizisi
İE	: İnfektif endokardit
KDE	: Kan dolaşım enfeksiyonları
KİKDE	: Kateter ilişkili kan dolaşım enfeksiyonları
KNS	: Koagülaz Negatif Stafilokok
Kob/ml	: Koloni oluşturan birim/ml
LTA	: Lipoteikoik asit
MALDI-TOF-MS	: Matriks Assisted Lazer Desorption İonization Time of Flight Massspectrometry
MGE	: Mobil Genetik Element
MHA	: Mueller Hinton Agar
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MRSA	: Metisilin dirençli S. aureus

MRSE	: Metisilin dirençli S. epidermidis
MSCRAMM	: Matriks proteinlerini tanıyan mikrobiyal yüzey bileşenleri
MSSE	: Metisilin duyarlı S.epidermidis
NK	: Negatif kontrol
oDc	: Optik dansite
PBP1,2,3,4	: Penisilin bağlayıcı protein
PBS	: Fosfat tamponlu salin
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PEE	: Prostetik eklem enfeksiyonları
PİA	: Polisakkarit intraselüler adezin
PK	: Pozitif kontrol
PNAG	: Poli N asetilglukozamin
PSM	: Fenolde çözünen modüller
PYR	: L-pirolidonil- β -naftilamid
Rpm	: Revolutions per minute (dakikadaki dönme sayısı)
rRNA	: Ribozomal DNA
SCC	: Stafilokok kaset kromozom
Sdr	: Serin /Aspartat tekrar ailesi
SVK	: Santral venöz kateter
TBE	: Tris/Borate/EDTA solüsyonu
TK-MRSA	: Toplum kaynaklı metisilin dirençli S. aureus
TMP-SXT	: Trimetoprim sülfametaksazol
Tn4001	: Transpozon
vWF	: Von Willebrand faktörü
WTA	: Hücre duvarı teikoik asiti

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1	Biyofilm gelişim aşamaları.....	7
Şekil 2	Biyofilm gelişiminde rol alan İca lokusu.....	10
Şekil 3	KNS enfeksiyonları için zemin hazırlayıcı faktörler	18
Şekil 4	KNS suşlarının izole edildiği hastaların servislere göre dağılımı	36
Şekil 5	Etken ve Kontaminasyon grubundaki suşların kan kültürlerinde pozitif sinyal verme zamanına göre dağılımı	38
Şekil 6	Mikrotitrasyon plağında biyofilm oluşumu sonuçları	43
Şekil 7	MecA pozitifliği olan suşların türlere göre dağılımı	45
Şekil 8	MecA geninin PCR jel elektroforez görüntüleri.....	45
Şekil 9	SasX gen bölgesi pozitif saptanmış KNS suşlarının türlere göre dağılımı	46
Şekil 10	SasX geninin jel elektroforez görüntülemesi.....	47
Şekil 11	ACME pozitif suşların türler arasındaki dağılımı	48
Şekil 12	ACME ArcA, Opp3B ve KdpA genlerinin multipleks PCR ile jel elektroforez görüntüsü	49
Şekil 13	İcaA geninin jel elektroforez görüntülemesi	51
Şekil 14	İcaD geninin jel elektroforez görüntülemesi	52
Şekil 15	IS256 geninin jel elektroforez görüntülemesi	53
Şekil 16	Bhp geninin jel elektroforez görüntülemesi	55
Şekil 17	Aap geninin jel elektroforez görüntülemesi	56

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 1	Sık Tanımlanan KNS Türleri, İzolasyon Kaynakları ve Klinik İlişkileri ..	4
Tablo 2	<i>S. epidermidis</i> ve Diğer KNS Türlerinde Tanımlanmış Virulans Faktörleri	6
Tablo 3	ACME Tiplendirmesi.....	13
Tablo 4	KNS'lerle Meydana Gelen Enfeksiyonlarda Kullanılan Antibiyotikler ve Direnç Mekanizmaları	17
Tablo 5	İzole Edilmiş Olan KNS Suşlarının Etken Kontaminant Kabul Edilme Kriterleri	26
Tablo 6	Biyofilm İlişkili Genlerin Araştırılmasında Kullanılan Primerler, PCR Döngü Koşulları ve Amplifiye Edilen Ürünlerin Boyutları	35
Tablo 7	Etken ve Kontaminasyon Grubunda Kateter Varlığının Dağılımı.....	37
Tablo 8	Etken ve Kontaminasyon Grubundaki KNS'lerin Tür Düzeyinde Dağılımı	38
Tablo 9	Etken ve Kontaminasyon Grubundaki Metisilin Direncinin Türlerle Göre Oksasilin MİK ve Sefoksitin Disk Difüzyon Yöntemiyle Karşılaştırması	39
Tablo 10	Etken ve Kontaminasyon Grubunda Türlerle Göre Antibiyotik Duyarlılığı.....	41
Tablo 11	Etken ve Kontaminasyon Grubundaki Suşlarda Biyofilm Oluşum Oranları	43
Tablo 12	Metisilin Direncinin Fenotipik ve Genotipik Yöntemler İle Tespit Edilen Oranları	44
Tablo 13	Etken ve Kontaminasyon Grubunda Sasx Pozitifliğinin Dağılımı.....	46
Tablo 14	ACME <i>ArcA</i> , <i>Opp3B</i> Ve <i>KdpA</i> Genlerinin KNS Türlerine ve Gruplara Göre Dağılımı	48
Tablo 15	Türlere ve Gruplara Göre ACME Pozitif Suşların Tiplendirmesi	49
Tablo 16	Biyofilm İlişkili Genler <i>İcaA</i> , <i>İcaD</i> , <i>IS256</i> , <i>Aap</i> ve <i>Bhp</i> 'nin Tür ve Gruplara Göre Dağılımı.....	50
Tablo 17	Biyofilm Oluşumu ve İca Gen Bölgelerinin Varlığının Karşılaştırması.	53
Tablo 18	<i>İcaA</i> ve <i>İcaD</i> Pozitif Suşlarda <i>IS256</i> Pozitifliği.....	54

Tablo 19 Etken Ve Kontaminasyon Grubunda <i>Aap</i> ve <i>Bhp</i> Gen Bölgelerinin Pozitifliğinin Dağılımı.....	56
Tablo 20 <i>İca</i> Genleri Negatif Olan Suşlarda <i>Aap</i> Pozitifliği.....	57



ÖZET

Kan Kültürlerinden İzole Edilen Koagülaz Negatif Stafiloklarda *sasX*, ACME ve Çeşitli Virülans Faktörlerinin Araştırılması

Dr. Büşra Dönmez

Hastanede uzun süre yatışlara bağlı kateterizasyon işlemlerinin artması ve implante edilebilir tıbbi cihazların yaygın kullanımı nedeniyle koagülaz negatif stafilokokların (KNS) kan dolaşım enfeksiyonlarındaki rolü artmıştır. Bu çalışmada kan kültürlerinden izole edilmiş olan KNS suşlarında virülans ilişkili *sasX*, arjinin katabolik mobil element (ACME) genlerinin, biyofilm yapımının ve biyofilm ilişkili bazı virülans faktör genlerinin araştırılarak etken ve kontaminant olarak tanımlanmış suşlardaki sıklıklarının belirlenmesi amaçlandı.

Kan kültürlerinden izole edilen 150 KNS suşu çalışmaya dahil edildi. Klinik ve mikrobiyolojik veriler temel alınarak izole edilen suşların 50'si etken ve 100'ü kontaminasyon izolatu olarak gruplandırıldı. Suşlar otomatize bakteri tanımlama sistemi ile tür düzeyinde tanımlandı. *sasX*, ACME, *MecA* ve biyofilm ilişkili virülans faktör genlerinin varlığı inhouse PCR yöntemi ile araştırıldı. Fenotipik olarak biyofilm oluşumu mikropalak yöntemi ile araştırıldı.

Çalışmaya alınan KNS suşlarının 95'i (%63,3) *S. epidermidis*, 25'i (%16,7) *S. hominis*, 22'si (14,7) *S. haemolyticus*, 6'sı (%4) *S. capitis*, 1'i (%0,7) *S. intermedius* ve 1'i (%0,7) *S. warneri* olarak tanımlandı. Tüm suşların 125'inde (%83,3) *mecA* geni pozitif bulunurken etken ve kontaminasyon grupları arasında *mecA* pozitiflik oranı açısından fark bulunmadı ($p=0,877$).

sasX varlığı kontaminasyon grubunda 14 (%14) suшта, etken grubunda 5 (%10) suшта olmak üzere toplam 19 suшта pozitif bulundu. *sasX* pozitiflik oranı açısından etken ve kontaminasyon grubundaki suşlar arasında fark bulunmadı ($p=0,327$).

ACME ilişkili *ArcA*, *kdpA* ve *opp3B* operonlarının herhangi birinin varlığı kontaminasyon grubundaki suşların 32 (%32)'sinde, etken grubundaki suşların 6 (%12)'sında pozitif olarak saptandı. Gen bölgeleri ayrı olarak değerlendirildiğinde kontaminasyon grubundaki 30 (%30) suшта *ArcA* pozitif, 7 (%7) suшта *kdpA* pozitif, 8 (%8) suшта *opp3B* pozitif iken, etken grubunda ise 6 (%12) suшта *ArcA* pozitif, 1 (%2) suшта *kdpA* pozitif ve 3 (%6) suшта *opp3B* pozitif bulundu.

Kontaminasyon grubundaki suşlarda ACME ve *ArcA* pozitiflik oranı anlamlı düzeyde daha yüksek saptandı (sırasıyla $p=0,008$ ve $p=0,015$).

Fenotipik olarak biyofilm oluşturma özellikleri araştırıldığında tüm suşların 67'si (%44,7) biyofilm oluşturmazken, 39'u (%26) zayıf düzeyde, 15'i (%10) orta düzeyde, 29'u (%19,3) ise güçlü düzeyde biyofilm oluşturdu. Etken grubundaki suşların %52'sinde herhangi bir düzeyde biyofilm oluşumu saptanırken, kontaminasyon grubundaki suşlarda bu oran %57'di. Gruplar arasında biyofilm oluşturan suş oranı açısından anlamlı fark bulunmazken ($p=0,561$), kontaminasyon grubundaki suşların %14'ü, etken grubundaki suşların ise %30'unun güçlü düzeyde biyofilm oluşturduğu bulundu ve biyofilm oluşturma düzeyleri açısından gruplar arasındaki fark anlamlıydı ($p=0,027$).

Biyofilm ilişkili *IcaA*, *icaD*, *IS256*, *aap* ve *bhp* virülans genleri kontaminasyon grubundaki suşlarda sırasıyla %33, %45, %43, %74 ve %6 oranında, etken grubundaki suşlarda %64, %62, %64, %74 ve %8 oranında pozitif olarak bulundu. Etken grubunda *IcaA*, *IcaD* ve *IS256* pozitiflik oranları kontaminasyon grubuna göre anlamlı düzeyde daha yüksek bulunurken (sırasıyla $p<0,001$, $p=0,050$, $p=0,015$), *aap* ve *bhp* pozitiflik oranı açısından iki grup arasında fark bulunmadı.

IcaA ve *icaD* birlikte pozitifliği kontaminasyon grubunda %29, etken grubunda %56 oranında bulundu ve gruplar arasındaki fark anlamlıydı ($p=0,001$). *IcaA*, *icaD* ve *IS256* birlikte pozitifliği kontaminasyon grubundaki suşlarda %17 iken, etken grubundaki suşların %38'inde pozitif ve her üç geni birlikte bulundurma oranı açısından fark anlamlıydı ($p=0,005$). Çalışmaya alınan tüm suşlar içinde *icaA* ve *icaD*'nin birlikte pozitif olduğu toplam 57 suşun 46(%80,7)'sında herhangi bir düzeyde biyofilm oluşumu gözlenmiştir. *IcaA* ve *icaD*'nin birlikte pozitif olduğu suşlarda herhangi bir düzeyde biyofilm pozitiflik oranı, *IcaA* veya *icaD* 'nin tek başına pozitif olduğu veya her ikisinin negatif olduğu suşlara göre anlamlı düzeyde daha fazlaydı ($p<0,001$).

Sonuç olarak bu çalışmada güçlü biyofilm oluşturma, biyofilm ilişkili *icaA*, *icaD*, *IS256* genlerini tek ya da çoklu bulundurma oranı etken olarak sınıflandırılan suşlarda daha yüksek oranda saptanmışken, özellikle ACME ilişkili *ArcA* pozitifliği kontaminasyon grubundaki suşlarda daha yüksek oranda bulunmuştur.

Bu bulgular KNS suşlarında bazı gen bölgelerinin varlığının etken veya kontaminasyon ayırımında yol gösterici olabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: KNS, Kan kültürü, *sasX*, ACME, biyofilm



SUMMARY

Investigation of *sasX*, ACME and Various Virulence Factors in Coagulase Negative Staphylococci Isolated from Blood Cultures

Dr. Büşra Dönmez

The role of CoNS in blood stream infections has increased due to prolonged hospitalization, urinary and intravascular catheterization, increased health care services such as widespread use of implantable medical devices, and changes in the patient population (such as increased premature neonates; geriatric patients with multiple morbidity and chronic diseases, immunosuppressive patients). In this study, it was aimed to investigate virulence-related *sasX*, arginine catabolic mobile element (ACME) genes, biofilm production and some biofilm-related virulence factor genes in CoNS strains isolated from blood cultures and determine their frequency in strains identified as infectious agent and contaminant.

In total, 150 strains of CoNS isolated from blood cultures were included in the study. Based on clinical and microbiological data, 50 of the isolated strains were grouped as infectious agent and 100 as contamination isolates. The strains were identified at the species level with an automated bacterial identification system. The presence of *sasX*, ACME, *mecA* and biofilm-related virulence factor genes was investigated by the in-house PCR method. Phenotypically, biofilm formation was investigated by the micro-plaque method.

Of the CoNS strains included in the study, 95 (63.3%) were identified as *S. epidermidis*, 25 (16.7%) as *S. hominis*, 22 (14.7%) as *S. haemolyticus*, 6 (4%) as *S. capitis*, 1 (0.7%) as *S. intermedius* and 1 (0.7%) as *S. warneri*. Of all strains, 125 (83.3%) had the *MecA* gene positive, while no differences were found in the *MecA* positivity ratio between the infectious agent and contamination groups ($p=0.877$).

The presence of *sasX* was positive in the contamination group with 14 (14%) strains and in the infectious agent group with 5 (10%) strains, i.e. in 19 strains in total. No differences were found between the strains in the infectious agent and contamination groups in terms of the *sasX* positivity ratio ($p=0.327$).

The presence of any of the ACME-related *ArcA*, *kdpA*, and *opp3B* operons was found to be positive in 32 (32%) of the strains in the contamination group and 6 (12%)

of the strains in the infectious agent group. When the gene regions were evaluated separately, 30 (30%) strains in the contamination group were *ArcA* positive, 7 (7%) strains were *kdpA* positive, 8 (8%) were *opp3B* positive, 6 (12%) were *ArcA* positive, 1 (2%) was *kdpA* positive and 3 (6%) were *opp3B* positive. The ACME and *ArcA* positivity ratios were significantly higher in the strains in the contamination group ($p=0.008$ and $p=0.015$, respectively).

An examination of phenotypical biofilm-forming properties showed that 67 (44.7%) of all strains did not form a biofilm, 39 (26%) formed a weak biofilm, 15 (10%) a medium biofilm and 29 (19.3%) formed a strong biofilm. While 52% of the strains in the infectious agent group had any level of biofilm formation, this ratio was 57% in the strains in the contamination group. While there was no significant difference in the ratio of biofilm-forming strains between the groups ($p=0.561$), 14% of the strains in the contamination group and 30% of the strains in the infectious agent group were found to be strongly biofilm-forming, and the difference between the groups was significant in terms of their biofilm-forming level ($p=0.027$).

Biofilm-related *IcaA*, *icaD*, *IS256*, *aap* and *bhp* virulence genes were found to be positive in strains in the contamination group at 33%, 45%, 43%, 74% and 6% respectively, and 64%, 62%, 64%, 74% and 8% in strains in the infectious agent group, respectively. *IcaA*, *icaD* ve *IS256* positivity ratios were significantly higher in the infectious agent group than in the contamination group ($p<0.001$, $p=0.050$, $p=0.015$, respectively), while no differences were found between the two groups in terms of *aap* and *bhp* positivity ratios.

IcaA and *icaD* co-positivity was found to be 29% in the contamination group and 56% in the infectious agent group, and the difference between the groups was significant ($p=0.001$). *IcaA*, *icaD* ve *IS256* co-positivity was 17% in strains in the contamination group, 38% in strains in the infectious agent group, and the difference was significant in terms of the ratio of having all three genes together ($p=0.005$). Of all the strains in the study, 46 (80.7%) of the total 57 strains in which *icaA* and *icaD* were co-positive presented any level of biofilm formation. Any level of biofilm positivity was significantly higher in the *IcaA* and *icaD* co-positive strains than in the strains where *IcaA* or *icaD* was positive or both were negative ($p<0.001$).

In conclusion, strong biofilm generation and single or multiple presence of biofilm-related *icaA*, *icaD* and *IS256* genes were found to be higher in strains classified as infectious agent, while especially ACME-related *ArcA* positivity was found to be higher in strains in the contamination group.

These findings suggest that the presence of certain gene regions in CoNS strains may guide the distinction of infectious agent and contamination.

Keywords: CoNS, blood culture, *sasX*, ACME, biofilm



GİRİŞ

Stafilokoklar enfeksiyon etkenleri arasında önemli mikroorganizmalardan biridir. Temel olarak, bakterilerin fibrin veya fibrinojen kılıfı ile kaplanarak fagositozdan korunmasını sağlayan koagülaz bulundurma özelliğine göre *S. aureus* ve heterojen bir kümeyi içine alan koagülaz negatif stafilokoklar olarak iki grupta sınıflandırılmaktadır. Koagülaz negatif stafilokoklar (KNS), insan ve hayvan deri ve mukoza yüzeylerinde, gıdalarda ise saprofit olarak kolonize olur. Flora üyesi olarak KNS'ler doğrudan veya dolaylı yollarla diğer patojen bakteriler ile savaşıarak yerleşimlerini engeller (1-3).

KNS'lerin patojenitesi türlere özgü çeşitli virulans faktörlerinin varlığına ve konak bağışıklık yanıtına göre değişkenlik göstermektedir. Daha önceleri klinik örneklerden izole edildiklerinde flora üyesi olarak kabul edilen KNS'ler günümüzde fırsatçı patojen olarak kabul edilmektedir. Uzun hastane yatışları, üriner ve intravasküler kateterizasyon, implante edilebilir tıbbi cihazların yaygın kullanımı gibi artan sağlık bakımı hizmetleri ve hasta popülasyonundaki değişim (artmış prematüre yenidoğan; multimorbid, kronik hastalıkları olan yaşlı hastalar, immun supresif hastalar gibi) nedeniyle KNS'lerin enfeksiyon etkeni olarak tanımlanma sıklıkları artmıştır (2).

KNS'lerin artan öneminin bir diğer nedeni de aynı ortamda yaşayan stafilokok türlerinin konjugasyon, faj transdüksiyonu ile genetik materyal aktarımı yapmasının moleküler çalışmalarla gösterilmesidir. Stafilokoklar içinde *S. aureus* en önemli nazokomiyal patojenlerden biridir. *S.aureus*'a ait birçok antibiyotik direnci, virülans faktörü patojenite adaları, kromozomal kasetler, transpozonlar veya plazmitler gibi mobil genetik elementler (MGE'ler) üzerinde bulunur. Genel olarak *S. aureus*'un bazı genetik materyalleri KNS'lerden kazandığı düşünülmektedir. Bunlardan özellikle önemli olanları metisilin direncinden sorumlu *mec* geni ve en önemli virulans faktörlerinden olan kolonizasyon yeteneğini arttırdığı yeni çalışmalar ile gösterilmiş olan *sasX* ve arjinin katabolik mobil element (ACME) genleridir (4, 5).

KNS'ler enfeksiyon etkeni olarak tanımlanmalarının artması ve diğer bakteri türlerinde olduğu gibi artan antibiyotik direnci nedeniyle sağlık hizmetleri için önemli bir yük haline gelmiştir. Çeşitli örneklerde izole edildiklerinde enfeksiyon etkeni/kontaminasyon ayırımı yapmak zorlayıcı olabilmektedir.

Flora üyesi KNS'lerin enfeksiyon etkeni olarak tanımlanması gereksiz antibiyotik tedavisi ve direncine, artmış hastane yatışlarına, implante edilmiş tıbbi cihazların çıkarılmasına neden olabilmektedir. Yanlış olarak flora üyesi olarak yorumlanması ise hastaların tanı ve tedaviye ulaşımının gecikmesine neden olmaktadır. Bu sorun günlük mikrobiyoloji pratiğinde en sık kan kültürü örneklerinin yorumlanmasında karşımıza çıkmaktadır. Bu sorunu çözmek adına çeşitli kriterler kullanılmasına rağmen bazı durumlarda ayırım tam olarak yapılamamaktadır (6).

Bu çalışmada kan kültürlerinden izole edilmiş olan KNS türlerinde virülans ilişkili *sasX*, *ACME* genlerinin, fenotipik olarak biyofilm yapımının ve biyofilm ilişkili bazı virülans faktör genlerinin araştırılarak etken ve kontaminant olarak tanımlanmış suşlardaki sıklıklarının ve rollerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

KOAGULAZ NEGATİF STAFİLOKOKLAR

KNS'ler Bacilli sınıfının Bacillales takımının Staphylococcaceae familyası içinde sınıflandırılmaktadır. Gram boyama ile mikroskopta incelendiğinde üzüm benzeri küme görünümü oluşturan ve gram pozitif boyanma özelliği gösteren, katalaz pozitif, koagülaz negatif, hareketsiz, sporsuz, 0,5-1,5 µm çapında koklardır. Çoğu KNS türü pigmentsiz, pürüzsüz, parlak ve opak koloniler oluşturur. Bazı koloniler mukoid özellik gösterebilir (1, 7, 8).

İlk defa Billroth 1874'de "*Coccobacteria septica*" adını verdiği *Staphylococcus* benzeri mikroorganizmaları yara enfeksiyonlarında tanımlamıştır. Stafilocoklar 1878 yılında Robert Koch tarafından ışık mikroskobu ile görüntülenmiş ve 1880'de Louis Pasteur tarafından sıvı besiyerinde üretilmiştir. 1881 yılında Sir Alexander yaptığı fare deneylerinde ürettiği mikroorganizmaları üzüm salkımına benzemesi nedeniyle "*Staphylococcus*" olarak adlandırmıştır. 1940 yılında ise R. W. Fairbrother tarafından koagülaz üretimi ilk kez tanımlanmıştır (1, 9, 10).

Çok fazla sayıda tanımlanmış alt türü olan stafilocoklar 16S rRNA geni, dnaJ, rpoB ve tuf genlerinin analizine ve fenotipik özelliklerine göre 6 spesifik (Auricularis, Hyicus-Intermedius, Epidermidis-Aureus, Saprophytic, Simulans ve Sciuri) gruba ayrılmıştır (11). Filogenetik sınıflandırmaların yanı sıra klinik ve tanısal özellikleri temel alınarak stafilocoklar tipik olarak tavşan plazmasını pıhtılaştırma yeteneğine sahip olan koagülaz pozitif stafilocoklar veya *S. aureus* ve olmayanlar ise koagülaz negatif stafilocoklar olarak sınıflandırılırlar (1). İnsanlarda hastalıkla ilişkili en yaygın olarak izole edilen KNS'ler arasında *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. lugdunensis* ve *S. haemolyticus* yer alır. Bu türler dışında, diğer birçok tür daha az sıklıkla olmakla birlikte insanlarda hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (7). Bugüne kadar tanımlanmış bazı KNS türleri, izolasyon kaynakları ve klinik ilişkileri tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Sık tanımlanan KNS türleri, izolasyon kaynakları ve klinik ilişkileri (1)

Stafilokok Türü	İzolasyon Kaynağı		
	Çevresel	Hayvan	İnsan
<i>S.capitis subs.capitis</i>	-	+	Saçlı deri
<i>S.capitis subs.urealyticus</i>	-	-	Cilt
<i>S.epidermidis</i>	+	+	Cilt ve mukoz membranlar
<i>S.haemolyticus</i>	+	+	Cilt (ayak ve kollarda)
<i>S.hominis subs.hominis</i>	+	+	Cilt (axilla, kol,bacak ve inguinal bölge
<i>S.hominis subs.novobiosepticus</i>	-	-	-
<i>S.pettenkoferi</i>	-	-	Cilt
<i>S.simulans</i>	-	+	Cilt (özellikle çocuklarda kol, bacak ve baş)
<i>S.warneri</i>	+	+	Cilt (burun, baş, kol ve bacaklar)
<i>S.saprophyticus subs.bovis</i>	-	+	-
<i>S.saprophyticus subs.saprophyticus</i>	-	+	Cilt
<i>S.lugdunensis</i>	-	+	Cilt (alt abdomen, bacak)

KNS'ler enfeksiyon etkeni olmalarının yanı sıra yaş, deri kalınlığı, apokrin bezler ve kıl foliküllerinin yoğunluklarına göre türü ve yoğunluğu değişmekle birlikte cilt florasının önemli bir parçasıdır. Koltuk altı, gluteal ve inguinal bölge, göbek, antekubital ve popliteal boşluklar, plantar bölge, ön burun delikleri, konjunktiva KNS'lerin başlıca kolonize ettiği bölgelerdir. Florada en sık bulunan stafilokok türü *S. epidermidis*'dir. *S. haemolyticus* ve *S. hominis* apokrin bezlerin yüksek olduğu aksilla ve kasık bölgelerinde, *S. capitis* puberte sonrası alın ve kafa derisindeki yağ bezlerinin çevresinde, *S. auricularis* dış kulak yolunda, *S. lugdunensis* ise perine, kasık bölgesinde, alt ekstremita ve koltuk altında bulunur. *S. saprophyticus subsp. saprophyticus* ise sıklıkla rektum ve genitoüriner sistemi kolonize eder (1, 12).

KNS'ler diğer mikrobiyata üyeleriyle birlikte yer ve besin açısından patojen bakterilerle rekabet ederek onların kolonize olmasını engeller.

Diğer yandan bakteriyosin adı verilen bileşikler salgılayarak patojen bakterilerin büyümesi üzerine inhibitör etki yapar, bakteriler arası haberleşme sistemi quorum sensing mekanizmalarını düzenleyerek stafilocok toksinleri ve biyofilm oluşumunu engeller, çeşitli immun sistem hücre ve yolaklarını aktive ederek patojen bakterilerin kolonizasyonunu engeller (3).

Koagülaz Negatif Stafilokoklarda Virülans Faktörleri ve Patogenez

S. aureus'un virülansında rol alan birden fazla toksin ve adezyon faktörü tanımlanmış olmakla birlikte *S. epidermidis* ve diğer KNS'lerde daha az sayıda virülans faktörü bildirilmiştir. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarla özellikle *S. epidermidis*'in ve diğer KNS'lerin neden olduğu enfeksiyonların patogenezinin daha iyi anlaşılması yeni virülans faktörlerinin tanımlanmasına katkı sağlamıştır. Biyomalzemelerin yüzeyinde biyofilm oluşturma bu bakteri grubunun en önemli virülans faktörüdür. *S. epidermidis* ve diğer KNS'lerde virülans ile ilişkilendirilmiş bazı faktörler tablo 2'de yer almaktadır (1, 5, 12-16).

Tablo 2. *S.epidermidis* ve diğer KNS türlerinde tanımlanmış virulans faktörleri(13, 14)

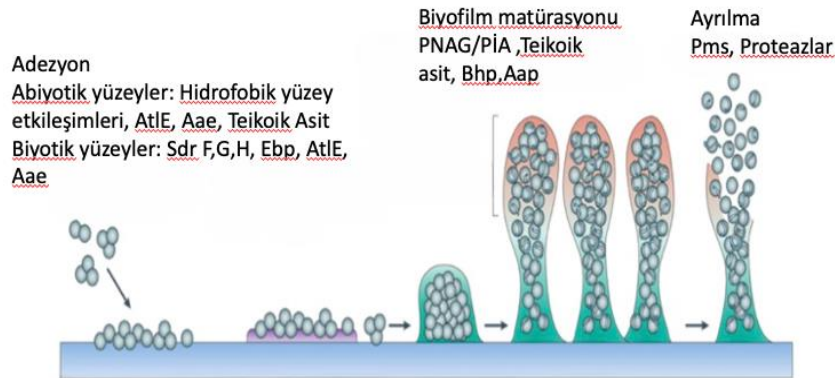
Biyofilm Oluşumu		
	Primer Adezyon	
	Plastik (Cansız) yüzeylere adezyon	Canlı yüzeylere adezyon
	• AtlE • Teikoik Asit • ClpP • Bap/Bhp	• MSCRAMMS: SdrG/ Fbe, SdrF, SesC, Aap • AtlE, Aae, Empb, GehD • Teikoik Asit • Bap/Bhp
	Biyofilm Maturasyonu	
	• PIA/PNAG • Aap	
	Biyofilm Ayrışması	
	• Ekstraselüler enzimler (protez,elastaz) • PMSs (Fenolde Çözünür Modulinler)	
Ekzoenzim ve Toksinler	• Lipaz/ Elastaz/ Proteaz	
	• Fenolde Çözünür Modulinler (PMSs)	
	• FAME (Yağ asit modifiye edici enzim)	
	• Süperantijenik Toksin	
	• Delta Toksin	
Demir Kazanımı	• Staphyloferrin A/B	
	• Sitokrom ABC	
Poli-d-glutamik Asit	Bağışık yanıttan kaçma ve antimikrobiyal dirençte rol alır	
Bakteriyel Yarış	Bakteriyosin, Lysostaphin, Lantibiyotikler (epidermin, gallidermin, pep5)	
Antimikrobiyal Direnç	• Penisilnaz üretimi • Metisilin direnci • Glikopeptit direnci • Diğer grup antibiyotiklere direnç (aminoglikozit, makrolid, tetrasiklin...)	

Biyofilm Oluşumu

Bakterilerin enfeksiyon oluşturma kapasitesi adezyon faktörleriyle kolonize olma, bağışık yanıttan kaçma ve konak dokuya zarar verici ekzoenzim ve toksin salgılama gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Genel olarak KNS'ler agresif enfeksiyonlara neden olan virulans faktörlerinden yoksundur. Kolonizasyona katkıda bulunan adezyon faktörleri ve biyofilm oluşumu en önemli virulans faktörleridir (13, 14, 16).

Biyofilm; bakteri hücre yığınları, teikoik asit, protein, polisakkarit, hücre dışı eDNA gibi bakteriyel ürünler ve konakçı ürünlerinden oluşan amorf bir hücre dışı malzeme ile kaplı, içerisinde besin ve su alışverişi için kanalların olduğu çok katlı organize bir yapıdır. Biyofilm oluşumu bakteriler için dış ortamla arasında mekanik bir bariyer oluşturur, konak bağışıklık yanıtından kaçınmayı sağlar ve tedavide kullanılan antibiyotiğin enfeksiyon bölgesine geçişini azaltır (13, 14, 16). Biyofilm oluşumu 4 aşamada gelişir;

- Konak matriks proteinleri gibi canlı veya tıbbi cihazlar gibi cansız yüzeylere adezyon
- Bakterilerin çoğalması ve hücreler arası adezyon molekülleriyle çok katmanlı hücre kümeleri haline gelmesi
- Biyofilmin olgunlaşmasını takiben daha derin katmanlarda bulunan bakterilere oksijen ve besin iletimini sağlamak için kanalların açılması
- Tek ya da hücre yığınları şeklinde biyofilmden ayrılıp farklı bir bölgede kolonizasyon ve yeni bir bölgede biyofilm oluşumunu başlatmak için kan dolaşımına yayılması (1).



Şekil 1. Biyofilm gelişim aşamaları (14 nolu kaynaktan düzenlenmiştir)

Biyofilm Oluşumunda Primer Adezyonda Rol Alan Faktörler

Bakterilerin yüzeylere ilk bağlanması, cansız yüzeyler (kateter ve implante edilebilir tıbbi cihazların plastik malzemelerin yüzeyleri gibi) ve canlı yüzeylerde (konak dokuların ekstraselüler matriks proteinleri ve bu proteinlerle kaplı kalıcı cihazların yüzeyleri gibi) farklılık göstermektedir (1, 5, 12-15).

Cansız yüzeylere yapışmada öncelikle hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler gibi spesifik olmayan fizikokimyasal kuvvetler aracılık eder. Bununla birlikte, peptidoglikana kovalent olarak bağlanmış spesifik bakteriyel hücre duvar adezyon molekülleri, protein yapıdaki yüzeyle ilişkili adezyon molekülleri ve teikoik asit gibi protein dışı adezyon molekülleri de ilk bağlanmaya eşlik eder (1, 5).

S. epidermidis kaynaklı 148-kDa ağırlığındaki yüzey ilişkili otolizin/adhezin AtlE bakteri hücrelerinin polistren yüzeylere ilk yapışmasına aracılık eder (1, 17). Benzer fonksiyonlara sahip homolog Atl proteinleri; *S. caprae* (AtlC), *S. saprophyticus* (Aas), *S. lugdunensis* (AtlL) ve *S. warneri* M (AtlWM) gibi diğer KNS'ler için de rapor edilmiştir. İlk yapışmaya AtlE, adezyon özelliği yanında hücre duvarı peptidoglikanını hidrolize ederek otolize neden olur ve stafilokok biyofilmlerinin önemli bir bileşeni olan eDNA'nın salınmasına yol açar (1).

S. epidermidis, *S. simulans*, *S. hyicus* ve *S. chromogenes* gibi KNS'lerde bir yüzey proteini olan biyofilmle ilişkili protein (Bap) homologu bhp, polistirene bağlanmada ve biyofilm üretiminin birikim fazında rol oynar (1, 5, 13).

Protein yapıda olmayan moleküllerden teikoik asit de ilk adezyonda önemli bir rol oynar. Peptidoglikana kovalent olarak bağlanan duvar teikoik asitleri (WTA) ve sitoplazmik membran lipitlerine bağlanan lipoteikoik asit (LTA) yüzey hidrofobikliğinin oluşmasını sağlayarak birincil bağlanmaya eşlik eder (1).

Tıbbi cihazların implantasyonundan sonra cihaz yüzeyinin fibrinojen, fibronektin, trombospondin, kollajen, vWF ve vitronektin gibi ekstraselüler matriks proteinleri ve trombositler gibi konak hücreleri tarafından kaplanması canlı bir yüzey ortamının oluşmasına neden olur. Bu konakçı faktörleri hücre yüzeyinde ilgili adezinleri eksprese eden stafilokokların bağlanması için özgül birer reseptör gibi işlev görür. İnsan konak hücrelerini tanıyarak bakterilerin hücre duvarı peptidoglikanına kovalent bağlanan KNS yüzey adezinleri mevcuttur.

Hücre duvarı adezinleri arasında en yaygın olarak tanımlanan proteinler yapışkan matriks proteinlerini tanıyan mikrobiyal yüzey bileşenleri (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM)) olarak adlandırılan gruptur. MSCRAMM'lar N terminalinde sinyal peptiti, konak tarafından tanınmayı sağlayan bölge, tekrar alanları ve LPXTG motifi içeren benzer yapıya sahip moleküllerdir. Genom analizine göre *S. epidermidis* yaklaşık 12 MSCRAMM'ye sahiptir. Öne çıkan üyeler, kümelenme faktörleri A ve B'yi (ClfA, ClfB), serin/aspartat bakımından zengin (Sdr) protein ailesini ve fibronektin bağlayıcı proteinler A ve B'yi (FnBPA, FnBPB) içeren fibrinojen ve fibronektin proteinleridir (1, 5).

En iyi karakterize edilen MSCRAMM'lerden biri fibronejen binding protein Fbe (Sdr G)'dir. Bu protein çoğu *S. epidermidis* suşunda bulunan 119 kDa ağırlığında serin aspartat tekrar proteinleri ailesinin bir üyesidir. Bu faktör *S. epidermidis*'in fibrinojene bağlanmasında ana faktör olarak görülmektedir. Fbe adezyon özelliğinin yanında kemotaktik bir madde olan fibrinopeptit B'nin salınımını inhibe ederek fagositlerin enfeksiyon bölgesine göç etmesini de azaltır. Serin aspartat tekrar ailesi üyelerinden SdrF ve H'de adezyonda rol oynayan hücre duvar adezin proteinlerindendir (1, 5, 13).

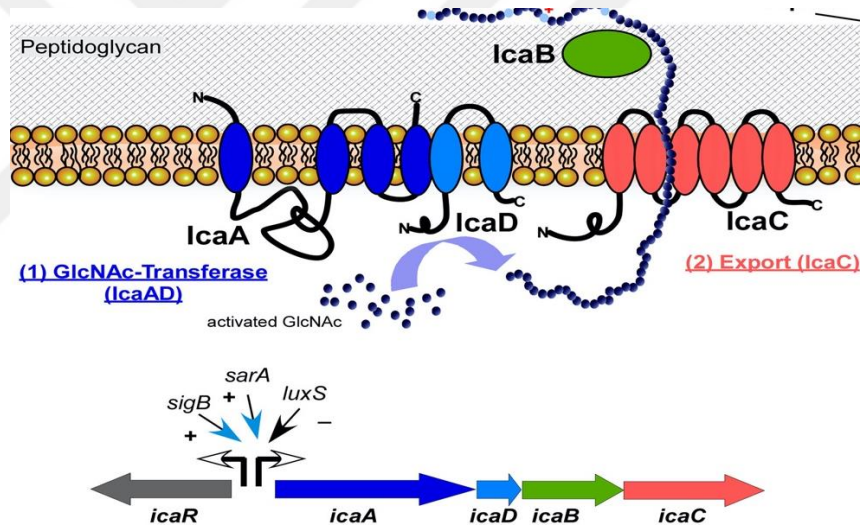
S. epidermidis'lerde tanımlanmış birikimle ilişkili protein Aap, adezyonu sağlayan bir diğer hücre duvar adezin proteinidir. Aap cansız yüzeylere ayrıca keratinositlere yapışmaya aracılık eder ve cilt kolonizasyonunda önemli rol üstlenmektedir (1).

S. epidermidis kaynaklı LPXT motifi içermeyen non kovalent bağlı otolizin/adezin olarak çift fonksiyon gösteren MSCRAMM'lar abiyotik yüzeylerde olduğu gibi biyotik yüzeylerde de adezyonda görev almaktadır. Atl E vitronektine, Aae fibrinojen, vitronektin ve fibronektine bağlanmayı sağlar (1, 5).

Biyofilm Olgunlaşması ve Ayrılmasında Rol Alan Faktörler

Biyofilm gelişiminin sonraki aşamasında mikrokoloniler çoğalarak çok katmanlı yapılar oluşturur. Biyofilm matriksi polisakaritler, proteinler ve teikoik asitler gibi farklı kimyasal yapılara sahiptir. Ölmekte olan hücrelerden salınan hücre dışı DNA (eDNA) da anyonik karakteri nedeniyle polisakkarit adezinler ile etkileşime girerek tutkal görevi görerek biyofilm matriksinin yapısına katılır (13, 14, 16).

Ekzopolisakaritler biyofilm oluşumu ile en spesifik olarak ilişkilendirilmiş olan matris bileşenleridir. Ekzopolisakaritlerin katyonik karakteri diğer yüzey polimerleri ile elektrostatik etkileşim sağlayarak biyofilm matrisinin oluşumunda önemli rol oynar. Stafilocoklar, polisakkarit hücreler arası adhezin (PIA) veya kimyasal bileşimine göre poli-N-asetilglukozamin (PNAG) olarak adlandırılan ekzopolisakaritler üretirler. PIA biyosentezi *icaA*, *icaD*, *icaB* ve *icaC* genlerini içeren *ica* gen lokusunun ürünleri ile gerçekleştirilir. *IcaA*, *icaD* varlığında UDP-N asetilglukozaminden PIA oligomerlerini sentezleyen N asetilglukozaminil transferazı kodlar. Oluşan biyofilm zincirinin uzaması *icaC* aracılığıyla, biyofilmin katyonik karakter kazanması ise deasetilasyonu sağlayan *icaB* aracılığıyla sağlanır. *IcaB* deasetilasyona ek olarak antimikrobiyal peptitlere (AMP'ler) ve nötrofil fagositozuna karşı direnç gelişimini de sağlar. *Ica R* ise lokusun negatif düzenleyicisidir (16).



Şekil 2. Biyofilm gelişiminde rol alan *Ica* lokusu (16 numaralı kaynaktan düzenlenmiştir.)

Stafilocokal biyofilm gelişiminde ekzopolisakaritler yanında protein yapıda adezinler de görev almaktadır. Bunlar arasında fibronektin bağlayıcı protein (Fbe), birikim ile ilişkili protein (Aap), hücre dışı matriks bağlayıcı protein (Embp) ve diğer bazı yüzey adezin proteinleri tanımlanmıştır (1, 13, 15, 16).

Aap, PIA/PNAG'dan bağımsız bir şekilde biyofilm maturasyonunu indükleyebildiği ve klinik *S. epidermidis* suşları arasında oldukça yaygın olduğu bulunmuştur.

Aap'nin, N-terminal kısmında A alanı bulunurken bunu bir tekrar alanı B izler. B tekrar alanı, hücreler arası yapışmaya ve biyofilm birikimine aracılık eden her biri 128 amino asitten oluşan değişken sayıda tekrarlar ile karakterizedir. B alanı, endojen stafilokokal veya konakçı proteazların aracılık ettiği proteoliz yoluyla A alanının çıkarılmasıyla aktif bir adezin haline gelir (1, 18). Aap aracılığıyla gelişen hücreler arası yapışma, G5 alanları olarak adlandırılan B tekrar bölgelerinin komşu hücreler ile Zn^{+2} bağımlı fermuar mekanizmasıyla gelişmektedir (1, 19). *S. epidermidis* Emb proteini ise fibronektine bağlanmanın yanında biyofilm birikimine de aracılık eder (1, 5).

Biyofilm olgunlaşmasında hücreler arası adezyon yanında, zemindeki bakterilerin beslenmesi için sıvı dolu kanalların oluşumu da oldukça önemlidir. Biyofilm ayrılması, hücrelerin birbirine yapışmasını sağlayan karmaşık matrisin parçalanmasını sağlayan farklı enzimler aracılığıyla veya fenolde çözünen modüller (PSM'ler) gibi farklı mekanizmalar aracılığıyla gerçekleşebilir. Biyofilm ayrışmasıyla bakteriler tek tek veya bakteri kümeleri şeklinde kan dolaşımı yoluyla dağılabilir. Bu dağılmayı takiben, vücuttaki farklı bölgeler dolaşan bakteriler tarafından kolonize edilebilir ve bu da enfeksiyonun metastazına yol açar (1, 5, 15). Hücreleri birbirine yapıştıran ilgili makromoleküllerin kimyasal bileşimine bağlı olarak, bazı proteazlar (Bap, Aap ve Embp gibi parçalayıcı proteinler), şeker hidrolazlar (PIA/PNAG'yı parçalayan) veya nükleazlar (eDNA'yı parçalayan) gibi enzimler biyofilm ayrışmasına katkı sağlar (13, 16).

Mobil Genetik Elementler ve İlişkili Faktörler

Bakterilerin yeni yaşam alanlarına adaptasyonu, sıklıkla horizontal gen transferi aracılığı ile yeni genlerin kazanılması yoluyla gerçekleşir. Son yıllarda KNS'lerin *S. aureus* için gen rezervuarı gibi davranabildiği ve mobil genetik elementler aracılığıyla gen aktarımı ile virülansını arttırabildiği bildirilmiştir. Mobil genetik elementler yoluyla KNS'lerden aktarıldığı düşünülen faktörler; metisilin direncinden sorumlu *mecA*, kolonizasyon ve virulans kapasitesini arttırdığı çalışmalarla gösterilen *sasX* ve ACME (Arjinin mobil katabolik element) genleridir.

S. aureus'da virulansı arttırdığı bilinen bu genlerin KNS'lerdeki rolü tam olarak ortaya konamasa da biyofilm oluşumunun karmaşık mekanizmasını destekleyerek virulansı arttırabileceği düşünülmektedir (4, 5, 20).

sasX

sasX, satfilokoklarda kolonizasyon kapasitesini arttırmada rol aldığı düşünülen son yıllarda tanımlanmış bir yüzey adezin proteindir. Hastanede yatan hastaların başta kan kültürü örnekleri olmak üzere çeşitli klinik örneklerinden ve sağlıklı kişilerin ellerinden izole edilen KNS'lerde yapılan çalışmalarda sasX'ın kolonizasyona katkı sağladığı gösterilmiş ve sasX ilişkili yeni bir gen bölgesi tanımlanmıştır (20, 21). Bu gen bir sinyal peptidi ve LPXTG motifi içeren MSCRAMM'ler ile bağlanmayı sağlayan *S. aureus* 'a ait yüzey adezin proteinini kodlamaktadır (22). sasX 127.2 kb Φ SP β benzeri bir profajın 3' bölgesinde yer alır. Veri tabanında gen bölgeleri kıyaslandığında yine ϕ SP β profajı tarafından kodlanan ve biyofilm ekspresyonu sırasında *S. epidermidis* ATCC 35984'ün yüzey proteini sesI ile sasX yüksek homoloji göstermektedir. Tam olarak epidemiyolojik kökeni bilinmemesine rağmen sasX ve sesI proteinlerinin yüksek homoloji göstermesi ve profajlar tarafından taşınması nedeniyle KNS ve *S. aureus* gibi yakın kökenler arasında genetik materyal aktarımı olabileceğini düşündürmektedir (4, 22).

sasX taşıyıcılığının *S. aureus* suşlarına kazandırdığı biyolojik rol ve patogenezdaki önemi sasX pozitif ve negatif suşlar arasında adezyon, biyofilm oluşumu, immun kaçış ve hastalığın şiddeti üzerine yapılan deneysel modeller ile gösterilmiştir. SasX varlığının konak dokuya adezyonda özellikle erken evrelerde önemli etkiler yaptığı, biyofilm oluşumu ve bakteriyel agregasyonu arttırdığı bildirilmiştir. Agregasyonun artışı bakteriyi nötrofil fagositozu gibi immun yanıtlardan koruyarak, kanda hayatta kalma süresini arttırdığı saptanmıştır. sasX pozitif suşlar ile yapılan yumuşak doku enfeksiyon modelinde meydana gelen abselerin daha büyük boyutlara ulaştığı, akciğer enfeksiyonu modelinde ise akciğerde daha yüksek TNF alfa düzeyi oluşturduğu ve her iki dokunun histolojik olarak değerlendirilmesinde daha ağır inflamasyona yol açtığı bulunmuştur. sasX'in patojenik potansiyeli arttıran bir virulans faktörü olduğu düşünülmektedir (22).

Arginin Katabolik Mobil Element (ACME)

Stafilokokal arginin katabolik mobil element (ACME), insan derisinin kolonizasyonunda ve konak immün yanıtından kaçışta rol oynar (18). ACME *arcR/A/D/B/C* genlerinden oluşan *arc* operonu, *kdpE/D/A/B/C* genlerinden oluşan *kdp* operonu ve *opp3* operonunu barındıran büyüklüğü 30 ila 55 kb arasında değişen bir genetik adadır (23, 24). Bu gen kümeleri L-arginini karbondioksit, ATP ve amonyağa dönüştüren arginin deiminaz yolunu, oligopeptit taşıyıcısını ve spe G'yi kodlar (23, 25, 26). Bu üç operonu bulundurma durumuna göre farklı ACME tipleri tanımlanmıştır. Bugüne kadar *S. epidermidis*'te beş tip ACME tanımlanmıştır (24).

ACME, stafilokoklarda metisilin direncinin belirleyicisi olan *mecA*'yı taşıyan mobil genetik element stafilokokal kaset kromozom *mec* (SCC*mec*) ile ortak bölgeleri paylaşır. Her ikisi de *orfX*'in *attB* bölgesi ile birleşen ve bu bölgeye entegrasyonları ile sonuçlanan homolog tekrar eden dizilerle çevrilidir ve SCC kodlu kaset kromozom rekombinazları (*ccr*) tarafından mobilize edilir. Bu nedenle özellikle de SCC*mec*'in kazanımı ACME'nin kromozomal entegrasyonu için de zemin hazırlayabilir.

ACME *S. haemolyticus*, *S. capitis* ve *S. epidermidis* izolatlarında da saptanmıştır. Özellikle yapılan çalışmalar ACME I'in *S. epidermidis*'ten toplum kaynaklı metisilin dirençli *S. aureus* (TK-MRSA) suşu USA300'e aktarıldığını ve bu türün *S. aureus* için kaynak görevi üstlendiğini göstermektedir (23, 27, 28).

Tablo 3. ACME Tiplendirmesi (24 nolu kaynaktan düzenlenmiştir)

ACME Tipi	Bulunan operon
ACME Tip 1	<i>Arc</i> ve <i>opp3</i>
ACME Tip 2	<i>Arc</i>
ACME Tip 3	<i>Opp3</i>
ACME Tip 4	<i>Arc</i> ve <i>kdp</i>
ACME Tip 5	<i>Arc</i> , <i>opp</i> ve <i>kdp</i>

TK-MRSA ile ilişkili en sık görülen hastalık deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarıdır. *S. aureus* ciltteki sert pH koşullarında kolonize olabilir, immün yanıtı azaltabilir ve ciltte üretilen poliaminlerin detoksifikasyonuna karşı koyabilirse enfeksiyon oluşturabilmektedir. USA300 *S. aureus* suşunun ACME kazanımı, diğer *S. aureus*'lara göre bazı özellikler edinmesini sağlamaktadır (28).

- ACME arginin-deiminaz sistemi, amonyak üretme yeteneği ile ortamda pH dengelenmesini sağlayarak bakteriyi derideki laktik asit stresinden korur.
- ACME adasında kodlanmış spermin/spermidin asetiltransferaz (SpeG) eksojen poliaminlerin bakterisidal etkisine direnç sağlar. Aynı zamanda konak poliamin üretiminin inhibisyonu yara iyileşmesini geciktirerek enfeksiyonun kalıcılığını arttırır.
- ACME-Arc aracılığıyla mevcut arjininin iNOS tarafından NO üretimi yerine arginin deaminaz tarafından kullanımı, doğal immun sistem yanıtını azaltarak enfeksiyonun yayılımını hızlandırır (28).

ACME'nin TK-MRSA'lara enfeksiyonda sağladığı bu avantajlar KNS'lerde de bu gen bölgesinin varlığının kolonizasyon kapasitesini arttırmaya yönelik etkileri olabileceğini düşündürmektedir (23, 24, 27, 28).

Antimikrobiyal Direnç

Antibiyotiklere karşı gelişen direnç KNS enfeksiyonları için önemli bir halk sağlığı sorunu ve tedaviyi güçleştirmesi nedeniyle de önemli bir virulans göstergesidir. KNS suşları arasında antimikrobiyal direnç oranlarının artmasında, antibiyotiklerin yanlış ve/veya yaygın kullanımının, bazı antibiyotiklerin evcil ve çiftlik hayvanlarında kullanılmasının ve bakterilerin antimikrobiyal bileşiklere adaptasyonuna katkıda bulunan çevresel koşulların varlığının rol aldığı belirtilmektedir. Çoklu antimikrobiyal direnç genlerinin varlığı ayrıca biyofilm oluşumuna katkı sağlar (5, 13, 29).

KNS'lerde tespit edildiğinde tedavi yaklaşımlarını yönlendirilen en önemli direnç mekanizmaları penisilinaz üretimi, metisilin direnci ve glikopeptid direncidir (5, 13, 29). Bununla birlikte KNS'lerde aminoglikozitlere, florokinolonlara, tetrasiklinlere, makrolidlere ve daha birçok sınıf antimikrobiyal ajana çeşitli oranlarda ve farklı mekanizmalar ile direnç gelişimi bildirilmiştir (1, 30-37).

Penisilinaz Üretimi

Stafilokokların, penisilinleri parçalayan penisilinaz enzimi penisilinin kullanılmaya başlanmasından kısa süre sonra gösterilmiştir. Plazmit üzerinde diğer direnç genleriyle birlikte taşınarak aktarılabilen bir gen olan beta laktamaz geni penisilin ve beraberinde amoksisilin, ampicilin, kloksasin gibi beta laktam antibiyotikleri parçalar. Stafilokoklarda beta laktamaz *blaZ* geni tarafından kodlanır. Bu gen indüklenebilir özelliktedir ve ekspresyonu *blaR1*, *blaR2* ile regüle edilirken *blaI* tarafından inhibe edilir. Ortamda beta laktam antibiyotik varlığında inhibitör etki ortadan kalkarak *blaZ* geni uyarılıp artmış miktarda beta laktamaz üretimi sağlanır. Penisilinaz üretimi KNS'lerde günümüzde %80-90'a varan yüksek oranda bulunmaktadır (38).

Metisilin Direnci

Normal olarak stafilokoklarda PBP1, PBP2, PBP3 ve PBP4 olmak üzere 4 adet penisilin bağlayıcı protein bulunmaktadır. Dirençli izolatlarda ise beta laktam antibiyotiklere düşük afinite gösteren ve antibiyotikler ile inhibe olmayan PBP2a olarak adlandırılan farklı bir protein bulunmaktadır. PBP2a SCCmec (stafilokokal kaset kromozomu) adı verilen mobil bir genetik elementin parçası olan *mecA* geni tarafından eksprese edilir. PBP2a 'nın ekspresyonu, MRSA aktivitesine sahip seftarolin ve seftabiprol hariç tüm beta-laktam antibiyotiklere direnç gelişmesine yol açar (1, 39). *mec* geni SCCmec mobil genetik elemanı üzerinde bulunmaktadır. SCCmec 21-67 kb büyüklüğünde kromozomda *ofrX*'in 3'ucunda yer alan bir DNA dizisidir. Bugüne kadar 11 tip ve çeşitli subtipde SCC mec elementleri tanımlanmıştır. KNS'lerde SCC mec tip III, IV, V tek başına veya çeşitli kombinasyonlarda en yaygın tiplerdir. Özellikle MR-KNS ler oldukça çeşitlilik barındırmakta ve zamanla SCC mec tipleri ve alt tiplerinin genişleyeceği düşünülmektedir (1, 40).

Glikopeptit Direnci

Metisiline dirençli KNS'lerde kullanılabilecek ilk antimikrobiyal ajanlar glikopeptitlerdir. Direnç mekanizması tam olarak tanımlanmasa da hücre duvarı değişiklikleri, plazmit aracılı yatay gen transferi ve mic creep mekanizmaları nedeniyle glikopeptit tedavisi başarısızlık ile sonuçlanabilir (1).

Stafilokoklar arasında vankomisin direncinin ilk nedeni hücre duvarı metabolizmasında görülen değişimlerle birlikte hücre duvarı kalınlaşmasıdır. Otolitik enzimlerin aktivitesi azalarak peptidoglikan içindeki bağlanma azalmakta ve hücre duvarı öncüllerinin yapımı arttırılarak kalınlık artmaktadır. Bunun sonucu olarak heterojen dirençli subpopulasyonlar oluşmaktadır. Vankomisin yanında eş zamanlı olarak teikoplanin direnci de oluşabilmektedir. Yoğun kullanımına rağmen KNS izolatlarının büyük çoğunluğu vankomisine duyarlıdır. Ancak teikoplanine dirençli KNS izolatları vankomisine direnç gösterenlerden daha yaygındır (1, 41).

KNS enfeksiyonlarında kullanılan diğer antimikrobiyal ajanlar ve direnç mekanizmaları tablo 4' de verilmiştir.

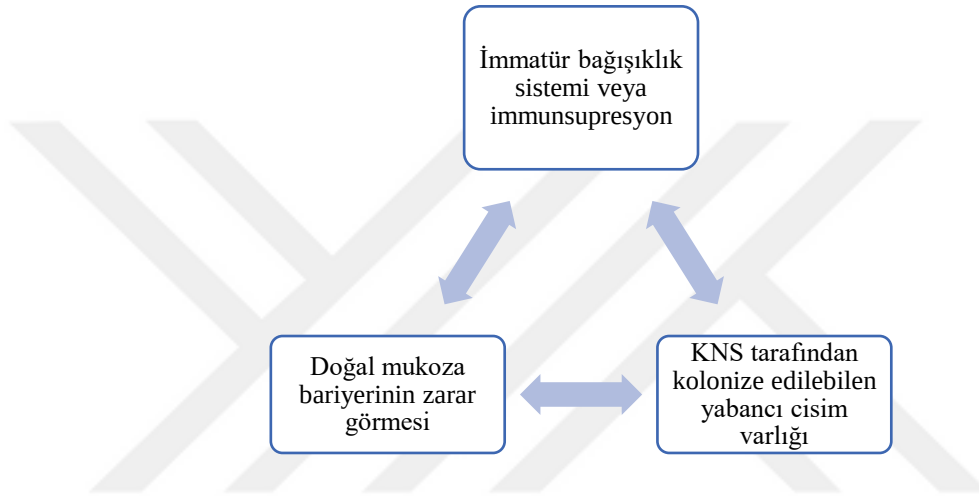


Tablo 4. KNS’lerle meydana gelen enfeksiyonlarda kullanılan antibiyotikler ve direnç mekanizmaları (1, 30-37)

Antimikrobiyal ajan	Direnç mekanizması
Aminoglikozit	Aminoglikozit modifiye edici enzimler (acc, aph, ant)
Florokinolon	DNA giraz (<i>gryA-B</i>)/ Topoizomeraz IV (<i>perC-E</i>)
Makrolid, Linkozamid, Streptogramin	<i>ermA</i>, <i>ermB</i> ve <i>ermC</i> aracılığıyla 23S rRNA ribozomal modifikasyonlar <i>msrA</i>, <i>msrB</i>, <i>vga</i>, <i>vgb</i> genlerinin aracılık ettiği aktif dışa atım pompası <i>LinA</i> aracılı enzimatik modifikasyon
Oksazolidonlar	- cfr alınmasıyla 23S rRNA’da meydana gelen posttranskripsiyonel metilasyon (G2447T, T2504A, C2534T ve G2576T) - rplC ve rplD
Rifampin	rpoB (RNA polimeraz beta alt birimindeki nokta mutasyonları)
Fusidik Asit	- EF-G’yi kodlayan <i>fusA</i> - EF-G koruyucu proteini kodlayan <i>fusB</i>, <i>fusC</i>, <i>fusD</i> ve <i>fusE</i> mutasyonları
Fosfomisin	Glutasyon S-transferaz enzimini kodlayan <i>FosA</i> ve <i>B</i>’de mutasyon
Tetrasiklin	- Effluks pompaları - Ribozom koruma proteinleri Tet (S), Tet (t), Tet (Q), TetB (P), Tet (W), OtrA
Mupirosin	<i>mupA</i>
Trimetoprim	<i>dfrA</i>, <i>dfrD</i> mutasyonları

Koagülaz Negatif Stafilokların Neden Olduğu Enfeksiyonlar

Koagülaz negatif stafiloklar cilt mikrobiyotasının bir üyesi olması nedeniyle önceleri klinik örneklerden izole edildiklerinde enfeksiyon etkeni olarak kabul edilmemiştir. Son yıllarda KNS'lerin alt türlerine ait artan bilgiler ve özellikle hasta popülasyonunun artmasına bağlı olarak enfeksiyon etkeni olarak tanımlama sıklığı artmıştır (2). KNS'lerle enfeksiyon gelişimine zemin hazırlayan konak faktörleri şekil 3'de gösterilmiştir.



Şekil 3. KNS enfeksiyonları için zemin hazırlayıcı faktörler (2 numaralı kaynaktan düzenlenmiştir)

Prematüre yenidoğanlarda, hematolojik ve solid organ malinitesi olan hastalarda ve komorbiditesi olan geriatrik hasta grubunda immun sistem baskılanmıştır. Ayrıca bu özellikli hasta grubunda uzamış hastane yatışlarına bağlı ciltte bakteriyel kolonizasyon artmakta, uzamış antibiyotik kullanımı bağırsak mukoza bariyerini zedeleyerek bakteriyel translokasyona zemin hazırlamakta ve kullanılan kateterizasyon işlemleri hem mukoza bariyerini zedeleyerek hem de biyofilm oluşumu için yüzey oluşturarak enfeksiyon oluşumuna neden olmaktadır. Santral ve venöz kateterizasyona ek olarak intraartiküler protezler, vasküler greft ve yapay kalp kapakları, kalp içine yerleştirilen pil ve koroner stentler, ventriküloperitoneal şantlar, intraoküler lens ve üriner sistem kateterizasyonu da biyofilm oluşumu için zemin hazırlamaktadır (2).

KNS'lere bağlı olarak n tropenik hastalarda bakteriyemi, intravenöz kateter enfeksiyonları ve kateter ilişkili kan dolaşım enfeksiyonları, yenidoğan enfeksiyonları, endokardit, cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları, üriner sistem enfeksiyonları ve yabancı cisim varlığına bağlı lokal enfeksiyonlar gelişebilmektedir (2).

Bakteriyemi ve İnterven z Kateter İlişkili Kan Dolaşım Enfeksiyonları

KNS'lere bağlı kan dolaşımı enfeksiyonları özellikle intravasküler kateterlerin veya implant portlarının kullanımıyla ilişkili tıbbi cihazların kolonizasyonu sonucunda gelişir. Ayrıca kan dolaşımı enfeksiyonları; protez kalp kapakçıkları, kardiyak destek cihazları ve koroner stentler gibi başka tip cihazların kolonizasyonundan da kaynaklanabilir. Dikkate değer bir oranda, tıbbi cihazların kullanımından bağımsız olarak KNS'lerin neden olduğu kan dolaşımı enfeksiyonları da ortaya çıkabilir. Kan dolaşımı enfeksiyonlarının semptomları başlangıçta hafif ve spesifik olmayabilir, ancak ciddi komplikasyonlara ve mortaliteye yol açabilmektedirler (1, 2, 5).

Kateterle ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarında (K KDE), en sık predispozan faktör santral venöz kateterler olmakla birlikte arteriyel ve periferik intravasküler kateterler de sorumlu tutulmuştur (42). 2011 ve 2014 yılları arasında Amerika Birleşik Devletlerinde CDC'nin kan dolaşım enfeksiyonlarındaki patojenlerin dağılımının raporlandığı çalışmada %16.4 ile KNS'ler en yüksek oranda tespit edilmiştir (43).

Santral venöz kateterler (SVK), özellikle yoğun bakımda yatan hastalarda, hemodiyaliz alan hastalarda ve onkoloji hastalarında, total parenteral beslenme ve uzun süreli venöz erişim gerektiren birçok durumda sıklıkla kullanılmaktadır. Kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarında konağa ait risk faktörleri arasında ileri yaş, komorbid hastalıklar, yanık gibi durumlarda oluşan cilt bütünlüğü kaybı, malnütrisyon, immun yetmezlik ve daha önceden kan dolaşım enfeksiyonu geçirmiş olmak sayılabilir. Katetere bağlı faktörler arasında ise yerleşim yeri, yerleşim sırasında alınan bariyer önlemlerinin varlığı (maske, bone, steril eldiven, önlük, geniş örtü) ve takan kişinin becerisi, kateter malzemesi ve tünel varlığı, kullanım amacı (hiperalimantasyon gibi), kateterizasyon süresi ve düzenli bakım gibi özellikler sıralanabilir (44).

SVK ile ilgili enfeksiyonların en yaygın kaynağı, kateterin intrakutan ve intravasküler kısımlarının hastanın derisindeki ve sağlık çalışanlarının ellerindeki (yerleştirme sırasında veya kateter bakımı sırasında) mikroorganizmalar tarafından kolonizasyonudur (44).

SVK kullanımından bağımsız, KNS'lere bağlı kan dolaşım enfeksiyonları, sıklıkla erken doğmuş yenidoğanlar, hematolojik ve solid organ malinitesi olan hastalarda kemoterapiye sekonder gelişen nötropeni, bozulmuş mukoza bariyerleri ve bakteriyel translokasyona bağlı olarak gelişir. KNS'ler bu hasta gruplarında sepsisin yaklaşık %20-40'ını oluşturmaktadır. KNS'ler onkoloji servislerinde baskın klonlar oluşturarak nozokomiyal salgınlara da neden olabilmektedir (1).

Yabancı Cisim Varlığına Bağlı Olarak Oluşan Lokal Enfeksiyonlar

Prostetik Eklem Enfeksiyonları (PEE) ve Osteomyelit

KNS'ler protez varlığında eklem enfeksiyonlarına ve nadir olarak kardiyotorasik cerrahi sonrasında osteomyelite neden olabilmektedir (45). Eklem enfeksiyonları için risk faktörleri arasında romatoid artrit, diyabet, kronik böbrek yetmezliği, obezite, lenfödem, malignite gibi komorbid hastalıklar; steroid, immun süpresif ve immun modülatör ilaç kullanımı, uzamış cerrahi süresi, yara yeri ile ilgili postoperatif komplikasyonların varlığı, mevcut bakteriyemi ve daha önce cerrahi bölgesinde geçirilmiş enfeksiyon varlığı sayılabilir (46, 47). KNS'lere bağlı gelişen PEE gecikmiş başlangıçlı (postoperatif >12 ay) enfeksiyon nedenidir (48). Gelişen enfeksiyonlar daha çok kalıcı eklem ağrısı ve protezde yetmezlik bulgularıyla sessiz bir klinik göstermektedir (49). KNS'ler kültürde tekrarlayan üreme olması durumunda etken olarak kabul edilmeli ve özellikle *S. lugdunensis* gibi türlerin yüksek virulans göstermesi nedeniyle tür düzeyinde tanımlanmalıdır (50).

Beyin Omurilik Sıvısı ve Şant Enfeksiyonları

Etiyolojik durum, hasta yaşı, aşılanma durumu, cerrahi girişim varlığı, altta yatan ek hastalıklara bağlı olarak değişkenlik göstermekle birlikte stafikoloklar menenjit vakalarının %80 inden fazlasında etken olarak saptanmaktadır. Bu oranda KNS'lerin yıllar içindeki sıklığı artmaktadır.

S. epidermidis en sık izole edilen tür iken, *S. haemolyticus* baskın olmak üzere *S. schleiferi*, *S. saprophyticus*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. lugdunensis*, *S. hominis* gibi diğer KNS türleri de enfeksiyon etkeni olarak bildirilmiştir. Genellikle immun supresyonu olan hematolojik maliniteli hastalarda ve yenidoğanlarda geçirilmiş nörocerrahi ve ventriküloperitoneal şant varlığında enfeksiyona neden olmaktadır. Menenjit vakalarında *S. lugdunensis* yüksek virulansı, *S. haemolyticus* yüksek metisilin direnci, *S. capitis* ve *S. warneri* yenidoğanlarda daha sık görülmesi nedeniyle öne çıkmaktadır (51). *S. hominis* ise üretra florası, kasık bölgesi ve prostatik sekresyon gibi vücut sıvılarında bulunmasından dolayı sakral bölgede yapılan cerrahiler ve epidüroskopi işlemlerine sekonder menenjite neden olabilmektedir (52).

Doğal ve Protez Kapak Endokarditi

KNS'ler altta yatan risk faktörlerine bağlı olarak infektif endokarditin (İE) en önemli nedenleri arasındadır. KNS'ler prostetik kapak ve sağlık bakımı ilişkili İE, daha nadir olarak toplum kaynaklı ve doğal kapak endokarditine neden olmaktadır. Ayrıca intravenöz ilaç kullanımı ilişkili endokarditlerde ise *S. aureus*, streptokok türlerinden sonra en sık görülen üçüncü etkindir. 1500'den fazla doğal kapak endokardit vakasını içeren büyük bir çalışmadan elde edilen veriler KNS lerin %6 lık bir payı olduğunu göstermektedir (53). KNS'ler arasında İE nin en sık etkeni *S. epidermidis* olmakla birlikte *S. lugdunensis*, *S. hominis*, *S. capitis*, *S. haemolyticus* gibi türler etkenler arasında sıralanabilir. KNS'ler yapay kapakların yanında kalp pili kablolarını, implante defibrilatörleri ve stent çevrelerini de enfekte edebilmektedir (1). *S. lugdunensis*, agresif bir patojen olması ve daha sık apse oluşumu, kapak destrüksiyonu hızlı ilerleyen tablo ile hızlı kapak değişimine giden doğal kapak endokarditine neden olması nedeniyle KNS'ler arasında önemli bir yere sahiptir (54).

Peritoneal Diyaliz Kateteri İlişkili Enfeksiyonlar

Devamlı ayaktan peritoneal diyaliz alan kişi sayısı kronik böbrek yetmezliği hastalarının sayısının artmasına bağlı olarak artmaktadır. Peritonit, periton diyalizinin en önemli komplikasyonlarından biridir ve tekrarlayan ataklar hastaların hemodiyalize geçmesindeki en önemli nedendir.

Ayaktan periton diyalizi alan hastaların yaklaşık olarak %45-50'sinde etken cilt kaynaklı gram pozitif mikroorganizmalar ve bunlar içindeki en yüksek oran da KNS'lere aittir. Hastaların % 17-50'sinde enfeksiyon etkeni *S. epidermidis* olarak bildirilmiştir (1, 2, 55).

Göz Enfeksiyonları

KNS'ler katarakt cerrahisi, intaroküler lens implantasyonu ve intravitreal enjeksiyona sekonder görülen endoftalmi, korneal yüzey hasarı olan ve oküler travması olan hastalarda keratit, keratoplasti sonrası sutur ilişkili kornea enfeksiyonlarına neden olabilmektedir. Bununla birlikte kronik dakriyosistit ve yenidoğanlarda hastane kaynaklı konjonktivite de neden olabilmektedir (1, 56, 57).

Üriner Sistem Enfeksiyonları

KNS'ler üriner sistem anomalisi, renal transplantasyon, kateter ve taş varlığında ve genç cinsel aktif kadınlarda akut, komplike olmayan alt üriner sistem enfeksiyonuna neden olmaktadır. *S. saprophthicus* toplum kaynaklı üriner sistem enfeksiyonlarının üropatojen *E. coli*' den sonra ikinci en sık nedenidir. *S. epidermidis* üriner sistem kateterizasyonu olan hastalarda alt ve üst üriner sistem enfeksiyonlarına, nadir olarak ise ürosepsise neden olabilmektedir. Daha nadir olarak KNS'ler yaşlı erkeklerde üretrit ve prostatite neden olabilmektedir (58-60).

Cilt ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları

KNS'ler ileri yaşa bağlı olarak altta yatan komorbid hastalıklar varlığında (diyabet, böbrek yetmezliği, sistemik romatolojik hastalıklar, bazal hücreli karsinom ve malign melanom gibi cilt maligniteleri), immunsupresyon durumunda, cerrahi yaralarda ve tıbbi implantları olan hastalarda cilt ve yumşak doku enfeksiyonları oluşturabilmektedir. *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lugdunensis*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. auricularis* gibi türler apse, inflame kist paronişi, folikülit, fronkül, sinüs trakt enfeksiyonu ve vulvar yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olmaktadır (61-65). *S. intermedius* ise hayvanların ağız florasında yaygın olarak bulunduğundan hayvan ısırıklarına sekonder gelişen yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olabilmektedir (66).

Yenidoğan Enfeksiyonları

Yenidoğanlar ve prematüre yenidoğanlar, KNS'ler gibi düşük patojeniteye sahip mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların sağlıklı çocuklar veya yetişkinlerden daha yüksek oranda görülebileceği özellikli hasta grubudur. KNS'ler immatür bağışıklık sistemi ve bozulmuş mukoza bariyerlerine sekonder çok düşük doğum ağırlığındaki yenidoğanlar başta olmak üzere yenidoğan ünitelerindeki geç başlangıçlı hastane kaynaklı sepsisin nedenlerinden biridir. Bununla birlikte KNS'ler yenidoğanlarda santral venöz ve umbilikal kord kateterizasyonuna bağlı enfeksiyonlara, infektif endokardit, menenjit ve nekrotizan fasiit gibi daha invaziv enfeksiyonlara ve hastane kaynaklı konjunktivitlere neden olabilir (1, 67).

Koagülaz Negatif Stafilocların Laboratuvar Tanısı

Defibrine %5 koyun kanı içeren triptik soya Columbia kanlı agar, klinik örneklerden stafilokok izolasyonu için kullanılan temel besiyeridir. KNS'ler genellikle 18-24 saat sonunda gözle görülebilen koloniler oluştururlar. Gram boyama, koloni morfolojisinin incelenmesi ve biyokimyasal temelli yöntemlerin kullanılması ile tanımlanabilirler. Ancak günümüzde MALDI-TOF MS (Matriks assisted lazer desorption ionization time of flight massspectrometry) başta olmak üzere otomatize tanımlama sistemleri ve moleküler temelli yöntemlerin kullanımı tür düzeyinde kesin tanı konulmasını sağlar (1).

Koloni Morfolojisi ve Mikroskopik inceleme

KNS'ler pigmentsiz, düzgün yüzeyli, konveks, parlak, opak ve 18-24 saatte gözle görülebilen koloniler oluştururlar. Çoğu suş beyaz-gri renkli koloniler oluştururken *S. chromogenes*, *S. devriesei*, *S. lugdunensis*, *S. sciuri*, *S. vitulinus*, *S. warneri* ve *S. xylosus* gibi KNS türleri sarı, sarı-turuncu pigmentasyon gösterebilir. Bazı KNS suşlarının (*S. haemolyticus* ve *S. lugdunensis*) çevresinde belirgin veya silik bir beta hemoliz zonu oluşabilir. KNS'ler aynı zamanda küçük koloni varyantlar oluşturarak nokta başı şeklinde pigmentsiz ve hemolitik olmayan koloniler de oluşturabilir. Bu görüntü özellikle normal kolonilerin küçük koloni varyantları şeklinde ürediğinde karışık bir kültür görünümüne sebep olabilir (1, 10, 68).

Gram boyama ile mikroskopik inceleme steril örneklerdeki mikroorganizmayı tespit etmek için direkt olarak örnekten ya da üreyen kolonilerden yapılabilir. Gram boyama yaymalarında stafilokoklar 0,5–1,5 µm arasında değişen gram pozitif sporsuz kok morfolojisindedir. Genellikle çiftler, dörtlüler halinde veya düzensiz (üzüm benzeri) kümeler halinde bulunurken kısa zincirler halinde de bulunabilirler (1, 10, 68).

Katalaz testi

Katalaz varlığı, lam üzerine aktarılan bakteri kolonisi üzerine %3'lük H₂O₂ eklenmesi ile tespit edilir. Enzim mevcut ise, 10 saniyede güçlü köpük ya da hava kabarcıkları gözlenir. Hava kabarcıklarının oluşmaması veya 20 saniyeden sonra oluşması halinde sonuç negatif olarak yorumlanır (69).

Koagülaz Testi

Üreyen mikroorganizma stafilok olarak adlandırıldıktan sonra koagülaz testi kullanılarak *S. aureus*/KNS ayrımı yapılmalıdır. Koagülaz, fibrinojeni fibrin oluşturmak üzere aktive ederek pıhtı gelişimine neden olan termostabil trombin-benzeri bir maddedir. Koagülaz hücre tarafından ortama salınan “serbest koagülaz” ve hücre duvarında “bağlı koagülaz” veya “kümelenme (clumping) faktörü” olarak adlandırılan bir fibrinojen bağlayıcı yüzey reseptörü olmak üzere iki şekilde bulunur. Tüp ve lam testleriyle koagülaz oluşumu araştırılabilir (69).

Tür Tanımlaması için Kullanılan Biyokimyasal Testler

KNS'lerin tür düzeyinde tanımlanmasında novobisin duyarlılığı, üreaz, PYR (L-pirolidonil-β-naftilamid), ornitin dekarboksilaz ve aerobik olarak mannozdan asit üretimine dayanan 5 testen oluşan bir biyokimyasal tanımlama algoritması önerilmiş ve bu testlerden oluşan basit bir şemanın mikrobiyoloji laboratuvarlarında KNS türlerinin pratik bir şekilde tanımlanmasında kullanılabileceği belirtilmiştir (70). Ancak günümüzde biyokimyasal testler yerini otomatize laboratuvar tanı sistemlerine bırakmıştır. MALDI-TOF MS stafilokok türlerinde ve birçok mikroorganizmada yaklaşık olarak %97 oranında yüksek bir özgüllükle tanımlama yapabilen en yeni tanı araçlarından biridir (1).

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmaya Pamukkale Üniversitesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji birimine çeşitli klinikler tarafından gönderilen kan kültürü örneklerinden izole edilmiş olan 150 KNS suşu dahil edildi. En az iki set kan kültürü istemi olan ve kan kültüründe KNS üremesi saptanan hastalara ait veriler hastane bilgi sistemi ve laboratuvar bilgi sistemleri üzerinden araştırıldı. Elde edilen klinik ve laboratuvar verileri ile rehber önerileri temel alınarak izole edilen suşların 50'si etken ve 100'ü kontaminasyon izolatu olarak gruplandırıldı (71). Aynı hastaya ait setlerden izole edilmiş olan tek bir suş çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen suşlar gliserollü buyyon sıvı besiyerine pasajlanarak çalışma anına kadar -20 °C'de uygun koşullarda saklandı. Çalışma anında stoklanmış suşlar %5 koyun kanlı besiyerine ekilerek 35°-37°C'de 24 saat inkübe edilerek canlandırıldı. Tüm çalışmalarda taze kültürlerden elde edilmiş olan koloniler kullanıldı.

Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı (Tarih: 22/02/2022 ve Karar No:04) alınarak gerçekleştirildi.

SUŞLARIN ETKEN VE KONTAMİNANT OLARAK AYRIMI

Suşların etken kontaminat izolat olarak ayrımı klinik ve mikrobiyolojik veriler kullanılarak yapılmıştır (71). Mikrobiyolojik olarak; pozitif sinyal veren şişe sayısı, farklı setlerde üreme olması, üreyen bakterinin aynı türe ait olması ve pozitif sinyal süresi değerlendirilirken, hastanın enfeksiyonun klinik bulgularının olması araştırılmıştır. Suşların etken ve kontaminant olarak sınıflandırılmasında kullanılmış olan kriterler Tablo'5 de belirtilmiştir.

SUŞLARIN İZOLASYONU VE TANIMLANMASI

Kan kültürü örneklerinden izole edilen KNS suşları rutin laboratuvar iş akışı takip edilerek seçildi. Pamukkale Üniversitesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji birimine gönderilen kan kültürü şişeleri otomatize kan kültür takip sistemi BD BACTEC™ (Becton Dickinson and Company, Sparks, USA) kullanılarak 7 gün takip edildi.

Tablo 5. İzole Edilmiş Olan KNS Suşlarının Etken veya Kontaminant Kabul Edilme Kriterleri (71)

Kontaminant Kabul Edilme Kriterleri	Etken Kabul Edilme Kriterleri
Hastanın birden fazla kan kültürü setinden sadece birinde üreme olması	Birden fazla sette aynı tür mikroorganizmanın üremesi
Hastanın bu organizma ile enfeksiyonuna dair klinik veya mikrobiyolojik kanıtın bulunmaması	Üreyen mikroorganizmanın aynı antibiyotik duyarlılık profiline sahip olması
İntravasküler kateter kültürleri ve periferik ven kültürleri pozitif olduğu halde izole edilen bakterilerin birbirinden farklı olması	Enfeksiyonun klinik bulgularının olması
İntravasküler kateter kültürleri negatif iken periferik venden alınan kan kültüründe üreme olması	Pozitif sinyal verme süresinin <48 saat olması (Birden fazla şişede üreme olması durumunda ilk üreyen şişenin pozitif sinyal verme zamanı kabul edildi)
	Kateterden alınan kan kültürlerinde eş zamanlı alınan periferik kan kültürlerinden en az 120 dk öncesinde pozitifleşme olması

Pozitif sinyal veren şişeler pozitif sinyal verme süreleri kaydedilerek gram boyama ile değerlendirildi. Ardından %5 koyun kanlı agar ve EMB agara ekimi yapılarak 35-37 °C’de 24 saat inkübe edildi. Üreyen bakterilerin koloni morfolojisi ve gram boyaması değerlendirilerek; gram pozitif boyanmış suşlara sırasıyla katalaz lam ve tüp koagülaz testleri yapıldı. Katalaz testi için test edilecek bakteri kolonisi lam üzerine alındı ve üzerine %3’lük H₂O₂ eklendi. On saniye içinde güçlü köpük ve hava kabarcığının oluşması pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi.

Katalaz pozitif suşlara önce lam koagülaz testi uygulandı. Bakteri süspansiyonu üzerine 10-15 mikrolitre tavşan plazması eklendi. Plazma ilavesini takiben on saniye içinde kümelenme görülmesi pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi.

Tüp koagülaz testi için ise 0,5 mL tavşan plazması içeren tüp oda ısısına getirildi. Üreyen koloni plazma içinde homojenize edilerek 35-37°C de 4 saate kadar inkübe edildi. Dört saat sonunda pıhtılaşma olması pozitif reaksiyon olarak değerlendirilirken, pıhtılaşma olmayan tüplerin oda sıcaklığında 24 saate kadar inkübasyonu devam ettirildi. İnkübasyon süresi sonunda pıhtılaşma olmayan tüpler koagülaz negatif olarak değerlendirildi (69).

Katalaz pozitif, koagülaz negatif suşlar KNS olarak değerlendirildi ve BD Phoenix-100 (Becton Dickinson and Company, Sparks, ABD) otomatize bakteri tanımlama sistemi ile gram pozitif tanımlama ve antibiyogram için Phoenix Panel PMIC/ID-600 kitleri kullanılarak tür düzeyinde tanımlandı.

ŞUŞLARIN ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIĞININ ARAŞTIRILMASI

Çalışmaya alınan suşların antibiyotik duyarlılıkları Phoenix Panel PMIC/ID-600 (Becton Dickinson and Company, Sparks, USA) kiti kullanılarak minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri belirlenerek araştırıldı. Amikasin, siprofloksasin, klindamisin, daptomisin, eritromisin, fosfomisin, fusidik asit, levofloksasin, linezolid, moksifloksasin, rifampin, teikoplanin, gentamisin, tetrasiklin, trimetoprim sülfametaksazol ve vankomisin için elde edilen MİK değerleri EUCAST önerileri doğrultusunda yorumlandı (72). Metisilin direncinin tespiti için otomatize sistem ile belirlenen oksasilin MİK değerine ek olarak sefoksitin disk difüzyon yöntemi de kullanıldı.

Disk diffüzyon yöntemi ile Metisilin Direncinin Saptanması

Çalışmaya alınmış olan suşların kanlı agarda üreyen kolonilerinden 0,5 McFarland bulanıklığında süspansiyonları hazırlandı. Müller-Hinton Agar (MHA) besiyerine eküvyonla yayılarak ve 30 µg'lık sefoksitin diski yerleştirildi. 35-37°C'de 24 saat süre inkübasyon sonrasında plakların zon çapları EUCAST kuralları doğrultusunda değerlendirildi (72). *S. epidermidis* ve *S. lugdunensis* suşları için >27 mm duyarlı, ≤27 dirençli; dışında kalan diğer koagülaz negatif stafilokoklar için >22 duyarlı, ≤22 ise dirençli olarak değerlendirildi (72).

BİYOFLİM OLUŞUMUNUN FENOTİPİK YÖNTEMLE BELİRLENMESİ

Biyofilm oluşumunun fenotipik olarak belirlenmesi için Christensen ve arkadaşlarının daha önce tanımlamış oldukları mikropalak yöntemi literatür önerileri doğrultusunda modifiye edilerek çalışıldı ve değerlendirildi (73-76). Çalışmalar için -20°C’de stoklanmış olan izolatlar uygun koşullarda yeniden canlandırılarak kanlı agara pasajları yapıldı. Kanlı agardaki taze bakteri kolonileri kullanılarak 0,5 McFarland (10^8 kob/mL) standartında bakteri süspansiyonları hazırlandı. Hazırlanan bu bakteri süspansiyonunun 20 µl’si steril 96 kuyucuklu düz tabanlı mikropalak kuyucuklarına aktarıldı. Üzerlerine %1 glukoz içeren 180 µl brain heart infüzyon broth (BHI) eklenerek 24 saat süre ile 37°C’de inkübe edildi. Ertesi gün mikropalak boşaltılarak üç kez pipetle 200 µl PBS (pH 7.2) çözeltisi eklenerek yıkandı ve hafifçe vurularak boşaltıldı. Böylece tutunmayan bakterilerin uzaklaşması sağlandı. Daha sonra mikropalate 37°C’de 2 saat inkübe edilerek fiksasyon işlemi uygulandı. Ardından mikropalate 150 µl % 0,1’lik kristal viyole ile boyanarak oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda akan suda yıkandı, ters çevirilerek oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Ardından her kuyucuğa 150 µl %95’lik etanol eklenerek boyanın çözünmesi için 30 dakika oda sıcaklığında çalkalanmadan inkübe edildi (73). Mikropalate BioTek Elx808 optik elisa okuyucuda 540 nm dalga boyunda okutuldu (76). Her suş için test üç ayrı kuyucukta olmak üzere üç defa çalışıldı. Her mikropalate çalışmasında pozitif kontrol suş olarak *S. epidermidis* ATCC 35984 ve negatif kontrol suş olarak *S. epidermidis* ATCC 12228 de test edildi (73, 74, 76).

Sonuçlar test edilen çalışma suşunun üç ayrı kuyucuktan elde edilen optik dansitelerinin ortalama değerinin, biyofilm oluşturmayan *S.epidermidis* ATCC 12228 ve güçlü biyofilm oluşturan *S.epidermidis* ATCC 35984 ‘den elde edilen absorbands değerleri ile karşılaştırılarak yorumlandı. Negatif kontrol *S.epidermidis* ATCC 12228’den elde edilen optik dansite ortalamasının üzerine negatif kontrolün üç standart sapması eklenerek elde edilen değer, çalışmaya ait cut-off değeri (ODc) olarak kabul edildi. Her mikropalate çalışmasında o çalışmaya özgü cut-off değeri (ODc) hesaplandı (75).

Sonuçlar elde edilen optik dansitelerine göre aşağıda belirtildiği şekilde değerlendirildi.

- $OD < OD_c$: negatif
- $OD_c < OD < 2 \times OD_c$: Zayıf düzeyde pozitif
- $2 \times OD_c < OD < 4 \times OD_c$: Orta düzeyde pozitif
- $4 \times OD_c < OD$: Güçlü düzeyde pozitif olarak yorumlandı (73, 75).

VİRÜLANS FAKTÖR GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Bakteriyel DNA'nın izolasyonu

Bakteri DNA'sının elde edilmesinde kaynatma yöntemi kullanıldı. KNS suşlarının %5 koyun kanlı agarda üreyen kolonilerden birkaç koloni alınıp brain-heart infüzyon (BHI) broth içine homojen olarak süspanse edilerek bir gece 37 °C'de inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda ependorf tüpüne 1 ml alınarak 10 dakika boyunca 13.000 rpm'de santrifüj edildi ve üstte kalan sıvı atıldı. Dipte kalan çökelti üzerine 200 µl distile su ilave edilerek Thermo Block TDB-120 (Biosan) cihazında 10 dakika boyunca 100 °C de inkübe edilerek kaynatıldı. Ardından tekrar 10 dakika boyunca 13.000 rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası süpernatantın 150 µl kısmı PCR için kalıp DNA olarak kullanılmak üzere alikotlanarak -20 °C 'de saklandı (77).

***Mec A* Gen Varlığının Araştırılması**

Mec A genin varlığı aşağıda belirtilmiş olan primer dizileri kullanılarak araştırıldı (78).

mec A-F: 5'-GAAATGACTGAACGTCCGAT-3'

mec A-R: 5'-GCGATCAATGTTACCGTAGT-3'

İnhouse PCR çalışmasında amplifikasyon karışımı bir örnek için toplam 50 µl olacak şekilde aşağıdaki şekilde hazırlandı.

PCR Buffer (10 X)	5 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	5 µl
Primer F (100 pmol/µl)	1 µl
Primer R (100 pmol/µl)	1 µl
Taq DNA polimeraz (5 Ü/µl)	0,5 µl
DNA	5 µl
Nuclease free distile su	31,5 µl

Thermal cycler (Mycycler, BIO-RAD, ABD) PCR döngü koşulları aşağıdaki şekilde düzenlendi (21).

Ön denatürasyon: 94 °C 5 dk

Denatürasyon: 94 °C 30 sn Primer bağlanması: 55 °C 30 sn Primer uzaması: 72 °C 1 dk	} 35 siklus
---	-------------

Son uzama: 72 °C 5 dk

PCR amplifikasyon ürünleri TBE tamponu (1X) ile hazırlanmış ve etidyum bromid ile boyanmış %1,5 agaroz jelde 110 volt akımda 50 dakika elektroforez cihazında (nanoPAC-300P Cleaver scientific UK) yürütüldü. Elektroforez sonrası elde edilen DNA bantları UV translüminatör altında görüntülenerek yorumlandı ve fotoğraflandı. Amplifiye edilen DNA ürünü 100 bp DNA moleküler belirteci DNA ladder H3 RTU GeneDirex (100-1500 bp) ile karşılaştırılarak değerlendirildi. *S. epidermidis* ATCC 35984 pozitif kontrol, *S. epidermidis* ATCC 12228 ise negatif kontrol olarak kullanıldı.

Amplifikasyon sonucunda 154 bp büyüklüğünde bant görülmesi *mec A* gen varlığı için pozitif olarak değerlendirildi (78).

***sasX* Gen varlığının araştırılması**

sasX gen varlığı aşağıda belirtilmiş olan primer dizileri kullanılarak araştırıldı (22).

sasX F: 5'-AGAATTAGAAGTACGTCTAAATGC-3'

sasX R: 5'-GCTGATTATGTAAATGACTCAAATG-3'

PCR çalışmasında amplifikasyon karışımı bir örnek için toplam 50 µl olacak şekilde aşağıdaki şekilde hazırlandı.

PCR Buffer (10 X)	5 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	5 µl
Primer F (100 pmol/ µl)	1 µl
Primer R (100 pmol/ µl)	1 µl
Taq DNA polimeraz (5 Ü/ µl)	0,5 µl
DNA	5 µl
Nuclease free distile su	31,5 µl

Thermal cycler (Mycycler, BIO-RAD, ABD) PCR döngü koşulları aşağıdaki şekilde düzenlendi (21).

Ön denatürasyon: 94 °C 3 dk

Denatürasyon: 94 °C 1 dk	} 35 siklus
Primer bağlanması: 55 °C 1 dk	
Primer uzaması: 72 °C 1 dk	

Son uzama: 72 °C 5 dk

PCR amplifikasyon ürünleri TBE tamponu (1X) ile hazırlanmış ve edityum bromid ile boyanmış %1,5 agaroz jelde 110 volt akımda 50 dakika elektroforez cihazında (nanoPAC-300P Cleaver scientific UK) yürütüldü.

Elektroforez sonrası elde edilen DNA bantları UV translüminatör altında görüntülenerek yorumlandı ve fotoğraflandı. Amplifiye edilen DNA ürünü 100 bp DNA moleküler belirteci DNA ladder H3 RTU GeneDirex (100-1500 bp) ile karşılaştırılarak değerlendirildi. *S. epidermidis* ATCC 35984 pozitif kontrol, olarak kullanıldı. Amplifikasyon sonucunda 522 bp büyüklüğünde bant görülmesi *sasX* gen varlığı için pozitif olarak değerlendirildi (22).

ACME (*ArcA*, *Opp3B*, *KdpA*) Genlerinin Varlığının Araştırılması

ACME *ArcA*, *Opp3B*, *KdpA* genlerinin varlığı aşağıda belirtilmiş olan primer dizileri kullanılarak mütipleks PCR ile araştırıldı (23, 24, 79).

Arc A F: 5'-GAGCCAGAAGTACGCGAG-3'

Arc A R: 5'-CACGTAACCTTGCTAGAACGAG-3'(23)

Opp3B F: 5'-GGATTGCCCCAAGTGATGACC-3'

Opp3B R: 5'-GACTGCTGGGTATGACGT-3'(79)

KdpA F: 5'-CGGTTTAACTGGTGCGTT-3'

KdpA R: 5'- GCAATACATACAGCGTAGCC-3'(24)

Multipleks PCR çalışmasında amplifikasyon karışımı bir örnek için toplam 50 µl olacak şekilde aşağıdaki şekilde hazırlandı.

PCR Buffer (10 X)	5 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	5 µl
Primer F (100 pmol/µl)	0,25 µl (her bir gen bölgesi primeri için)
Primer R (100 pmol/ µl)	0,25 µl (her bir gen bölgesi primeri için)
Taq DNA polimeraz (5 Ü/µl)	0,5 µl
DNA	5 µl
Nuclease free distile su	32 µl

Thermal cycler (Mycycler, BIO-RAD, ABD) PCR döngü koşulları aşağıdaki şekilde düzenlendi (24).

Ön denatürasyon: 94 °C 2 dk

Denatürasyon: 94 °C 30 sn	}	35 siklus
Primer bağlanması: 60 °C 30 sn		
Primer uzaması: 72 °C 45 sn		

Son uzama: 72 °C 5 dk

PCR amplifikasyon ürünleri TBE tamponu (1X) ile hazırlanmış ve edityum bromid ile boyanmış %1,5 agaroz jelde 110 volt akımda 50 dakika elektroforez cihazında (nanoPAC-300P Cleaver scientific UK) yürütüldü. Elektroforez sonrası elde edilen DNA bantları UV translüminatör altında görüntülenerek yorumlandı ve fotoğraflandı. Amplifiye edilen DNA ürünü 100 bp DNA moleküler belirteci DNA ladder H3 RTU GeneDirex (100-3000 bp) ile karşılaştırılarak değerlendirildi. *S.epidermidis* ATCC 12228 ACME ArcA için pozitif kontrol olarak kullanıldı (24).

Amplifikasyon sonucunda 724 bp büyüklüğünde bant görülmesi ArcA, 530 bp büyüklüğünde bant görülmesi *Opp3B* ve 241 bp büyüklüğünde bant görülmesi *KdpA* gen varlığı için pozitif olarak değerlendirildi (24).

Biyofilm ilişkili *icaA*, *icaD*, *IS256*, *aap*, ve *bhp* virülans genlerinin araştırılması

Biyofilm ilişkili genlerin PCR yöntemi ile araştırılmasında kullanılan primer dizileri, PCR döngü koşulları ve oluşan ürünlerin boyutları tablo 6'da gösterilmiştir.

Biyofilm ilişkili genlerin PCR çalışmalarında amplifikasyon karışımı bir örnek için toplam 50 µl olacak şekilde aşağıdaki şekilde hazırlandı. Her bir gen bölgesi için tabloda belirtilen primerlerler kullanılarak PCR çalışması düzenlendi ve gerçekleştirildi.

İcaA, *icaD*, *IS256*, *aap* ve *bhp* gen bölgelerinin PCR çalışmaları için amplifikasyon karışımı:

PCR Buffer (10 X)	5 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
MgCl ₂ (25 mM)	6 µl
Primer F (100 pmol/ µl)	1 µl
Primer R (100 pmol/ µl)	1 µl
Taq DNA polimeraz (5 Ü/ µl)	0,5 µl
DNA	5 µl
Nuclease free distile su	30,5 µl

PCR amplifikasyon ürünleri TBE tamponu (1X) ile hazırlanmış ve edityum bromid ile boyanmış %1,5 agaroz jelde 110 volt akımda 50 dakika elektroforez cihazında (nanoPAC-300P Cleaver scientific UK) yürütüldü. Elektroforez sonrası elde edilen DNA bantları UV translüminatör altında görüntülenerek yorumlandı ve fotoğraflandı. Amplifiye edilen DNA ürünü 100 bp DNA moleküler belirteci DNA ladder H3 RTU GeneDirex (100-3000 bp) ile karşılaştırılarak değerlendirildi. *S. epidermidis* ATCC 35984 pozitif kontrol, *S. epidermidis* ATCC 12228 ise negatif kontrol olarak kullanıldı. Amplifikasyon sonucunda tablo 6'da belirtilmiş olan amplifikasyon ürün boyutlarında bantların görülmesi aranan gen bölgesinin varlığı için pozitif olarak değerlendirildi.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Veriler Statistical Package for Social Sciences (SPSS) Ver. 25.0 (Armonk, NY: IBM Corp.) paket programıyla analiz edildi. Tanımlayıcı istatistikler sayı ve yüzde dağılımları şeklinde verildi. Kategorik değişkenler arasındaki farklar Pearson ki-kare testi ve Fisher's Exact testi kullanılarak analiz edildi. İstatistiksel analizlerde p değerinin 0.05 den küçük olması anlamlı kabul edildi.

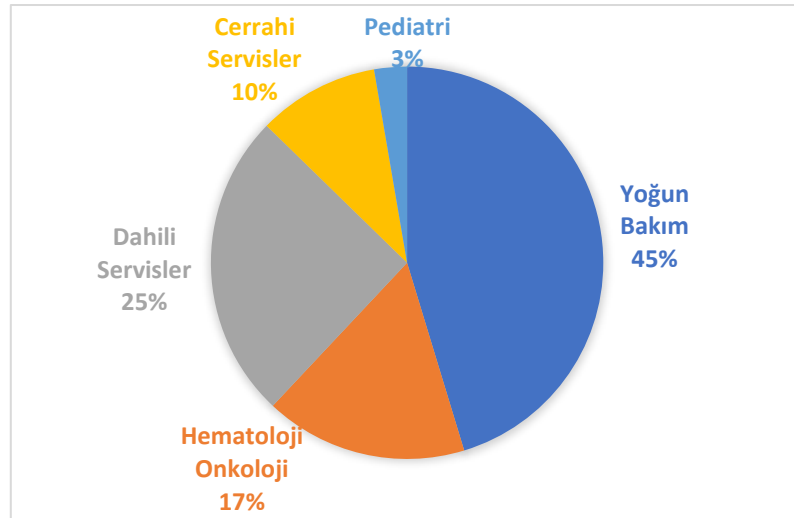
Tablo 6. Biyofilm İlişkili Genlerin Araştırılmasında Kullanılan Primerler, PCR Döngü Kuşulları ve Amplifiye Edilen Ürünlerin Boyutları

Araştırılan gen bölgesi	Kullanılan primer	Ürün boyutu (bp)	PCR döngü koşulları
<i>icaA</i>	F (5'-TCTCTTGCAGGAGCAATCAA-3') R (5'-TCAGGCACTAACATCCAGCA-3') (80)	188	94 °C 5 dk 35 siklus; 94 °C 1 dk 55 °C 1 dk 72 °C 1 dk 72 °C 5 dk (21)
<i>ica D</i>	F (5'-ATG GTC AAG CCC AGA CAG AG) R (5'-CGT GTT TTC AAC ATT TAA TGC AA) (81)	198	30 siklus; 95 °C 30 sn 55 °C 30 sn 72 °C 30 sn (82)
<i>IS256</i>	F(5'-TGAAAAGCGAAGAGATTCAAAGC-3') R(5'-ATGTAGGTCCATAAGAACGGC-3') (83)	1102	30 siklus; 94 °C 1 dk 59 °C 1dk 72 °C 2dk 30 sn (83)
<i>SesD(bhp)</i>	F(5'-ATGAAAAATAAACAAGGATTTC-3') R(5'-GCCTAAGCTAGATAATGTTTG-3') (84)	1278	94 °C 3dk 30 siklus; 94 °C 1 dk 50 °C 1 dk 72 °C 1 dk (85)
<i>SesF(aap)</i>	F(5'-ATACAACTGGTGCAGATGGTTG-3') R(5'-GTAGCCGTCCAAGTTTTACCAG-3) (86, 87)	400	94 °C 3 dk 30 siklus; 94 °C 1 dk 50 °C 1dk 72 °C 1dk 72 °C 5dk (86)

BULGULAR

Pamukkale Üniversitesi Hastanelerinde çeşitli klinikler tarafından takip edilen ve kan dolaşımı enfeksiyonu ön tanısıyla en az iki set kan kültürü istemi olan hastalardan izole edilen 150 KNS suşu bu çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya alınan suşlar Grup 1: Kontaminasyon, Grup 2: Etken olmak üzere iki gruba ayrıldı. Hastalardan gönderilmiş olan birden fazla kültür setinin sadece bir tanesinde üreyen, intravasküler kateter kültürleri negatif iken sadece periferik venden alınan kan kültüründe üremesi olan veya intravenöz kateter ve eş zamanlı periferik vende pozitiflik durumunda izole edilen KNS türlerinin birbirinden farklı olduğu, hastanın bu organizma ile enfeksiyonuna dair klinik kanıtın bulunmadığı durumlarda, kültürlerden izole edilen 100 KNS suşu kontaminasyon grubu olarak sınıflandırıldı. Birden fazla sette aynı tür ve antibiyotik profiline sahip, 48 saatten önce pozitiflik veren, enfeksiyonun klinik kanıtlarının olduğu 50 KNS suşu ise etken grubu olarak sınıflandırıldı.

KNS suşlarının izole edildiği hastaların 68'i (45,3) kadın, 82'si (54,7) erkekti. KNS suşlarının izole edildiği hastaların 68'i (%45,3) yoğun bakım ünitelerinde, 25'i (%16,7) hematoloji – onkoloji servisinde, 38'i (25,3) çeşitli dahili servislerde, 15'i (%10) cerrahi servislerde ve 4'ü (%2,7) ise pediatri servisinde takip edilmekteydi. KNS suşlarının izole edildiği hastaların servislere göre dağılımı şekil 4'de gösterilmiştir.



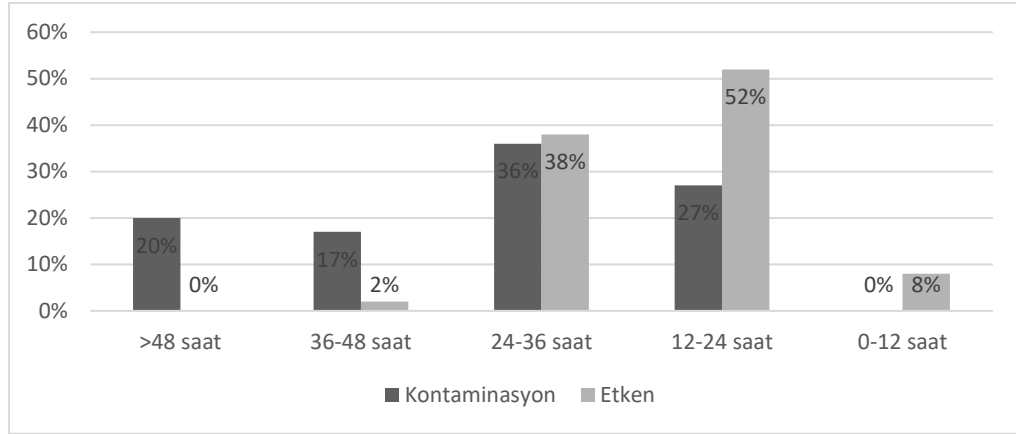
Şekil 4. KNS suşlarının izole edildiği hastaların servislere göre dağılımı

KNS suşlarının izole edildiği hastaların 53'ünde (%35,3) periferik kan kültürleri yanında kateter kan kültürleri de bulunmaktaydı. Etken grubundaki suşların izole edildiği hastalarda, kontaminasyon grubundaki suşların izole edildiği hastalara göre daha yüksek oranda kateter bulunmaktaydı ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,001$). Her iki gruptaki KNS'lerin izole edildiği hastaların kateter bulundurma oranları tablo 7'de gösterilmiştir.

Tablo 7. Etken ve kontaminasyon grubunda kateter varlığının dağılımı

	Kateter varlığı		Toplam
	Var n (%)	Yok n (%)	
Kontaminasyon Grubu	18 (18)	82 (82)	100 (100)
Etken Grubu	35 (70)	15 (30)	50 (100)

Etken ve kontaminasyon grubundaki suşların kan kültürlerinde pozitif sinyal verme süreleri şekil 5'de gösterilmiştir. Kontaminasyon grubunda ortalama pozitif sinyal süresi 35,81 saattir. Kontaminasyon grubundaki suşların 27'si (%27) 12-24 saat aralığında, 36'sı (%36) 24-36 saat aralığında, 17'si (%17) 36-48 aralığında 20'si (%20) ise 48 saatin üzerinde pozitif sinyal verdi. Etken grubunda ortalama pozitif sinyal süresi 21,78 saattir. Etken grubundaki suşların 4'ü (%8) 12 saatin altında, 26'sı (%52) 12-24 saat aralığında, 19'u (%38) 24-36 saat aralığında, 1'i (%2) 36-48 aralığında pozitif sinyal verdi. Grupların pozitif sinyal verme süreleri analiz edildiğinde etken grubundaki suşlar kontaminasyon grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha erken pozitif sinyal verirken; suşların 12-24 saat aralığında sinyal vermesi etken ve 36-48 saat aralığında sinyal vermesi ise kontaminasyon lehine anlamlıydı ($p<0,001$).



Şekil 5. Etken ve kontaminasyon grubundaki suşların kan kültürlerinde pozitif sinyal verme zamanına göre dağılımı

Suşların koloni morfolojisi, gram boyanma özelliği incelenip, katalaz ve koagülaz testlerinin ardından otomatize tanımlama sistemi ile tür düzeyinde tanımlaması yapıldı. KNS suşlarının 95'i (%63,3) *S. epidermidis*, 25'i (%16,7) *S. hominis*, 22'si (14,7) *S. haemolyticus*, 6'sı (%4) *S. capitis*, 1'i (%0,7) *S. intermedius* ve 1'i (%0,7) *S. warneri* olarak tanımlandı. *S. epidermidis* her iki grupta da en yüksek sayıda izole edilen türdü. Etken grubundaki suşların 29'u (%58) *S. epidermidis* olarak tanımlanırken, kontaminasyon grubundaki suşların 66'sı (%66) *S. epidermidis* olarak tanımlanmış ve gruplar arasında *S. epidermidis* olarak tanımlanma oranında fark bulunmamıştır ($p=0,338$). Etken ve kontaminasyon grubunda türlerin dağılımı tablo 8'de gösterilmiştir.

Tablo 8. Etken ve kontaminasyon grubundaki KNS'lerin tür düzeyinde dağılımı

	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. epidermidis</i> Dışı KNS					Toplam
	<i>S. epidermidis</i> n (%)	<i>S. haemolyticus</i> n (%)	<i>S. hominis</i> n (%)	<i>S. capitis</i> n (%)	<i>S. warneri</i> n (%)	<i>S. intermedius</i> n (%)	
Kontaminasyon Grubu	66 (66)	10 (10)	19 (19)	4 (4)	1 (1)	0	100 (100)
Etken Grubu	29 (58)	12 (24)	6 (12)	2 (4)	0	1 (2)	50 (100)
Toplam	95 (63,3)	22 (14,7)	25 (16,7)	6 (4)	1 (0,7)	1 (0,7)	150 (100)

*Satır yüzdesi hesaplanmıştır.

ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIK SONUÇLARI

Suşların antibiyotik duyarlılık testi amikasin, gentamisin, ciprofloksasin, levofloksasin, moksifloksasin, klindamisin, eritromisin, daptomisin, fosfomisin, fusidik asit, , linezolid, rifampisin, tetrasiklin, trimetoprim sülfametaksazol (tmp-sxt), vankomisin ve teikoplanin için otomatize sistem kullanılarak minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri belirlenerek yapıldı. Metisilin direnci oksasiline MİK değeri ve sefoksitin disk difüzyon testi sonuçları ile belirlendi. Sonuçlar EUCAST klinik sınır değerleri referans alınarak yorumlandı (72).

Tüm suşların 28'i (%18,7) sefoksitin duyarlı, 122'si (%81,3) dirençli ve 34'ü (%22,7) oksasiline duyarlı, 116'sı (%77,3) dirençliydi. Oksasiline dirençli 116 suşun tamamı sefoksitine de dirençli iken; oksasiline duyarlı 34 suşun 28'i sefoksitine de duyarlı ancak 6'sı dirençliydi. Etken ve kontaminasyon grubundaki suşların metisilin direnci karşılaştırıldığında iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (oksasiline için $p=0,073$ /sefoksitin için $p=0,138$).

S.epidermidis suşlarında oksasiline ile %76,8, sefoksitin ile %83 oranında metisilin direnci tespit edilirken; *S.epidermidis* dışı KNS'lerde ise her iki yöntemle de %78 oranında metisilin direnci tespit edildi. *S.epidermidis* suşları ve *S.epidermidis* dışındaki KNS suşları karşılaştırıldığında metisilin direnci yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,85$). Suşların metisilin direnç oranları tablo 9'da gösterilmiştir.

Tablo 9. Etken ve kontaminasyon grubunda Metisilin direncinin türlere göre Oksasiline MİK ve Sefoksitin Disk Difüzyon yöntemiyle karşılaştırması

		Kontaminasyon Grubu				Etken Grubu			
		<i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i> dışı KNS			<i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i> dışı KNS		
		n(%)	<i>S.hominis</i> n(%)	<i>S.haemolyticus</i> n(%)	<i>S.capitis</i> n(%)	n(%)	<i>S.hominis</i> n(%)	<i>S.haemolyticus</i> n(%)	<i>S.capitis</i> n(%)
FOX	S	12 (18,2)	7 (36,8)	1 (10)	2 (50)	4 (13,8)	0	1 (8,3)	1 (50)
	R	54 (81,8)	12 (63,2)	9 (90)	2 (50)	25 (86,2)	6 (100)	11 (91,7)	1 (50)
OXA	S	17 (25,8)	7 (36,8)	1 (10)	2 (50)	5 (17,2)	0	1 (8,3)	1 (50)
	R	49 (74,2)	12 (63,2)	9 (90)	2 (50)	24 (82,8)	6 (100)	11 (91,7)	1 (50)

FOX: Sefoksitin, OXA: Oksasiline S: Duyarlı R: Dirençli *Tabloda her iki yöntemle de dirençli bulunan *S.warneri* ve *S.intermedius* belirtilmemiştir.

Suşların antibiyotiklere direnç oranları incelendiğinde tüm suşların 132'i (%88) amikasinine, 65'i (%43,3) gentamisine; 100'ü (%66,7) siprofloksasine, 98'i (%65,3) levofloksasine, 99'u (%66) moksifloksasine, 75'i (%50) klindamisine, 111'i (%74) eritromisine, 53'ü (%35,3) rifampisine, 38'i (%25,3) tetrasikline, 38'i (%25,3) fosfomisine, 116'sı (%77,3) fusidik asite, 6'sı (%4) linezolide, 21'i (%14) teikoplanine, 2'si (%1,3) daptomisine, 61'i (%40,7) TMP-SXT'e dirençliydi. Tüm suşlar vankomisine duyarlıydı. Türlerin gruplara göre antibiyotik duyarlılık sonuçları tablo 10'da gösterilmiştir.

Suşların gruplara göre antibiyotik duyarlılık oranları incelendiğinde etken grubundaki suşlar kontaminasyon grubundaki suşlara göre siprofloksasin ($p=0,037$), levofloksasin ($p=0,051$) ve moksifloksasini ($p=0,028$) içeren kinolon grubuna, eritromisine ($p=0,048$), rifampisine ($p=0,021$) ve tetrasikline (p değeri= $0,008$) anlamlı düzeyde daha dirençli bulunmuştur. Diğer antibiyotiklerde direnç oranlarında anlamlı fark bulunmamıştır. Suşların antibiyotik duyarlılıkları türler arasında *S. epidermidis* ve diğerleri olarak sınıflandırılarak incelendiğinde *S. epidermidis* türü, *S. epidermidis* dışında kalan KNS'lere göre fosfomisin ($p=0,006$), gentamisin ($p <0,001$) ve rifampisine ($p=0,003$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha duyarlı bulunmuştur.

Tablo 10. Etken ve kontaminasyon grubunda türlere göre antibiyotik duyarlılığı

		Kontaminasyon Grubu				Etken Grubu			
		<i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i> dışı KNS			<i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i> dışı KNS		
		n (%)	<i>S.hominis</i> n (%)	<i>S. haemolyticus</i> n (%)	<i>S.scapitis</i> n (%)	n (%)	<i>S.hominis</i> n (%)	<i>S.haemolyticus</i> n (%)	<i>S.scapitis</i> n (%)
AN	S	57(86,4)	19(100)	10(100)	3(75)	25(86,2)	5(83,3)	10(83,3)	2(100)
	R	9(13,6)			1(25)	4(13,8)	1(16,7)	2(16,7)	
GM	S	46(69,7)	10(52,6)	2(20)	3(75)	19(65,5)	2(33,3)	1(8,3)	2(100)
	R	20(30,3)	9(47,4)	8(80)	1(25)	10(34,5)	4(66,7)	11(91,7)	
CIP	I	27(40,9)	8(42,1)	1(10)	3(75)	9(31)		1(8,3)	1(50)
	R	39(59,1)	11(57,9)	9(90)	1(25)	20(69)	6(100)	11(91,7)	1(50)
LVX	I	29(43,7)	8(42,1)	1(10)	3(75)	9(31)		1(8,3)	1(50)
	R	37(56,1)	11(57,9)	9(90)	1(25)	20(69)	6(100)	11(91,7)	1(50)
MXF	S	28(42,4)	8(42,1)	1(10)	3(75)	9(31)		1(8,3)	1(50)
	R	38(57,6)	11(57,9)	9(90)	1(25)	20(69)	6(100)	11(91,7)	1(50)
CC	S	32(48,5)	10(52,6)	6(60)	3(75)	12(41,4)	1(16,7)	3(25)	2(100)
	I	4(6,1)				1(3,4)			
	R	30(45,5)	9(47,4)	4(40)	1(25)	16(55,2)	5(83,3)	9(75)	
E	S	23(34,8)	3(15,8)	2(20)	3(75)	5(17,2)	1(16,7)	1(8,3)	1(50)
	R	43(65,2)	16(84,2)	8(80)	1(25)	24(82,8)	5(83,3)	11(91,7)	1(50)
DA	S	64(97)	19(100)	10(100)	4(100)	29(100)	6(100)	12(100)	2(100)
	R	2(3)							
FF	S	51(77,3)	9(47,4)	10(100)		27(93,1)	4(66,7)	10(83,3)	
	R	15(22,7)	10(52,6)		4(100)	2(6,9)	2(33,3)	2(16,7)	2(100)
FA	S	17(25,8)	5(26,3)	2(20)	3(75)	3(10,3)		2(16,7)	2(100)
	R	49(74,2)	14(73,7)	8(80)	1(25)	26(89,7)	6(100)	10(83,3)	
LZD	S	60(90,9)	19(100)	10(100)	4(100)	29(100)	6(100)	12(100)	2(100)
	R	6(9,1)							
RA	S	51(77,3)	14(73,7)	3(30)	3(75)	19(65,4)	3(50)	3(50)	2(100)
	I						1(16,7)	1(16,7)	
	R	15(22,7)	5(26,3)	7(70)	1(25)	10(34,5)	2(33,3)	2(33,3)	
TE	S	34(51,5)	13(68,4)		4(100)	8(27,6)	1(16,7)	2(16,7)	2(100)
	I	16(24,2)	1(5,3)	8(80)		13(44,8)	1(16,7)	9(75)	
	R	16(24,2)	5(26,3)	2(20)		8(27,6)	4(66,7)	1(8,3)	
SXT	S	37(56,1)	8(42,1)	4(40)	4(100)	10(34,5)		8(66,7)	1(50)
	I	6(9,1)	5(26,3)			2(6,9)	3(50)		
	R	23(34,8)	6(31,6)	6(60)		17(58,6)	3(50)	4(33,3)	1(50)
TEC	S	57(86,49)	18(86,4)	9(90)	3(75)	27(93,1)	6(100)	5(41,7)	2(100)
	R	9(13,6)	1(5,3)	1(10)	1(25)	2(6,9)		7(58,3)	
VA	S	66(100)	19(100)	10(100)	4(100)	29(100)	6(100)	12(100)	2(100)

(Yüzde her tür için kendi içinde hesaplanarak verilmiştir.) AN:Amikasin GM: Gentamisin CIP: Siprofloksasin, LVX: Levofloksasin, CC: Klindamisin, E: Eritromisin, DA: Daptomisin, FF: Fosfomisin, FA: Fusidik asit, LZD: Linezolid, RA: Rifampin, TE: Tetrasiklin, SXT: Trimetopirim sülfametaksazol, TEC: Teikoplanin, VA: Vankomisin

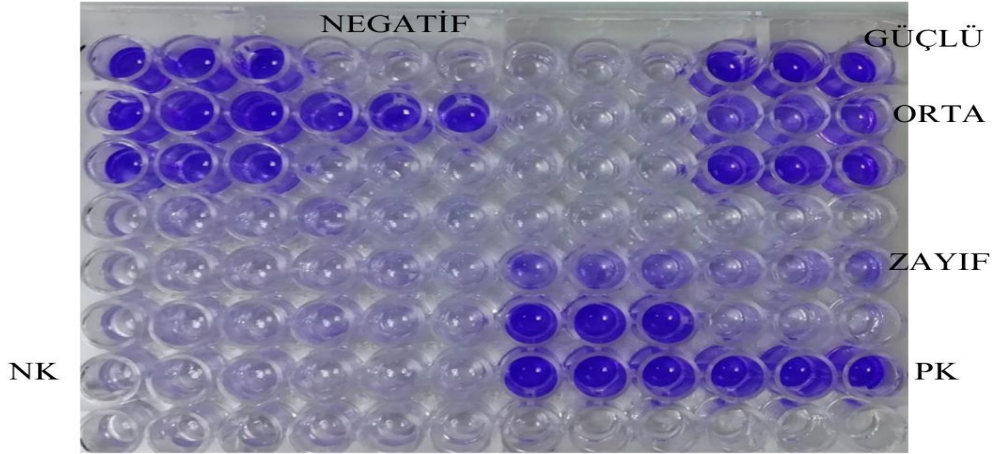
S.warneri ve *S.intermedius* belirtilmemiştir.

S: Duyarlı, I: Yüksek dozda duyarlı, R: Dirençli

FENOTİPİK OLARAK BİYOFİLM OLUŞUMU SONUÇLARI

Biyofilm oluşumu mikropalak yöntemiyle fenotipik olarak değerlendirildiğinde tüm suşların 67'si (%44,7) biyofilm oluşturmazken, 39'u (%26) zayıf derecede, 15'i (%10) orta derecede 29'u (%19,3) ise güçlü derecede biyofilm oluşturdu. Şekil 6'da güçlü biyofilm oluşturan pozitif kontrol ve biyofilm oluşturmayan negatif kontrol ve çalışma suşlarından bazılarının mikrotitrasyon plağındaki sonuçları görülmektedir. Etken grubundaki suşların 26'sı (%52) herhangi bir düzeyde biyofilm oluşturmazken, kontaminasyon grubundaki suşların 57'si (%57) herhangi bir düzeyde biyofilm oluşturdu. Gruplar arasında biyofilm oluşturma oranı açısından anlamlı fark bulunmadı ($p=0,561$). Gruplarda biyofilm pozitifliğinin düzeyleri (zayıf, orta, güçlü) karşılaştırıldığında kontaminasyon grubundaki suşların 30 (%30)'nun zayıf biyofilm, 14 (%14)'ünün güçlü biyofilm oluşturduğu, etken grubundaki suşların ise 9 (%18)'nin zayıf, 15 (%30)'nin güçlü düzeyde biyofilm oluşturduğu bulundu ve biyofilm oluşturma düzeyleri açısından gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p=0,027$). Etken ve kontaminasyon grubundaki suşların biyofilm oluşturma oranları ve düzeyleri tablo 11'de gösterilmiştir.

Kateteri olan 53 hastadan izole edilen KNS suşlarının 32'si (%60,4) biyofilm oluşturmazken (17 suş güçlü düzeyde, 3 suş orta düzeyde, 12 suş zayıf düzeyde), kateteri olmayan 97 hastadan izole edilen KNS suşlarının 51'i (%52,6) biyofilm (12 suş güçlü düzeyde, 12 suş orta düzeyde, 27 suş zayıf düzeyde) oluşturmuştur. Güçlü biyofilm oluşturan suşların izole edildiği hastalarda, biyofilm oluşturmaz suşların izole edildiği hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek oranda kateter varlığı mevcuttu ($p=0,012$).



Şekil 6. Mikrotitrasyon plağında biyofilm oluşumu sonuçları

PK: *S.epidermidis* ATCC 35984; NK: *S.epidermidis* ATCC 12228. Zayıf, orta ve güçlü düzeyde biyofilm oluşumu mikrotitrasyon plağında gösterilmiştir. (Her bir mikrotitrasyon plağında çalışmaya özgü cut off değeri ayrı olarak hesaplanmıştır. Bu çalışma plağı için PK OD: 1,64, NK OD: 0,082, Cut off değeri (ODc): 0,109 olarak hesaplandı)

Tablo 11. Etken ve kontaminasyon grubundaki suşlarda biyofilm oluşum oranları

	Biyofilm Oluşumu			Biyofilm Düzeyi			
	Negatif n (%)	Pozitif n (%)	Toplam n (%)	Zayıf n (%)	Orta n (%)	Güçlü n (%)	Toplam n (%)
Kontaminasyon Grubu	43 (43)	57 (57)	100 (100)	30 (30)	13 (13)	14 (14)	100 (100)
Etken Grubu	24 (48)	26 (52)	50 (100)	9 (18)	2 (4)	15 (30)	50 (100)
Toplam	67 (44,7)	83 (55,3)	150 (100)	39 (26)	15 (10)	29 (19,3)	150 (100)

*Satır yüzdesi hesaplanmıştır.

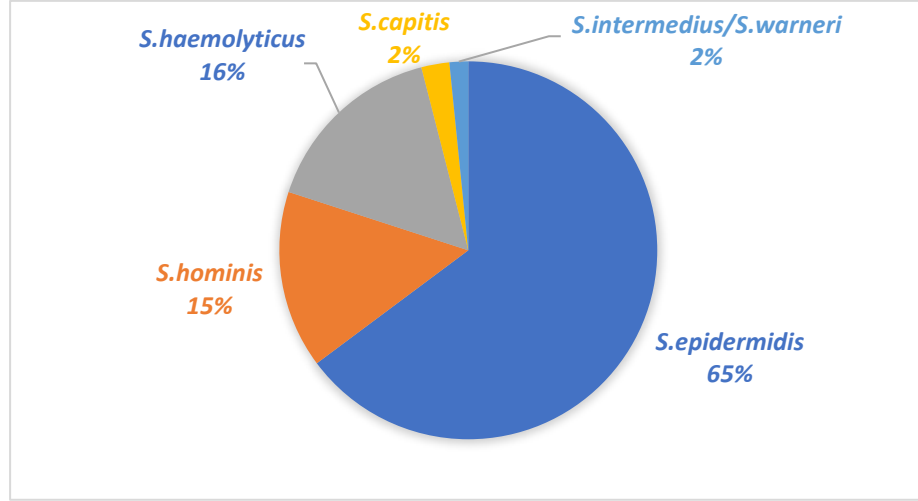
VİRÜLANS FAKTÖR GENLERİNİN PCR SONUÇLARI

Metisilin direncinin genotipik olarak tespiti için PCR yöntemiyle *mecA* geni araştırıldı. Tüm suşların 125'inde *mecA* geni pozitif bulundu. Etken grubundaki suşların 42'sinde (%84) *mecA* pozitif, 8'inde (%16) *mecA* negatif; kontaminasyon grubundaki suşların 83'ünde (%83) *mecA* pozitif, 17'sinde (%17) *mecA* negatif bulundu. *MecA* gen pozitifliği açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanmadı ($p=0,877$). Fenotipik yöntemler ve *mecA* geni ile tespit edilen metisilin direnç oranları tablo 12'de gösterilmiştir.

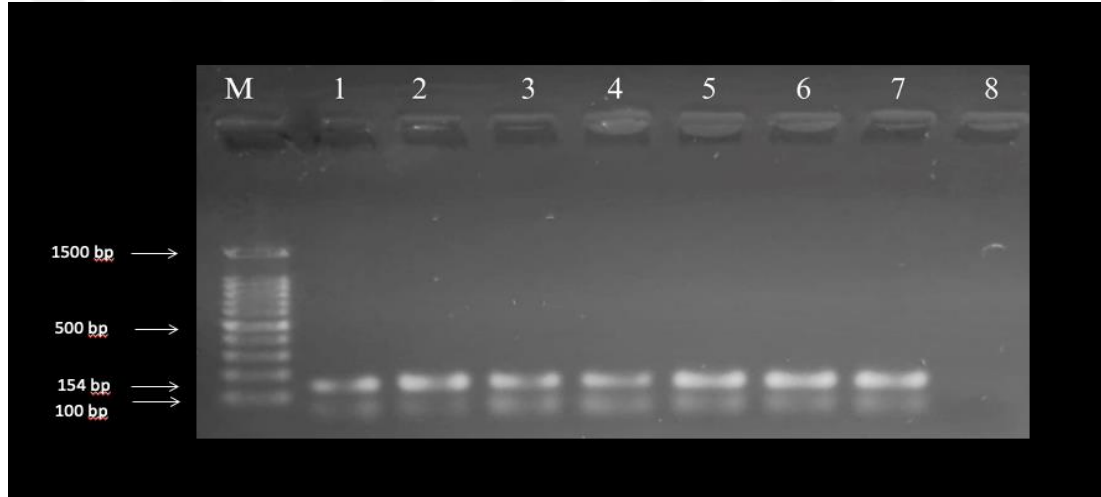
MecA pozitif 125 suşun 81'i (%64,8) *S. epidermidis*, 19'u (%15,2) *S. hominis*, 20'si (%16) *S. haemolyticus*, 3'ü (%2,4) *S. capitis*, 1'i (%0,8) *S. warneri* ve 1'i (%0,8) *S. intermedius* olarak tanımlandı. *S. epidermidis* ve diğer grup KNS'lerde metisilin direnci açısından anlamlı fark bulunmadı ($p=0,544$). *MecA* gen pozitifliği olan suşların türlere göre dağılımı şekil 7'de, PCR görüntüleri şekil 8'de verilmiştir.

Tablo 12. Metisilin direncinin fenotipik ve genotipik yöntemler ile tespit edilme oranları

		<i>MecA</i>	
		Pozitif n (%)	Negatif n (%)
Sefoksitin	Duyarlı (n=28)	8 (28,6)	20 (71,4)
	Dirençli (n=122)	117 (95,9)	5 (4,1)
Oksasilin	Duyarlı (n=34)	13 (38,2)	21 (61,8)
	Dirençli (n=116)	112 (96,6)	4 (3,4)



Şekil 7. *mecA* pozitifliği olan suşların türlere göre dağılımı



Şekil 8. *mecA* geninin PCR jel elektroforez görüntüleri

(M: 100-1500 bp DNA leader, 7. Kuyucukta *S. epidermidis* ATCC 35984, 8. kuyucukta *S. epidermidis* ATCC 12228 ve 1-6. kuyucuklarda *MecA* pozitif bulunmuş bazı suşların sonuçları görülmektedir. Pozitif suşlarda 154 bp'de bantlar görülmektedir.)

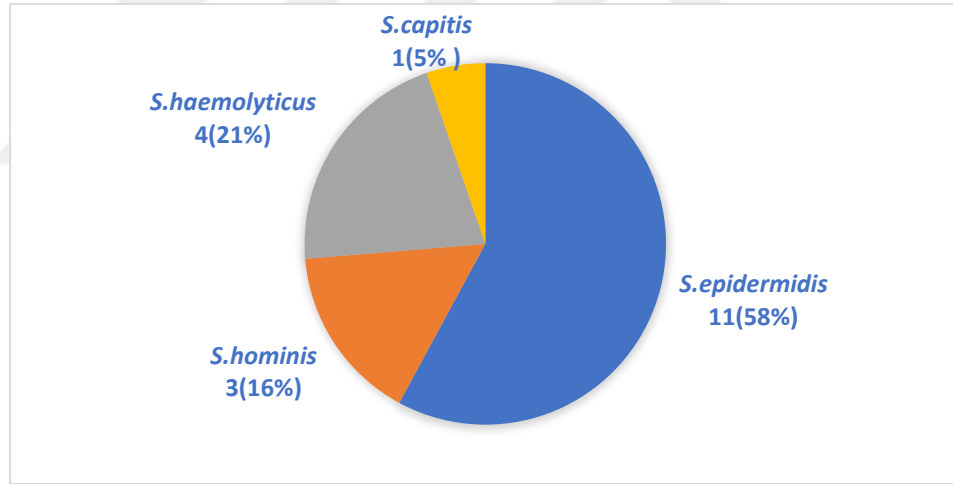
sasX varlığı PCR ile araştırıldığında tüm suşların 19 (%12,6)'unda *sasX* gen bölgesi pozitif bulundu. Kontaminasyon grubundaki 14 suшта (%14) *sasX* pozitif, 86 suшта (%86) negatif; etken grubundaki 5 suшта (%10) *sasX* pozitif, 45 suшта (%90) *sasX* negatifti. İki grup arasında *sasX* varlığı açısından anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0,487$). *sasX* geni en fazla 11 *S. epidermidis* suşunda olmak üzere; 3 *S. hominis*, 4 *S. hemolyticus* ve 1 *S. capitis* suşunda pozitif olarak bulunmuştur. Etken ve kontaminasyon grubunda *sasX* pozitifliğinin dağılımı tablo 13'de, *sasX* pozitif

bulunmuş 19 KNS suşunun türler arasındaki dağılımı şekil 9’da gösterilmiştir. Biyofilm oluşturan suşların 13’ünde (%15,7) *sasX* pozitif (4 zayıf düzeyde, 4 orta düzeyde ve 5 güçlü düzeyde) bulunurken, biyofilm oluşturmeyan suşların 6’sında (%9) *sasX* pozitif bulundu. Biyofilm oluşturan ve oluşturmeyan suşlarda *sasX* pozitifliği açısından anlamlı fark bulunmadı ($p=0,327$). *sasX* gen varlığına ait PCR görüntüleri şekil 10’da gösterilmiştir.

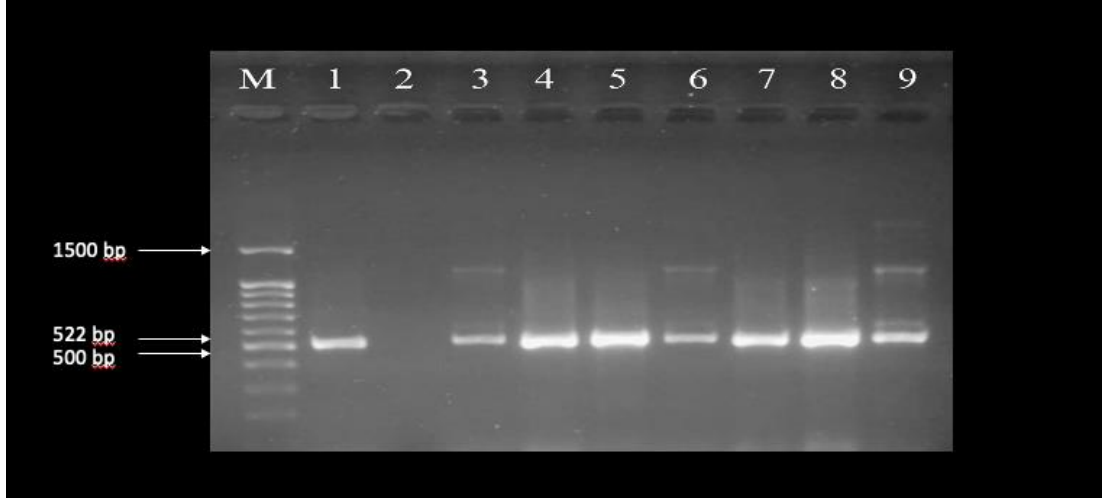
Tablo 13. Etken ve kontaminasyon grubunda *sasX* pozitifliğinin dağılımı

	Pozitif n (%)	Negatif n (%)	Toplam n (%)
Kontaminasyon Grubu	14 (14)	86 (86)	100 (100)
Etken Grubu	5 (10)	45 (90)	50 (100)
Toplam	19 (12,6)	131 (88,4)	150 (100)

*Satır yüzdesi hesaplanmıştır.



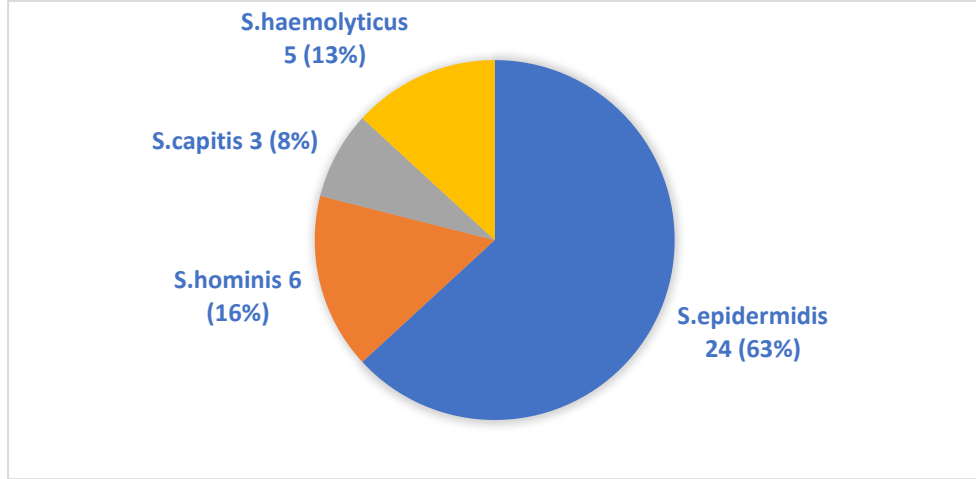
Şekil 9. *sasX* pozitif saptanmış KNS suşlarının türlere göre dağılımı



Şekil 10. *sasX* geninin jel elektroforez görüntülemesi

(M: 100-1500 bp DNA leader, 1.kuyucukta *sasX* pozitif *S. epidermidis* ATCC 35984, 2. kuyucukta *S. epidermidis* ATCC 12228 ve 3-9. kuyucuklarda *sasX* pozitif bulunmuş bazı suşların sonuçları görülmektedir. Pozitif suşlarda 522 bp’de bant izlenmektedir.)

ACME ilişkili *ArcA*, *KdpA* ve *Opp3B* operonlarının varlığı multipleks PCR ile araştırıldı. Kontaminasyon grubundaki suşların 32’inde (%32) etken grubundaki suşların 6’sında (%12) araştırılan genlerden herhangi biri tespit edilmiş ve ACME pozitif olarak değerlendirilmiştir. Gen bölgeleri ayrı olarak değerlendirildiğinde kontaminasyon grubundaki 30 suшта (%30) *ArcA* pozitif, 7 suшта (%7) *KdpA* pozitif, 8 suшта (%8) *Opp3B* pozitif, etken grubunda ise 6 suшта (%12) *ArcA* pozitif, 1 suшта (%2) *KdpA* pozitif, 3 suшта (%6) *Opp3B* pozitif bulunmuştur. Kontaminasyon grubunda ACME pozitifliği ve *ArcA* pozitiflik oranı etken grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulundu (sırasıyla $p=0,008$ ve $p=0,015$). *KdpA* ve *Opp3B* pozitifliği açısından gruplar arasında fark bulunmadı (sırasıyla $p=0,119$ ve $p=0,658$). *ArcA*, *Opp3B* ve *KdpA* genlerinin pozitiflik oranları tablo 14’de, türlere göre dağılımı şekil 11’de ve jel elektroforez görüntüleri şekil 12’de gösterilmiştir.

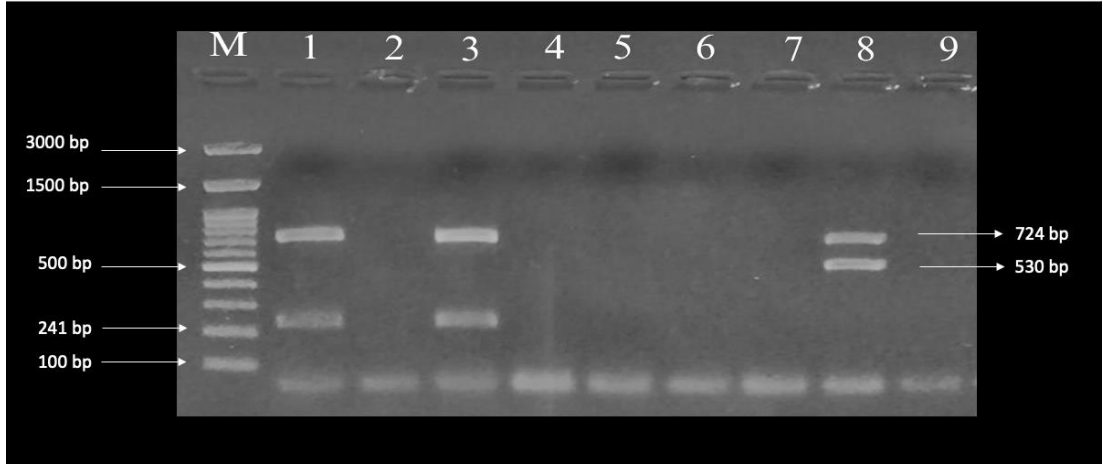


Şekil 11. ACME pozitif suşların türlere göre dağılımı

Tablo 14. ACME *ArcA*, *Opp3B* ve *KdpA* pozitifliğinin KNS türlerine ve gruplara göre dağılımı

		Kontaminasyon Grubu (n=100)				Etken Grubu (n=50)				Toplam (n=150)*
		<i>S.epidermidis</i> n=66 n(%)	<i>S.hominis</i> n=19 n(%)	<i>S.capitis</i> n=4 n(%)	<i>S.haemolyticus</i> n=10 n(%)	<i>S.epidermidis</i> n=29 n(%)	<i>S.hominis</i> n=6 n(%)	<i>S.capitis</i> n=2 n(%)	<i>S.haemolyticus</i> n=12 n(%)	n(%)
<i>ArcA</i>	Pozitif	20(30,3)	6(31,6)	2(50)	2(20)	4(13,8)	0	1(50)	1(8,3)	36(24)
	Negatif	46(69,7)	13(68,4)	2(50)	8(80)	25(86,2)	6(100)	1(50)	11(91,7)	112(76)
<i>KdpA</i>	Pozitif	6(9,1)	1(5,3)	0	0	1(3,4)	0	0	0	8(5,3)
	Negatif	60(90,9)	18(94,7)	4(100)	10(100)	28(96,6)	6(100)	2(100)	12(100)	140(94,7)
<i>Opp3</i>	Pozitif	5(7,6)	1(5,3)	0	2(20)	3(10,3)	0	0	0	11(7,3)
	Negatif	61(92,4)	18(94,7)	4(100)	8(80)	26(89,7)	6(100)	2(100)	12(100)	137(92,7)
<i>ACME</i>	Pozitif	20(30,3)	6(31,5)	2(50)	4(40)	4(13,8)	0	1(50)	1(8,3)	38(25,3)
	Negatif	46(60,7)	13(69,5)	2(50)	6(60)	25(86,2)	6(100)	1(50)	11(91,7)	110(73,3)

*Tablo'da etken grubunda tanımlanmış ve ACME negatif olan *S.intermedius* suşu ve kontaminasyon grubunda tanımlanan ACME negatif olan *S.warneri* suşu toplam sayıda belirtilmemiştir.



Şekil 12. ACME *ArcA*, *Opp3B* ve *KdpA* genlerinin multipleks PCR ile jel elektroforez görüntüsü

(M:100-3000 bp DNA leader. *ArcA* için 724, *opp3B* için 530 ve *kdpA* için 241bp’de pozitif bantlar görülmektedir. 1 ve 3. kuyucukta *ArcA* ve *KdpA* pozitif (tip IV), 8. kuyucukta *ArcA* ve *opp3B* pozitif (tip I) suşlar izlenmektedir).

Operonların varlığına göre ACME tiplmesi yapıldığında 23 suş tip 2, 4’er suş tip 4 ve tip 5, 5 suş tip 1 ve 2 suş tip 3 olarak sınıflandırıldı. Türlerle ve gruplara göre ACME tiplmesi tablo 15’de gösterilmiştir.

Tablo 15. ACME tiplerinin türlere ve gruplara göre dağılımı

ACME Tip	Kontaminasyon Grubu				Etken Grubu			
	<i>S. epidermis</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. epidermis</i>	<i>S. hominis</i>	<i>S. capitis</i>	<i>S. haemolyticus</i>
Tip 1 (n=5)	3	0	0	0	2	0	0	0
Tip 2 (n=23)	11	5	2	2	1	0	1	1
Tip 3 (n=2)	0	0	0	2	0	0	0	0
Tip 4 (n=4)	4	0	0	0	0	0	0	0
Tip 5 (n=4)	2	1	0	0	1	0	0	0

*Tablo’da etken grubunda tanımlanmış ve ACME negatif olan *S. intermedius* suşu ve kontaminasyon grubunda tanımlanan ACME negatif olan *S. warneri* suşu belirtilmemiştir.

MecA pozitif 125 suşun 30(%24)'unda ACME pozitifliği bulunurken, *MecA* negatif 25 suşun 8 (%32)'inde ACME pozitif bulunmuştur. *MecA* pozitif ve negatif suşlar arasında ACME pozitifliği açısından anlamlı fark bulunmadı ($p=0,557$). Toplam ACME pozitif 38 suşun 16 (%42,1)'sı biyofilm oluştururken (9'u zayıf, 2'si orta ve 5'i güçlü düzeyde), ACME negatif 112 suşun 67 (%59,8)'si biyofilm oluşturdu. ACME pozitif ve negatif suşlarda biyofilm oluşumu açısından anlamlı fark bulunmadı ($p=0,087$).

Biyofilm ilişkili genler *icaA*, *icaD*, *IS256*, *aap* ve *bhp* PCR yöntemiyle araştırıldı. KNS suşlarında grup ve türlere göre biyofilm ilişkili genlerin pozitiflik oranları tablo 16'da gösterilmiştir.

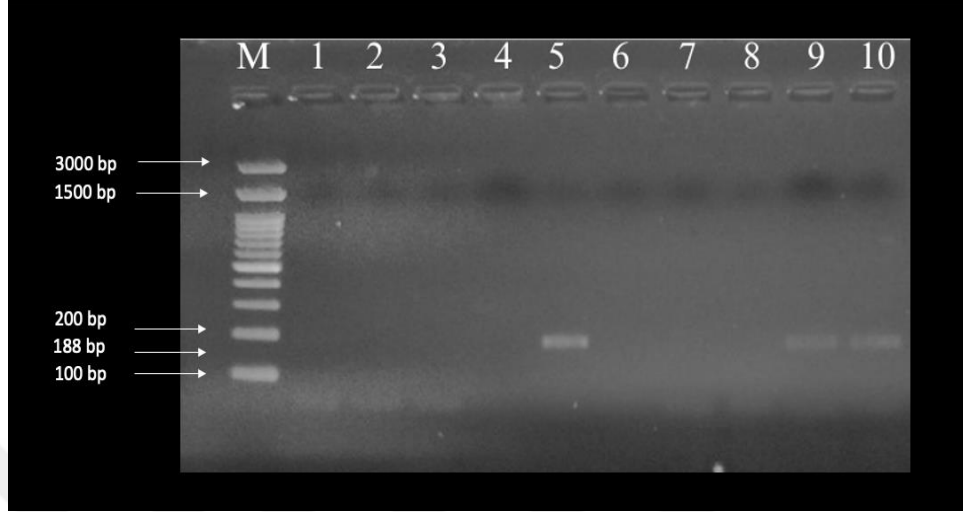
Tablo 16. Biyofilm ilişkili genler *İcaA*, *İcaD*, *IS256*, *Aap* ve *Bhp*'nin tür ve gruplara göre dağılımı

		Kontaminasyon Grubu (n=100)				Etken Grubu(n=50)			
		<i>S.epidermidis</i> (n=66)	<i>S.epidermidis</i> dışı KNS (n=34)			<i>S.epidermidis</i> (n=29)	<i>S.epidermidis</i> dışı KNS (n=21)		
		n(%)	<i>S.hominis</i> (n=19) n(%)	<i>S.haemolyticus</i> (n=10) n(%)	<i>S.capitis</i> (n=4) n(%)	n(%)	<i>S.hominis</i> (n=6) n(%)	<i>S.haemolyticus</i> (n=12) n(%)	<i>S.capitis</i> (n=2) n(%)
<i>IcaA</i>	Pozitif	26(%39,4)	5(%26,3)	2(%20)	0(%0)	21(%72,4)	4(%66,7)	6(%50)	0(%0)
	Negatif	40(%60,6)	14(%73,7)	8(%80)	4(%100)	8(%27,6)	2(33,3)	6(%50)	2(%100)
<i>IcaD</i>	Pozitif	32(%48,5)	8(%42,1)	4(%40)	1(%25)	22(%75,9)	3(%50)	4(%33,3)	1(%50)
	Negatif	34(%51,5)	11(%57,9)	6(%60)	3(%75)	7(%24,1)	3(%50)	8(%66,7)	1(%50)
<i>IS256</i>	Pozitif	24(%36,4)	10(%52)	7(%70)	1(%25)	17(%58,6)	4(%66,7)	9(%75)	1(%50)
	Negatif	42(%63,6)	9(%47,4)	3(%30)	3(%75)	12(%41,4)	2(33,3)	3(%25)	1(%50)
<i>Bhp</i>	Pozitif	6(%9,1)	0(%0)	0(%0)	0(%0)	3(%10,3)	1(%16,7)	0(%0)	0(%0)
	Negatif	60(%90,9)	19(%100)	10(%100)	4(%100)	26(%89,7)	5(%83,3)	12(%100)	2(%100)
<i>Aap</i>	Pozitif	46(%69,7)	18(%94,7)	6(%60)	3(%75)	25(%86,2)	4(%66,7)	7(%58,3)	0(%0)
	Negatif	20(%30,3)	1(%5,3)	4(%40)	1(%25)	4(%13,8)	2(33,3)	5(%41,7)	2(%100)

Tabloda *icaA*, *icaD*, *IS256* ve *aap* pozitif *S.intermedius* ve *IS256* ve *aap* pozitif *S.warneri* suşu belirtilmemiştir.

Kontaminasyon grubundaki suşların 33 (%33)'ünde etken grubundaki suşların 32 (%64)'sinde *icaA* pozitif bulundu. Etken grubundaki suşlarda kontaminasyon grubundaki suşlara göre daha yüksek oranda *icaA* gen pozitifliği saptandı ve iki grup arasında *icaA* pozitiflik oranı açısından fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,001$). Her iki grupta *icaA* pozitif toplam 65 suşun 52'sinde (%80) her hangi bir düzeyde biyofilm oluşumu gözlenirken, 13 (%20)'ünde gözlenmemiştir.

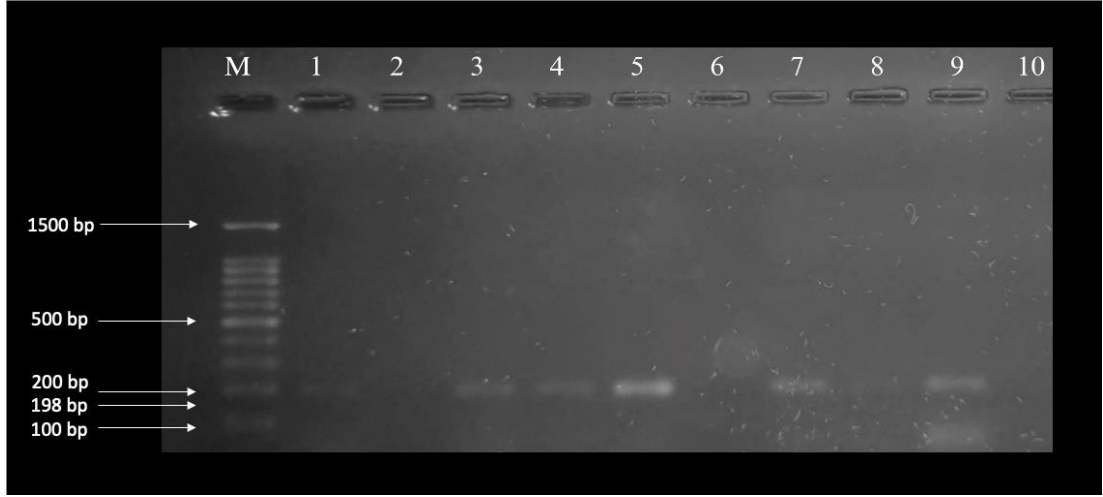
IcaA pozitif suşlarda biyofilm pozitiflik oranı, negatif suşlara göre istatistiksel olarak anlamlı olarak daha yüksekti ($p<0,001$). *IcaA* PCR görüntüleri şekil 13’de gösterilmiştir.



Şekil 13. *IcaA* geninin jel elektroforez görüntülemesi

M:100-1500 bp DNA leader 1.kuyucukta negatif kontrol *S. epidermidis* ATCC 12228, 10. Kuyucukta pozitif kontrol *S. epidermidis* ATCC 35984, 2-9. kuyucuklarda çalışmadaki bazı suşların sonuçları görülmektedir. Pozitif suşlarda 188 bp’de bant izlenmektedir.

Kontaminasyon grubundaki 45 (%45) suшта *icaD* pozitif, 55 (%55) suшта *icaD* negatif; etken grubunda 31 (%62) suшта *icaD* pozitif, 19 (%38) suшта *icaD* negatifti. Etken grubundaki suşlarda kontaminasyon grubundaki suşlara göre daha yüksek oranda *icaD* gen pozitifliği saptandı ve *icaD* pozitiflik oranı açısından iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,05$). *IcaD* pozitif 76 suşun 65 (%85,5)’inde biyofilm oluşumu gözlenirken, 11 (%14,5)’inde gözlenmemiştir. *IcaD* pozitif suşlarda biyofilm pozitiflik oranı negatif suşlara göre istatistiksel olarak anlamlı olarak daha yüksekti ($p<0,001$). *Ica D* PCR görüntüleri 14’de gösterilmiştir.



Şekil 14. *IcaD* geninin jel elektroforez görüntülemesi

M:100-1500 bp DNA leader 1-8. kuyucuklarda çalışmadaki bazı suşların, 9. kuyucukta pozitif kontrol *S. epidermidis* ATCC 35984'ün, 10. kuyucukta negatif kontrol *S. epidermidis* ATCC 12228'in sonuçları görülmektedir. Pozitif suşlarda 198 bp'de bant izlenmektedir.

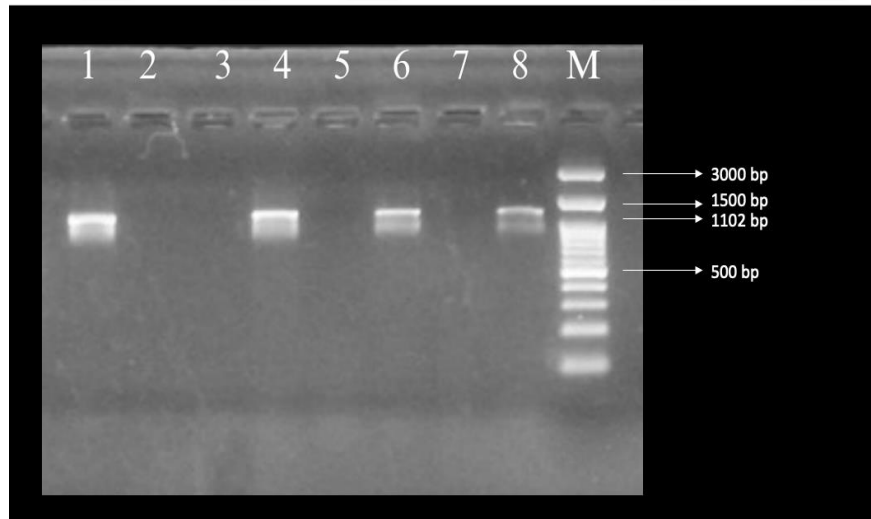
Kontaminasyon grubundaki 29 (%29) suşta *icaA* ve *icaD* birlikte pozitif iken, etken grubundaki 28 (%56) suşta *icaA* ve *icaD* birlikte pozitif bulunmuştur. Etken grubundaki suşlarda kontaminasyon grubundaki suşlara göre daha yüksek oranda *icaA* ve *icaD* birlikte pozitifliği saptanırken, her iki gen bölgesini birlikte bulundurma oranı açısından iki grup arasında fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,001$). *IcaA* ve *icaD*'nin birlikte pozitif olduğu 57 suşun 46 (%80,7)'sında biyofilm oluşumu gözlenmiştir. *IcaA* ve *icaD*'nin birlikte pozitif olduğu suşlarda herhangi bir düzeyde biyofilm pozitiflik oranı, *IcaA* veya *IcaD*'nin tek başına pozitif olduğu veya her ikisinin negatif olduğu suşlara göre anlamlı düzeyde daha fazlaydı ($p<0,001$). Her iki gen pozitif olmasına rağmen etken grubundaki 11 suşta fenotipik olarak biyofilm oluşumu görülmemiştir. *IcaA* ve *icaD*'nin her ikisinin de negatif olduğu 66 suşun 54 (%81,8)'ü biyofilm oluşturmazken, 12'si (%18,2) zayıf düzeyde biyofilm oluşturmuştur. Suşların gruplara göre *icaA*, *icaD* pozitiflik, *icaA* ve *icaD*'nin birlikte pozitiflik ve negatiflik oranları ile biyofilm oluşumu tablo 17'de gösterilmiştir.

Tablo 17. Biyofilm oluşumu ve *ica* gen bölgelerinin varlığının karşılaştırması

	Biyofilm oluşumu	<i>İca A</i> Pozitif n(%)	<i>İca D</i> Pozitif n(%)	<i>İca A+İca D</i> Pozitif n(%)	<i>İca A+İca D</i> Negatif n(%)
Kontaminasyon grubu	Negatif	0	0	0	43(84,3)
	Zayıf	6(18,2)	22 (48,9)	6(20,7)	8(15,3)
	Orta	13(39,4)	9 (20)	9(31)	0
	Güçlü	14(42,4)	14 (31,1)	14(48,3)	0
	Toplam	33	45	29	51
Etken grubu	Negatif	13(40,6)	11(35,5)	11(39,3)	11(73,3)
	Zayıf	2(6,3)	5(16,1)	2(7,1)	4(26,7)
	Orta	2(6,3)	1(3,2)	1(3,6)	0
	Güçlü	15(46,9)	14(45,2)	14(50)	0
	Toplam	32	31	28	15

*Grup içinde sütun yüzdesi hesaplanmıştır.

IS256 varlığı PCR ile araştırıldığında çalışmaya alınan toplam 75 suşta pozitiflik saptandı. Kontaminasyon grubundaki 43 (%43) suşta *IS256* pozitif, 57 (%57) suşta negatif; etken grubunda 32 (%64) suşta pozitif, 18 (%36) suşta negatif bulundu. Etken grubundaki suşlarda kontaminasyon grubundaki suşlara göre daha yüksek oranda *IS256* gen pozitifliği saptanırken, iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,015$). *IS256* PCR görüntüleri şekil 15’de gösterilmiştir.

**Şekil 15.** *IS256* geninin jel elektroforez görüntülemesi

M:100-3000 bp DNA leader. 1. kuyucukta *S. epidermidis* ATCC 35984, 2. kuyucukta *S. epidermidis* ATCC 12228, 3-8 kuyucuklarda çalışmadaki bazı KNS suşlarının sonuçları görülmektedir. Pozitif suşlarda 1102 bp’de pozitif bant izlenmektedir.

IS256 pozitif olan 75 suşun 46'sı(%61,3) biyofilm oluşturunken, IS256 negatif 75 suşun 37'sinde (%49,3) biyofilm oluşumu gözlenmiştir. IS256 gen bölgesi için pozitif ve negatif suşlarda biyofilm oluşumu oranı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (p=0,139).

Etken grubundaki 19 (%38) suшта, kontaminasyon grubundaki 17(%17) suшта *icaA*, *icaD* ve IS256 genleri birlikte pozitif bulunmuştur. Etken grubundaki suşlarda kontaminasyon grubundaki suşlara göre daha yüksek oranda *icaA*, *icaD* ve IS256 genlerinin birlikte pozitifliği saptandı ve iki grup arasında her üç genin birlikte pozitiflik oranı açısından fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p=0,005). *İcaA*, *icaD* ve IS256 genlerinin birlikte pozitif olduğu 36 suşun 29'unda (%80,6) biyofilm oluşumu gözlenirken; bu genlerin tek başına veya ikili pozitif olduğu veya negatif olduğu suşların 54'ünde (%47,4) biyofilm oluşumu gözlenmiştir. *İcaA*, *icaD* ve IS256 genlerinin birlikte pozitif olduğu suşlarda herhangi bir düzeyde biyofilm pozitiflik oranı bu genlerin tek başına veya ikili pozitif olduğu veya negatif olduğu suşlara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazlaydı (p<0,001). *İcaA* ve *icaD* pozitif, IS256 negatif 21 suşun 17'sinde (%81) herhangi bir düzeyde biyofilm oluşumu gözlenmiştir. *İcaA* ve *icaD* pozitif suşların IS256 bulundurma oranları tablo 18'de gösterilmiştir.

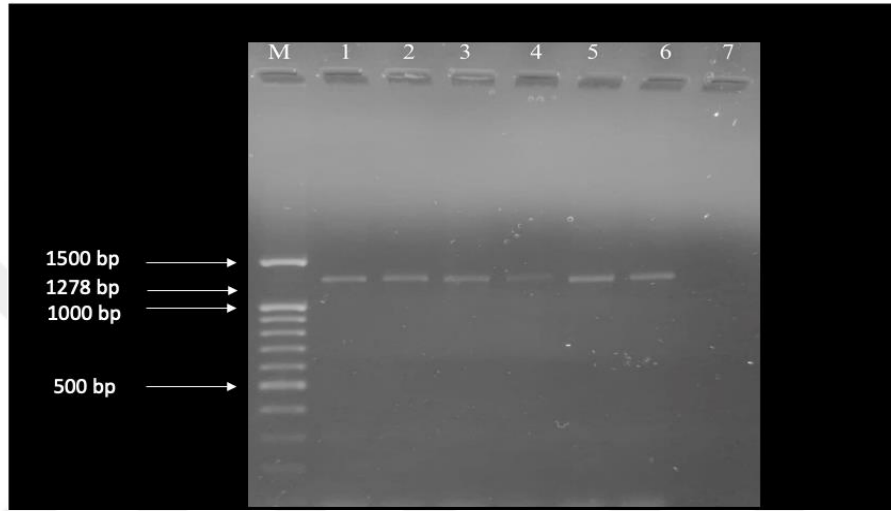
IS256 pozitif 75 suşun 49'u (%65,3) gentamisine dirençliyen, negatif 75 suşun 16'sı (%21,3) gentamisin dirençliydi. IS256 pozitif suşlarda gentamisin direnç oranı, IS256 negatif suşlara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulundu (p değeri<0,001).

Tablo 18. *icaA* ve *icaD* pozitif suşlarda IS256 pozitifliği

	Biyofilm Oluşumu	İca A+ İcaD Pozitif IS256 Negatif n(%)	İcaA+ İcaD Pozitif IS256 Pozitif n(%)
Kontaminasyon Grubu (n=100)	Negatif (n=0)	0	0
	Zayıf (n=6)	5 (41,7)	1 (5,9)
	Orta (n=9)	3 (25)	6 (35,3)
	Güçlü (n=14)	4 (33,3)	10 (58,8)
	Toplam (n=29)	12	17
Etken Grubu (n=50)	Negatif (n=11)	4 (44,4)	7 (36,8)
	Zayıf (n=2)	0	2 (10,5)
	Orta (n=1)	0	1 (5,3)
	Güçlü (n=13)	5 (55,6)	9 (47,4)
	Toplam (n=28)	9	19

*Grup içinde sütun yüzdesi hesaplanmıştır.

Biyofilm ilişkili bir diğer gen bölgesi olan *bhp* araştırıldığında toplam 10 KNS suşunda *bhp* pozitif bulundu. Kontaminasyon grubundaki 6 suşta (%6) *bhp* pozitif, 94 suşta (%94) negatif; etken grubundaki 4 suşta (%8) *bhp* pozitif, 46 suşta (%92) *bhp* negatif bulundu. İki grup arasında *bhp* gen pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,643$). Gruplar arasında *bhp* gen bölgesi pozitifliğinin dağılımı tablo 19’da, *bhp* PCR görüntüleri şekil 16’da gösterilmiştir.



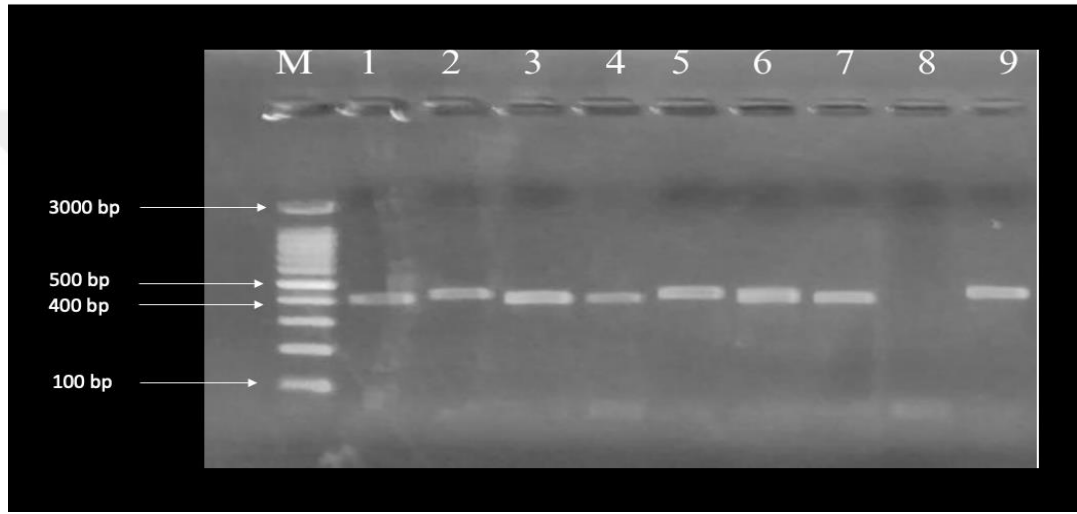
Şekil 16. Bhp geninin jel elektroforez görüntülemesi M:100-1500 bp DNA leader 1. kuyucukta *S. epidermidis* ATCC 355984, 7. kuyucukta *S. epidermidis* ATCC 12228, 2-6. kuyucuklarda çalışmadaki bazı suşların sonuçları görülmektedir. Pozitif suşlarda 1278 bp’de pozitif bant izlenmektedir.)

Biyofilm ilişkili gen bölgesi *aap* araştırıldığında toplam 111 KNS suşunda pozitif bulundu. Kontaminasyon grubundaki 74 (%74) suşta *aap* pozitif, 26 (%26) suşta negatif; etken grubundaki 37 (%74) suşta *aap* pozitif, 13 (%26) suşta *aap* negatifti. İki grup arasında *aap* gen pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=1,00$). Gruplara göre *aap* gen bölgesi pozitifliğinin dağılımı tablo 19’da, *aap* PCR görüntüleri şekil 17’ de gösterilmiştir.

Tablo 19. Etken ve kontaminasyon grubunda *aap* ve *bhp* gen bölgelerinin pozitifliğinin dağılımı

	<i>Bhp</i>		<i>Aap</i>	
	Pozitif n(%)	Negatif n(%)	Pozitif n(%)	Negatif n(%)
Kontaminasyon Grubu (n=100)	6(6)	94(94)	74(74)	26(26)
Etken Grubu (n=50)	4(8)	46(92)	37(74)	13(26)
Toplam (n=150)	10(6,6)	140(93,4)	111(74)	39(26)

*Satır yüzdeleri hesaplanmıştır.



Şekil 17. *aap* geninin jel elektroforez görüntülemesi

(M:100-3000 bp DNA leader, 9. kuyucukta *S.epidermidis* ATCC 355984, 1-8. kuyucuklarda çalışmadaki bazı suşların sonuçları görülmektedir. Pozitif suşlarda 400 bp’de pozitif bant izlenmektedir.)

Çalışmamızdaki *ica* negatif 12 (%8) suşta biyofilm oluşumu görülmüştür. *İca* gen bölgesinden bağımsız olarak biyofilm oluşumunun analizinde *icaA* ve *icaD* negatif suşlarda *aap* ve *bhp* gen bölgesi pozitifliği araştırıldı. *İcaA* ve *icaD* negatif 66 suşun 43’ünde (%65,2) *aap* pozitifliği bulunurken, 23’ünde (%34,8) *aap* negatif bulunmuştur. *İca* gen bölgeleri negatif olduğu halde *aap* pozitif olan 43 suştan 34’ü biyofilm oluşturmazken, 9 ‘u zayıf düzeyde biyofilm oluşturdur. *İca* gen bölgeleri ve *aap* negatif olan 23 suştan 20’si biyofilm oluşturmazken, 3’ü zayıf düzeyde biyofilm oluşturmıştır. *İcaA* ve *icaD* negatif suşlarda *aap* pozitifliği ve biyofilm oluşumu tablo 20’de gösterilmiştir. *Bhp* pozitif 10 suşun 2’sinde (%20) hem *icaA* hem de *icaD* negatif bulunmuştur. Bu 2 suşta biyofilm oluşumu gözlenmemiştir.

Tablo 20. İca genleri negatif olan suşlarda *aap* pozitifliği

İcaA ve İcaD negatif	İcaA ve İcaD negatif <i>aap</i> pozitif n(%)	İca A ve İcaD negatif Aap negatif n(%)
Kontaminasyon Grubu (n=51)	34 (66,7)	17 (33,3)
Etken Grubu (n=15)	9 (60)	6 (40)
Toplam (n=66)	43 (65)	23 (35)

*Satır yüzdeleri hesaplanmıştır.

TARTIŞMA

KNS'ler uzun yıllardır apatojen, cilt ve mukoza yüzeylerinin flora üyesi kabul edilirken son yıllarda önemli bir nazokomiyal patojen olarak kabul edilmeye başlanmıştır. Bu değişimde son yıllarda artan tıbbi gelişmeler ve immün mekanizmaların zayıflaması ciddi rol almaktadır. İmmün sistemin tam olarak olgunlaşmaması veya zayıflaması, doğal mukoza bariyerlerin zarar görmesi ve kolonizasyon için yüzey oluşturan implante edilebilir cihazların varlığı, konakta KNS'lere bağlı enfeksiyon gelişmesinde rol oynayan faktörlerdir. KNS'lerin virulans ve antibiyotik direnci yüksek suşlarının baskın hale gelmesi de bakterinin enfeksiyon oluşumuna zemin hazırlayan faktörlerdendir. Özellikle hastanelerde tedavi ve profilaksi amaçlı yoğun antibiyotik kullanımı dirençli KNS'lerin artmasına neden olmaktadır (1, 2). KNS'leri önemli hale getiren bir diğer özellik farklı stafilokok türlerinin insan epitel yüzeylerinde ortak alanları paylaşmaları nedeniyle genetik alışveriş için yakın temas halinde olmalarıdır. *S. aureus*'taki birçok antibiyotik direnci ve virülans faktörü; patojenite adaları, kromozomal kasetler, transpozonlar veya plazmitler gibi mobil genetik elementler (MGE'ler) üzerinde bulunur. Bu faktörlerin genel olarak KNS'lerden kaynak aldığı düşünülmektedir. Stafilokok kaset kromozom *mec* (*SCCmec*), *sasX* ve *ACME*'nin bu faktörler arasında olduğu belirtilmektedir (4).

Klinik örneklerde KNS izole edildiğinde bunun gerçek bir enfeksiyonu mu yoksa kolonizasyon/kontaminasyonu mu gösterdiğinin tespit edilmesi gerekmektedir. Bu kararın yanlış verilmesi birçok probleme yol açmaktadır. Hatalı olarak enfeksiyon etkeni kabul edilmesiyle gereksiz antibiyotik tedavisi yapılmakta buna bağlı çeşitli ilaç yan etkileri, allerjik reaksiyonlar ve konak florasının baskılanması sonucunda fırsatçı yeni enfeksiyonlar oluşabilmekte, antibiyotik direncinin gelişimine zemin hazırlanmaktadır. Bu enfeksiyonların kaynağı olarak implante edilmiş tıbbi cihazlar düşünüldüğü için bunların gereksiz çıkarımı da gündeme gelebilmektedir. Hatalı olarak kontaminasyon kararı verilmesi durumunda hastada doğru tanının gecikmesine, gereksiz ek laboratuvar testlerinin kullanımına, hastanede kalış süresinin uzamasına ve tıbbi harcamalarda artışa neden olunmaktadır.

Bu nedenle doğru kararın verilebilmesi adına izole edilen tür ve enfeksiyon bölgesi, immün durum, implante edilebilir tıbbi cihazların varlığı hastanın klinik belirtileriyle birlikte değerlendirilmeli ve etkenin tekrarlayan kültür izolasyonu ile tanı doğrulanmalıdır (1, 6).

KNS'ler KDE ve KİKDE de en sık izole edilen patojenlerdir. Stafilokoklara bağlı kan dolaşım enfeksiyonlarının oranının eş zamanlı olarak farklı coğrafi bölgelerdeki prevalansının değerlendirildiği çalışmalarda KNS'lerin etken olarak tanımlama sıklığı %23,9- %79,2 arasında değişmektedir. Özellikle ülkemizin de içinde bulunduğu Asya ve Avrupa çalışma grubunda pediatrik gruptaki kan dolaşım enfeksiyonlarında KNS'lerin baskın türler haline geldiği bildirilmiştir (88). Hematopoetik kök hücre nakli olan hastalarda yapılan bir çalışmada ise KNS'lere bağlı kan dolaşım enfeksiyonunun sıklığı %7,4 olarak bulunduğu bildirilmiştir (89).

Kan kültürlerinde KNS izole edilmesi durumunda etken kontaminasyon ayırımı yapmak genellikle zorlayıcı olabilmektedir. Bu tanımlama sorununun çözülmesi, laboratuvar kaynaklarının uygun kullanılması ve doğru sonuç verilebilmesi için preanalitik evreden başlayarak çeşitli düzenlemelerin yapılması önemlidir. Öncelikle kültür alımı için doğru endikasyonla ateşin yükseldiği periyodlarda yeterli set sayısında ve yaşa uygun volümde kan alınması önemlidir. Kateter enfeksiyonu tanısı dışında kan alımında periferik venler tercih edilmelidir. Kan kültürü alımından önce cilt antisepsisinde uygun ajanlar yeterli sürede kullanılarak kan alınacak bölge ve kültür şişelerinin üst kapakları çıkarılıp temizlenmesi uygun etiketlemelerin yapılması ve uygun sürede laboratuvara ulaşımının sağlanması gerekmektedir (71).

Laboratuvar onaylı kan dolaşım enfeksiyonu tanısı farklı günlerde veya farklı bölgelerden alınmış örneklerde (en az iki sette) KNS üremesi, bu üremenin farklı bir bölgedeki enfeksiyon ile ilişkilendirilememesi ve beraberinde hastada $>38^{\circ}\text{C}$ ateş, titreme, hipotansiyondan en az birinin eşlik etmesiyle konulabilir (90). Klinik olarak ilişkilendirilmiş KNS'lere bağlı bakteriyemilerin değişkenlere bağlı analizinin yapıldığı bir çalışmada pozitif sinyale kadar geçen sürenin <16 saat olması, tür olarak *S. epidermidis* tanımlanması, santral venöz kateter varlığı, nütropeni, iki ve daha fazla sette aynı KNS üremesinin olması ve hastaların klinik değerlendirilmesinde kullanılan Charlson komorbidite skorunun ≥ 3 ve Pitt bakteriyemi skorunun ≥ 1 olması %83'lük pozitif prediktif değer ile en iyi yaklaşım olarak bulunmuştur (91).

Çalışmamızda izole edilen 150 suşun %45,3'ü (68) yoğun bakım ünitelerinde, %25,3'ü (38) dahili servislerde, %16,7'i (25) hematoloji onkoloji servislerinde, %10'u cerrahi servislerde ve %2,7'si (4) pediatri servisinde yatan hastalardan alınan kan kültürlerinden izole edilmiştir. Suşların izole edildiği hastaların 53'ünde (%35,3) kateter bulunmaktaydı. Kateteri olan hastalardan izole edilmiş suşların 35'i etken grubuna aitti. Çalışmamızda etken grubundaki suşların izole edildiği hastalarda kontaminasyon grubundaki suşların izole edildiği hastalara göre daha yüksek oranda kateter bulunmaktaydı ($p<0,001$). Hastaların demografik verileri incelendiğinde suşların izole edildiği hastaların çoğunun yoğun bakım yatışı olan hastalar olduğu saptandı. Etken olarak tanımlanan suşların izole edildiği hastalar incelendiğinde ise, immun yetmezliği mevcut hematolojik ve solid organ malignitesi olan hematoloji onkoloji servisinde yatan hastalar, immatür bağışıklık sistemine sahip yenidoğan yoğun bakım ünitesinde izlemi yapılan bebekler, hemodiyaliz vb. nedenlerle kateter kullanımı olan hastalar olduğu saptandı.

Çalışmamızda izolatların %63,3'ü *S. epidermidis*, %16,7'si *S. hominis*, %14,7'si *S. hemolyticus*, %4'ü *S. capitis*, %0,7'si *S. intermedius* ve %0,7'si *S. warneri* olarak tanımlandı. Etken ve kontaminasyon olarak tanımlanan suşlarda en sık *S. epidermidis* tanımlanırken, *S. epidermidis* olarak tanımlanmış suş oranı açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,338$). Kontaminasyon grubunda ikinci en sık tanımlanan izolat *S. hominis* iken, etken grubunda ise *S. hemolyticus*'tu.

Genel populasyonda KNS bakteriyemisi insidansı %33'e kadar çıkmakla birlikte pediatrik hastalarda bu oran %42,9'a kadar ulaşmaktadır. Literatürde KDE etkenlerinin sınıflandırılmasında özellikle erişkin yaş grubunda KNS'ler genel olarak grup halinde sınıflandırılarak yüzde verilmekle birlikte izolatların tür tanımlaması yapıldığında en sık izole edilen suş *S. epidermidis*'dir (92). 2013-2019 yılları arasında çok merkezli yapılan bir çalışmada kan kültürlerinden izole edilen suşların %48,4'ü *S. epidermidis*, %33,6 *S. hominis*, %9,3'ü *S. capitis*, %4,1'i *S. hemolyticus* olarak tanımlanmıştır (93). En sık tanımlanan KNS suşu *S. epidermidis* olmakla birlikte, diğer KNS'lerin de analiz edildiği diğer bir çalışmada tüm izolatların %38'i *S. hominis*, %24 *S. capitis* ve %16'sı *S. caprae* olarak sınıflandırılmış ve tüm suşların %29 'u bakteriyemi ile ilişkilendirilmiştir.

Aynı çalışmada *S. lugdunensis* ve *S. haemolyticus* olarak tanımlanma etken izolatlarla, *S. caprae*, *S. capitis* ve *S. hominis* olarak tanımlanma ise kontaminant izolatlarla ilişkilendirilmiştir (94). Almanya’da yapılan benzeri bir çalışmada ise *S. haemolyticus*, *S. hominis* ve *S. capitis* çalışmadaki izolatların %90’ını oluşturmaktadır. Çalışmada *S.epidermidis* dışındaki türler %23 oranında enfeksiyonla ilişkilendirilirken, bu etkenlerin ise yaklaşık yarısından fazlası *S.haemolyticus* olarak tanımlanmıştır (95). Yenidoğanlarda KNS’lerin KDE’daki tür düzeyinde dağılımının araştırıldığı bazı çalışmalarda ise benzer şekilde *S.epidermidis* en baskın tür bulunurken ikinci en sık bulunan tür *S. hemolyticus* olarak bildirilmiştir (67, 88).

S. epidermidis tanımlanmasını etken kararı vermede bir parametre olarak kullanan çalışmalar olmasına rağmen çalışmamızda her iki grupta da en fazla saptanan tür *S. epidermidis*’di. Çalışmamız sonuçlarına göre izole edilen suşun *S. epidermidis* olarak tanımlanmasının etken kararı vermek için tek başına yeterli bir kriter olmadığı görülmektedir. Bunun aksine *S. hominis*, *S. caprae* ve çocuk hastalar dışında alınan örneklerden izole edilen suşun *S. capitis* tanımlanması diğer bilgiler ile birleştirilerek kontaminasyon kararı vermede yararlı olabilir. Bununla birlikte özellikle farklı setlerde üreme olması durumunda aynı türün ürediğini göstermek için tür düzeyinde tanımlama mutlaka yapılmalıdır. Tek sette üreme olması durumunda ise ilgili izolat yenileyen üremelerde tanımlama yapılmak için saklanmalıdır (71).

Çalışmamızda izolatların ortalama pozitif sinyal süresi kontaminasyon grubunda 35,81 saat, etken grubunda ise 21,78 saattir. İzole edilen suşların pozitif sinyal verme süreleri değerlendirildiğinde, izolatların büyük çoğunluğunun (%72) 12-36 saat aralığında pozitif sinyal verdiği bulunmuştur. Etken grubundaki suşların büyük kısmı (%52’si) 12-24 saatte pozitif sinyal verirken, kontaminasyon grubundaki suşların büyük kısmı ise (%36’sı) 24-36 saat aralığında pozitif sinyal verdi.

KNS’lere bağlı gelişen bakteriyemilerin tespitinde pozitif sinyal süresine kadar geçen süre ve 2 setteki pozitif şişe sayısının analiz edildiği bir çalışmada beş farklı model oluşturularak analizler yapılmış ve tek şişe pozitifliği ve tek sette pozitif iki şişe varlığı kontaminasyon; her iki sette pozitiflik olması durumunda etken olarak sınıflandırılmıştır. İki farklı setten iki ve üç şişe pozitifliği durumunda pozitif sinyal süresi 48 saat üzerinde iken %77,8 uyumla kontaminasyon ile 48 saat altında ise %64,3 uyumla bakteriyemi ile ilişkili olarak değerlendirilmiştir (96).

Asai ve ark. yaptığı çalışmada, ≥ 24 saat, ≥ 36 saat ve ≥ 48 saat ve üzeri kesme değeri alınarak hesaplanan pozitif sinyal sürelerinin pozitif prediktif değerleri sırasıyla %87, %87 ve %31 negatif prediktif değerleri %46, %47 ve %93 olarak bulunmuştur (94).

Hitzenbichler ve ark. yaptığı çalışmada ise enfeksiyon etkeni olan *S.epidermidis* dışı KNS'lerin ortalama pozitif sinyal süresi 14 saat, kontaminant olanların ise 20 saat bulunmuştur. 16 ve 36 saatlik eşik değerleri belirlendiğinde kontaminasyon olarak değerlendirilmesi için duyarlılık ve özgüllük değerleri sırasıyla %66/%67 ve %15/%95 oranında bulunmuştur. 16 saat sonra pozitif sinyal alınan izolatın etken olarak kabul edilmesi için pozitif prediktif değeri %25, negatif prediktif değeri %75, 36 saat sonra pozitif sinyal alınan izolat için ise pozitif prediktif değeri %25 ve negatif prediktif değeri %91 bulunmuştur (95).

S.epidermidis dışı KNS'lerin neden olduğu kan dolaşım enfeksiyonlarının analizinin yapıldığı her iki çalışmada pozitif sinyal süresi etken ve olası etken kabul edilen suşlarda kontaminasyon grubundan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha kısa olarak bildirilmiştir (94, 95).

Çalışmamızın sonuçları ve literatür verileri birlikte değerlendirildiğinde, KNS'lerin çoğunda 12-36 saat aralığında pozitif sinyal alınırken 36 saat ve üstündeki sürelerin kontaminasyon olarak tanımlamada bir belirteç olarak kullanılabileceği düşünülmüştür (94, 95).

Antibiyotik direnci küresel bir halk sağlığı sorunudur. Özellikle KDE gibi mortalitesi yüksek enfeksiyonlarda etkenlerin antibiyotik duyarlılık paternlerinin takip edilmesi profilaktik antibiyotik seçiminde oldukça önemlidir. Stafilokok enfeksiyonlarında tedavi seçenekleri için ilk olarak metisilin direncinin belirlenmesi gereklidir. Kan kültürlerinden izole edilen KNS'lerde türler arasında yüzdeleri değişmekle birlikte yüksek oranda metisilin direnci tespit edilmiştir. Bu yüksek direnç oranları KNS enfeksiyonlarındaki tedavi seçeneklerini sınırlandırmakta ve glikopepetid, oksazalinodon vb. sınıf antibiyotiklerin kullanım sıklığını arttırmaktadır (92).

Çalışmamızda izole edilen suşların 116'sı (%77,3) oksasilin MİK tespitiyle, 122'si (81,3) sefoksitin disk disk difüzyon yöntemiyle metisiline dirençli bulunmuştur. *mecA* geni ise 125 (%83,3) KNS suşunda pozitif bulundu. Çalışmamızdaki etken ve kontaminasyon gruplarının her ikisinde de yüksek düzeyde metisilin direnci tespit edilmiştir ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,073$). Çalışmamızdaki *S. epidermidis* suşlarında oksasilin ile %76,8, sefoksitin ile %83 oranında metisilin direnci tespit edilirken; *S. epidermidis* dışı KNS'lerde ise her iki yöntemle de %78 oranında metisilin direnci tespit edildi. *S. epidermidis* suşları ve *S. epidermidis* dışındaki KNS suşları karşılaştırıldığında metisilin direnci yönünden istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,850$). Önceki çalışmalarda benzer olarak *S. epidermidis* ve dışı olarak sınıflama yapıldığında; *S. epidermidis*'lerde %60-%78'e varan oranlarda metisilin direnci tespit edildiği bildirilirken, diğer KNS'lerde daha düşük oranda direnç tespit edildiği bildirilmiştir. *S. epidermidis* dışındaki KNS'lerden; *S. hemolyticus*'da %72-%90, *S. hominis*'de %38,6-%84,6 ve diğer türlerde %13,4 ile %38,6 arasında değişen oranda metisilin direnci tespit edilmiştir. *S. haemolyticus* olarak tanımlanan KNS'lerde diğer türlere oranla daha yüksek oranda ve yıllar içinde artan metisilin direnci göze çarpmakta olduğu vurgulanmıştır (92-95).

EUCAST metisilin direnci saptanmasında; tarama için oksasilin kullanılacak ise MİK değeri tespit edilmesini, sefoksitin kullanılacak ise *S. saprophyticus* ve *S. lugdunensis* dışında kalan KNS'lerde MİK yönteminin zayıf bir gösterge olması nedeniyle disk difüzyon yöntemi kullanılmasını önermektedir (72). Teknik belirsizlik alanında kalan suşlar için ise *mecA* ile genotipik olarak doğrulanması önerilmektedir. Çalışmamızda sefoksitin ve oksasilin ile tarama sonuçları uyumsuzluk gösteren 6 suş oksasiline duyarlı sefoksitine dirençliydi. Uyumsuzluk gösteren 6 *S. epidermidis* suşunda teknik belirsizlik alanında kalan yoktu. Oksasilin dirençli olmasına rağmen sefoksitin duyarlı olan *S. epidermidis*'lerin etken grubundaki 1 suş haricinde hepsinde *mecA* pozitif bulundu. Benzer şekilde tarama amaçlı her iki yöntemin kullanıldığı diğer çalışmalarda sefoksitin ile tarama yapıldığında daha yüksek oranlarda direnç tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada oksasilin tarama ile *S. epidermidis* için %61,9 olarak bulunan direnç oranı, sefoksitin ile tarama yapıldığında %73,4'e, *S. haemolyticus* için %72,1'den %79,8'e, *S. hominis* için %38,6'dan %54,3'e yükseldiği bildirilmiştir (93).

Bununla birlikte sefoksitin ile tarama için kullanılan disk difüzyon yöntemi teknik hatalardan kaynaklı yanlış sonuçlara açık bir yöntem olduğu için uyumsuz sonuçların yenilenen çalışmalarla tekrarı gerekmektedir.

Çalışmamızda kan kültürlerinden izole ettiğimiz suşlarda farklı antibiyotik gruplarında değişen oranlarda direnç saptandı. KNS suşlarında klindamisine %50, eritromisine %74, siprofloksasine %66,7, levofloksasine %65,3, moksifloksasine %66,4, amikasine %12, gentamisine %43,3, linezolid %4, rifampisine %35,3, teikoplanine %14,2 fosfomisine %25,3, fusidik asite %77,3, tetrasikline %25,3, trimetoprim sülfametaksazole %41,2 oranında direnç görüldü. Vankomisin dirençli suş saptanmamıştır. İzolatlar *S. epidermidis* ve dışındaki KNS'ler olarak sınıflandırıldığında, *S. epidermidis* türü fosfomisin ($p=0,006$) ve gentamisin ($p<0,001$) için diğer KNS'lere göre daha duyarlı bulunurken, diğer grup antibiyotikler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. Suşların gruplara göre antibiyotik duyarlılıkları incelendiğinde ise etken grubundaki suşlar kontaminasyon grubuna göre siprofloksasin ($p=0,037$), levofloksasin ($p=0,051$) ve moksifloksasini ($p=0,028$) içeren kinolon grubuna, eritromisine ($p=0,048$), rifampisine ($p=0,021$) ve tetrasikline ($p=0,008$) daha dirençli bulunmuştur.

Metisilin direnci varlığında tercih edilecek ilk antibiyotik grubu glikopeptidlerdir. Çalışmamızda izole edilen suşlar arasında vankomisin direnci tespit edilmedi. Buna rağmen toplam 21 suшта (11'i *S. epidermidis* ve 8'i *S. hemolyticus*) (%14) teikoplanin direnci tespit edildi. Hücre duvarı kalınlaşması, plazmit aracılı yatay gen transferi ve mic creep mekanizmalarıyla glikopeptid sınıfı antibiyotiklere direnç gelişebilmektedir (1). KNS'lerde vankomisine direnç gösteren izolatlar ilk olarak göçmen kuşların ağız florasından izole edildiği bildirilmiştir. Dirençli suşlardan birinin vanA geni taşıyan *S. saprophyticus* suşu olması bu türün insanlarda enfeksiyon yapabilmesi ve kuşların göç etmesi yoluyla çeşitli coğrafik bölgelere yayılımı nedeniyle endişe uyandırmıştır (97).

Yoğun kullanımına rağmen KNS'lerde glikopeptitler için MİK değerleri hala düşük seviyelerde olduğu bildirilmiştir. Ancak teikoplanin direnci vankomisine göre artmış oranda bulunduğu belirtilmektedir (1).

Teikoplanin direncinin ilk olarak 1980-1985 yılları arasında izole edilen *S. hemolyticus* suşlarında bulunduğu, klinik ilişkili dirençli ilk suşun ise ayaktan periton diyalizi alan peritonitli bir hastadan izole edilmiş *S. epidermidis* suşu olduğu bildirilmiştir. 2002-2010 yılları arasında yapılan antibiyotik sürveys programında %12,2'ye varan oranlarda teikoplanin direnci tespit edildiği bildirilmiştir (1). 2013-2019 yılları arasında Kuzey Hollanda'da yapılan bir diğer çalışmada yıllar içinde izole edilen 6 *S. epidermidis* ve 1 *S. hominis* suşunda vankomisin direnci bulunurken, izole edilen *S. epidermidis* ve *S. hemolyticus* suşlarında ise yıllar içinde artış gösteren (sırayla %55, %44) teikoplanin direnci tespit edilmiştir. Çalışmada *S. capitis*, *S. hominis* ve *S. warneri* suşlarında ise düşük seviyelerde direnç gözlenmiştir (93).

Çalışmamızda izole edilen suşlarda standart yöntem sıvı mikrodilüsyon ile doğrulanması gerekmekte birlikte teikoplanine %14 oranında direnç tespit edilirken, vankomisine direnç görülmemiştir. Bu nedenle metisilin dirençli suşlarda vankomisin kullanımı teikoplanine göre daha güvenli görünmektedir. Hastane florasında glikopeptid dirençli suşların ortaya çıkmasını ve yayılımını engellemek için, çoğunun metisiline direnç taşıması ve buna bağlı olarak glikopeptit kullanım oranını arttırması nedeniyle KNS'nin etken tanısının titizlikle yapılarak gereksiz glikopeptid antibiyotiklerin kullanımının önüne geçilmesi ve el hijyeni ve temas izolasyonu başta olmak üzere enfeksiyon kontrol önemlerine tam olarak uyulması antimikrobiyal direnç kontrolü açısından önemlidir.

Metisilin dirençli izolatlarda kullanılabilecek bir diğer antibiyotik oksazolidinon grubunda yer alan linezolid'dir. Bu grup antibiyotiklere direnç temel olarak cfr kazanımıyla 23S rRNA'da meydana gelen nokta mutasyonları ile oluşmaktadır. Yoğun kullanımına rağmen çoğu KNS türü linezolid için düşük MIK değerlerine sahiptir. 2004-2010 yıllarında yapılan bir sürveys programında yıllar içinde %0,2'den %1,8'e yükselen linezolid direnci tespit edilmiştir (98). 2011 yılında yapılan farklı bir sürveys programında ise 266 metisilin duyarlı, 702 metisilin dirençli suşun MIK90 değerlerinin genel olarak 1mg/L altında olmakla birlikte cfr geni taşıyan *S. hemolyticus* suşunda artmış MIK değerleri tespit edilmiştir (1, 31). Linezolid direncine yol açan bir diğer mekanizma olan linezolid bağımlılığı fenomeni, 2008-2010 yılları arasında kan dolaşım enfeksiyonlarından elde edilen linezolid dirençli *S. epidermidis* izolatıyla yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (33).

Çalışmamızda izole edilen 6 (%4) *S. epidermidis* suşu linezolid dirençli bulunmuştur. Çalışmamız sonuçları linezolid tedavisinin KNS'lere bağlı enfeksiyonlarda halen güvenle kullanılabileceğini göstermektedir.

Çeşitli antibiyotik gruplarındaki artan antibiyotik dirençleri göz önüne alındığında, çeşitli önlemler alınarak direnç gelişimi engellenmeye çalışılmalı ve yayılması önlenmelidir. Direnç gelişiminin engellenmesi için öncelikle kan dolaşım enfeksiyonlarına kaynak oluşumunun engellenmesi, gereksiz kateterizasyon işlemlerinden kaçınılması gereklidir. Antibiyotik kullanılmasından önce uygun kriterler kullanılarak ve mikrobiyolojik bulgular ile desteklenerek KNS enfeksiyonu tanısının konulması, kolonizasyon ve kontaminasyonların gereksiz olarak tedavi edilmesinin önüne geçilmesi açısından önemlidir. Bunlarla birlikte uygun spektrumda ve yeterli sürede kullanımı denetlenerek antibiyotik yönetimi de yapılmalıdır. Oluşan enfeksiyonlarda kaynağın bulunması, temas izolasyonu ve el hijyeni ile bulaş zincirinin kırılması da önemlidir (72). Bazı antibiyotik dirençlerinin ilk olarak hayvanlardan izole edilen suşlardan olması antibiyotik direnciyle mücadele ve yayılımının önlenmesinde multidisipliner yaklaşım tarzının benimsenmesi gerektiğini göstermektedir. Antibiyotiklerin insan ve hayvan sağlığında sıklıkla kullanılması ve doğadaki bazı mantarlar tarafından da üretilmesi nedeniyle bakteriler sürekli olarak antibiyotiklere maruz kalarak direnç oluşturabilmektedir. Bu nedenle farklı sektörleri içine alan eğitimler ve antibiyotik sürveys programları geliştirilmeli özellikle tarım ve çiftlik hayvancılığında kullanılan antibiyotik miktarları dikkatle takip edilerek besinler yoluyla geçiş engellenmelidir (99).

Kommensal ve patojenik KNS'leri ayırt etmek için antibiyotik direnç genlerinin kazanımı (*SCC mec*), biyofilm oluşturma kapasitesi (*ica* lokusunun varlığı), arjinin metabolizması (*ACME*) ve *IS256* gibi insersion sekanslarının kazanımı gibi farklılıkları da incelenebilir. Sağlık personeli ve uzun süreli yatışı olan hastalar hastane florasındaki izolatlar ile kolonize olabilmekte ve uygun teknikle kan kültürü alınması doğrulanamadığı için bu genlerin ayırım gücü çok iyi tanımlanamamakla birlikte yapılan çalışmalar bu virulans ilişkili gen bölgelerinin değerlendirilmesinin faydalı olabileceğini göstermektedir (2).

Nazokomiyal kaynaklı izolatlarda *ica* lokusu, *mecA*, *IS256* ve *sesD* (*bhp*) genleri daha yoğun bulunmakta ve antibiyotik direnci daha yüksektir. Kommensal izolatlarda ise bu genlerin yerine ACME ve *aap* genleri daha fazla saptanırken antibiyotiklere daha duyarlı oldukları belirtilmektedir (2).

Du ve ark. çeşitli klinik örneklerden izole edilen *S. epidermidis*'ler ile hastanede çalışan personel ve toplumdaki sağlıklı bireylerin burun kültürlerinden izole ettikleri suşların biyofilm oluşumu, *icaA*, *IS256*, ACME ve *SCCmec* tiplmesi açısından karşılaştırdıkları çalışmalarında iki grup arasında anlamlı farklar bulduklarını bildirmişlerdir. Sağlıklı kişilerin nazal örneklerinden elde edilen suşların biyofilm oluşumu, *IS256* ve *icaA* genlerini taşıma oranı klinik izolatlardan düşük iken; ACME pozitifliği ise anlamlı derecede yüksek oranda bulunmuştur (100).

Öcal ve ark. KDE ve KİKDE izolatları ile burun kültürlerinden izole ettikleri Stafilokok türlerinin biyofilm oluşumu, *icaA*, *IS256* ve *icaD* pozitifliği yönünden karşılaştırdıkları çalışmalarında KDE ve KİKDE 'den elde edilen izolatlarda biyofilm oluşumu ve araştırılan üç genin birlikte pozitifliğini burun izolatlarına göre anlamlı düzeyde daha yüksek bulmuşlardır (101).

Biyofilm oluşumu KNS'lere bağlı enfeksiyonların gelişiminde en önemli virulans faktörlerinden biridir. Biyofilm oluşumu bakteriyi sıcaklık değişimleri, oksidatif stres, düşük su miktarı, DNA hasarı, açlık gibi çevresel faktörlerden ve konak immun yanıtından koruyan bir mekanizmadır. Biyofilm yapısı içine antibiyotığın penetrasyonu daha zor olmakta, içerde kimyasal yapının değişimiyle antibiyotik etkinliği azalmakta, biyofilm içindeki hücrelerin metabolizma ve büyüme hızının yavaşlamasına bağlı bakterisidal antibiyotiklerin etkinliği azalmaktadır. Bu sebeplerden dolayı biyofilm içindeki bakteriler serbest formdaki benzerlerine göre daha yüksek düzeyde antibiyotik direnci gösterir (102, 103).

Stafilokokal biyofilmin en önemli yapı taşı *ica* operonu tarafından sentezlenen polisakkarit intraselüler adezin ve poli-N-asetilglukozamindir. *icaA*, *icaD* ile birlikte ekspresyonu durumunda aktivitesi güçlenen N asetilglukozaminil transferazı kodlar. Ancak ekzopolisakkaritlerin yanında protein yapısındaki Bap, Aap, SasG, SasC, Embp, FnbpA, FnbpB ve eDNA biyofilm yapısındaki diğer önemli bileşenlerdendir. KNS'lerde polisakkarid sentezinden bağımsız olarak da biyofilm oluşumu gerçekleşebilmektedir (103).

Yapılan çalışmalarda KİKDE ve diğer protez ilişkili enfeksiyonlardan izole edilen KNS'lerin daha yüksek oranda biyofilm oluştururken, kontaminasyon olarak sınıflandırılan suşların daha düşük düzeyde biyofilm oluşturdıkları gösterilmiştir. Preterm yenidoğanlar haftalık olarak mukokutanöz kültürler ile takip edildiğinde, biyofilm oluşturan KNS'ler ile kolonize olan bebeklerin invaziv enfeksiyon gelişme riski biyofilm oluşturmayanlara oranla daha yüksek bulunmuştur (104).

Biyofilm oluşumu kristal viyole gibi çeşitli boyalarla, metabolik (resazurin) yöntemlerle, moleküler yöntemler ile biyofilm oluşturan genlerin saptanmasıyla ve kütle spektrofotometrisi, konfokal mikroskop gibi fiziksel yöntemler ile gösterilebilir (105). Çalışmamızda kristal viyole ile boyanarak biyofilm oluşumu araştırıldığında izolatların 67'sinde (%44,7) biyofilm oluşumu gözlenmez iken, 83 (%55,3)'ünün herhangi bir düzeyde biyofilm oluşturduğu saptandı. Biyofilm oluşturan toplam 83 suşun %26'sında zayıf, %10'unda orta, %19,3'ünde güçlü biyofilm oluşumu gözlemlendi. Çalışmamızda gruplar arasında biyofilm oluşumu oranı açısından anlamlı fark bulunmazken, etken grubundaki suşlar yüksek oranda güçlü düzeyde biyofilm oluşturmıştır.

Çalışmamızda biyofilm ilişkili gen bölgeleri olan *icaA* ve *icaD* varlığı incelendiğinde etken grubunda %64 oranında *icaA*, %62 oranında *icaD*; kontaminasyon grubunda ise %33 oranında *icaA* ve %45 oranında *icaD* pozitif bulunmuştur. Her iki gen bölgesinin varlığı etken grubunda kontaminasyon grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek oranda bulundu (sırasıyla $p<0,001$ ve $p=0,050$). *icaA* ve *icaD* gen bölgelerinin birlikte pozitifliği etken grubunda %56 oranında pozitif bulunurken, kontaminasyon grubunda %29 oranında pozitif bulundu. Bu iki gen bölgesinin birlikte pozitifliği etken grubunda kontaminasyon grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulundu ($p<0,001$). *icaA* pozitif suşların %80'ninde, *icaD* pozitif suşların %85,5'inde, *icaA* ve *icaD*'nin birlikte pozitif olduğu suşların %80,7'inde biyofilm oluşumu gözlemlendi. *icaA* ve *icaD* pozitif bulunmasına rağmen 11 suшта biyofilm oluşumu fenotipik olarak gösterilememiştir. Biyofilm oluşumunun *invivo* ve *invitro* şartlardaki olası farklılıkları; kültür ortamının sıcaklık, pH, osmolarite gibi çevresel faktörlere ve konak bağışık yanıtı tarafından salınan maddelere bağlı olarak oluşmaktadır.

Bu nedenle biyofilm ilişkili genlerin tespit edilmesine rağmen biyofilm oluşumu fenotipik olarak bazen gösterilememektedir. Farklı yöntemlerin kombinasyon halinde kullanımı ile bu sorun çözülebilir (101, 106).

Çalışmamızda biyofilm ilişkili olarak araştırılan gen bölgelerinden *aap* geni, etken ve kontaminasyon grubunda %74 oranında pozitif bulunurken; *bhp* geni ise kontaminasyon grubunda %6 etken grubunda ise %8 oranında pozitif bulunmuştur. Her iki grup arasında bu gen bölgelerinin pozitif bulunma oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Kan kültürlerinden izole edilen 38 kontaminant, 19 etken *S. epidermidis* suşlarıyla yapılan bir çalışmada mikrotitrasyon yöntemiyle 37' sinde (%64,9) biyofilm oluşumu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada sırasıyla *icaA*, *icaD* ve *aap* genleri kontaminasyon grubunda %23,7, %31,6, %36,8 oranında; etken grubunda ise %42,1, %47,4, %36,8 oranında pozitif bulunmuştur. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmediği bildirilmiştir (107).

Yenidoğanlardan izole edilen *S. epidermidis* suşlarında yapılan bir çalışmada, hasta bebeklerin derisinden izole edilen ve invaziv kan kültürü etkeni olan suşlarda sağlıklı bebeklere göre anlamlı düzeyde daha yüksek kalitatif olarak biyofilm oluşumu gösterilmişken, *ica* pozitifliği açısından anlamlı fark bulunmamıştır (104). Öcal ve ark.'nın yaptığı çalışmada ise 67 KNS izolatının 27'(%40,3) sinde biyofilm oluşumu fenotipik olarak gösterilirken %15'inde sadece *icaA*, %8,9'unda sadece *icaD* pozitif bulunmuştur (101).

Pinheiro ve ark.'nın kan kültürlerinden izole ettikleri KNS suşlarında biyofilm oluşumunu fenotipik ve genotipik olarak araştırdıkları çalışmada *S. epidermidis*'lerin %35,3'inde, *S. hemolyticus*'ların %21,5'inde biyofilm oluşumu fenotipik olarak göstermişlerdir. Tüm suşların *icaA* ve *icaD* pozitiflikleri sırasıyla %62,1 ve %67,5'di. *icaA* ve *icaD*'nin birlikte pozitifliği *S.epidermidis*'lerde %50,6 *S. hemolyticus*'larda %42,9 olarak bulunmuştur. Fenotipik olarak biyofilm oluşturmaya rağmen 3 *S. epidermidis* ve 1 *S. hemolyticus*'da *icaA* ve *icaD* tespit edilmemiştir. Güçlü biyofilm oluşturan 11 izolata *icaAD*'nin eşlik etmesi bu genlerin biyofilm oluşumundaki etkisini ortaya koymaktadır (106).

Aap ve bhp polisakkarit sentezinden bağımsız olarak da Stafilokok biyofilm oluşumuna katkı sağlayan protein yapıdaki iki faktördür. Çalışmamızda *icaA* ve *icaD* negatif 66 suşun 43'ünde (%65,2) *aap* pozitifliği bulunurken, 23'ünde (%34,8) *aap* negatif bulunmuştur. *Ica* negatif olduğu halde *aap* pozitifliği olan suşlardan 34'ü biyofilm oluşturmazken, 9 'u zayıf düzeyde biyofilm oluşturmuştur. Biyofilm pozitif/ *ica* negatif suşlar *S. epidermidis*'ler içinde küçük bir kısmı oluşturur. Farklı çalışmalarda %2 olarak tespit edilen bu oran Ninin ve ark. tarafından kemik iliği transplantasyonu olan hastaların kan örneklerinden izole edilen *S.epidermidis*'lerde bu oranın %10'a kadar yükseldiği bildirilmiştir (84). Bizim çalışmamızda bu oran %8 olarak bulunmuş ve *ica* negatif bu suşlar zayıf düzeyde biyofilm oluşturmuştur.

Qin ve ark.'nın 101 *S. epidermidis* suşu ile yaptıkları çalışmada izolatların %23,8'inde biyofilm oluşumu fenotipik olarak gösterilirken; biyofilm oluşturduğu halde *ica* negatif olan 2 suşta *aap* ve *bhp* geni de tanımlanamadığı belirtilmiştir. Bu suşlar klinik olarak enfeksiyonla ilişkilendirilmiş, kateter ve kemik iliği kültürlerinden izole edilmiştir. Biyofilm oluşumu konak bağışık yanıtı ve antibiyotiklerin öldürücü etkisine karşı direnç sağladığı için, antibiyotik baskısı altında bazı suşların *ica*'dan bağımsız biyofilm oluşturma yeteneği kazanabileceği şeklinde yorumlanmıştır (84).

Rohde ve ark.'nın yaptığı çalışmada total kalça protezi enfeksiyonlarından elde ettikleri 37 *S. epidermidis* suşundan 27'si biyofilm oluştururken %63'ünde *ica* lokusu tespit edilmiştir. Biyofilm oluşturan ancak *ica* negatif olan 10 suştan 9'unda ve genel olarak ise suşların %91'inde *aap* pozitifliği bulunmuştur. Aynı çalışmada Aap proteinin B alanına karşı oluşturulmuş antiserum kullanıldığında ise biyofilm oluşumunun inhibe olduğu gösterilmiştir (108).

Los ve ark.'nın nazofarinks ve akciğer malinitesi olan hastaların solunum yolu enfeksiyonlarından izole ettikleri 146 *S. epidermidis* izolatında biyofilm oluşumunu fenotipik ve genotipik olarak araştırdıkları çalışmada 52'si (%35,6) biyofilm, 40'ı (%27,4) *icaA* pozitif bulunmuştur. *icaA* pozitif suşların %85'inde, *icaA* negatif suşların ise %71,7'sinde *aap* pozitif bulunmuştur. *icaA*, *icaD* ve *aap*'nin birlikte pozitifliği biyofilm oluşturan 52 suşun 31'inde bulunmuştur. *ica* operonun ve *aap* geninin eş zamanlı varlığı güçlü biyofilm oluşumunda önemli rol oynarken; *ica* negatif *aap* pozitif suşlar *aap* negatif olanlara oranla daha fazla biyofilm oluşturmuştur (109).

Bu veriler ve çalışmamızdaki *ica* negatif, *aap* geni pozitif 9 suş göz önüne alındığında; *aap* geninin *ica*'dan bağımsız olarak biyofilm oluşumuna etkisi olabileceğini düşündürmektedir (1, 109).

Bhp, mastit örneklerinden izole edilen *S. aureus*'larda kolonizasyon ve biyofilm oluşturma yeteneğini arttıran biyofilm ilişkili protein (bap) homologu yüzey ilişkili bir adezin proteini eşdeğeridir. İnsan kaynaklı *S. epidermidis* izolatlarında da bhp geni tespit edilmiştir (1). Çalışmamızda kontaminasyon grubunda 6 ve etken grubunda 4 suşta olmak üzere toplam 10 suşta pozitiflik görülmüştür. Bu suşlardan *ica* genlerini içermeyen 2'sinde biyofilm oluşumu gözlenmedi. Pinheiro ve ark.'nın kan kültürlerinden elde ettikleri suşlarda yaptıkları çalışmada 13 (%15,3) *S. epidermidis* suşunda *bhp* geni pozitif bulunmuştur. 13 pozitif izolattan 3'ünde biyofilm oluşumu tespit edildiği bildirilmiştir (106). Biyofilm oluşumunda *bhp* geninin etkisinin ortaya konması için daha fazla sayıdaki örnekler ile yeni araştırmaların yapılmasına ihtiyaç olduğu görülmektedir.

IS256 aminoglikozid direnç transpozonu Tn4001'de tanımlı gentamisin, tobramisin ve kanamisin gibi antibiyotiklere direnç gelişimini sağlayan aminoglikozid asetiltransferaz ve fosfotransferaz aktivitesini kodlayan mutasyon yapıcı mobil genetik elementler ailesinde sınıflandırılmış bir ekleme dizisidir. Epidemiyolojik çalışmalarla gentamisin dirençli stafilokoklarda yaygın olarak tespit edilmiştir. Ayrıca IS256'nın çeşitli bölgelere eklenmesi *icaADBC* ekspresyonunu etkileyen faktörlerden biridir. Klinik izolatlardan izole edilen KNS'lerde IS256'nın *ica* operonu ile yüksek oranda birlikteliği bulunmaktadır (110, 111).

Çalışmamızda etken grubunda %64, kontaminasyon grubunda ise %43 oranında IS256 pozitifliği saptanmıştır. Bu pozitiflik etken grubu lehine istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,015$). *icaA*, *icaD* ve IS256 genlerinin birlikte pozitifliği etken grubunda %38, kontaminasyon grubunda ise %17 oranında tespit edilirken ve iki grup arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p=0,005$). *İca* genleriyle birlikte IS256 pozitifliği olan 36 suşun %80,6'sında herhangi bir düzeyde biyofilm oluşurken, IS256 negatif 21 suşun %81'inde herhangi bir düzeyde biyofilm oluşmuştur. IS256 varlığının biyofilm oluşumu üzerine arttırıcı veya azaltıcı yönde etkisi olmadığı düşünülmüştür.

Kozitskaya ve ark. yaptığı çalışmada kan örneklerinin %87'sinde idrar örneklerinin %47'sinde *IS256* pozitifliği bulunurken, kommensal izolatların ise %4'ünde pozitif bulunmuştur. Ayrıca *ica* pozitif 50 kan kültürü izolatının 44'ünde (%88), 20 idrar kültürünün 17'sinde (%85) ve 20 kommensal izolatın ise sadece 3'ünde (%15) *IS256* pozitifliği bulunduğu bildirilmiştir. *IS256*'nın *ica* pozitifliği ile birlikteliğinin ve klinik izolatlarda bulunma oranı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Biyofilm oluşumu, *ica* ve *IS256* varlığıyla birlikte, çoklu antibiyotik direncinin varlığının klinik ve kommensal izolatların ayrımında kullanılabilecek bir gösterge olabileceği sonucuna varmışlardır (111). Öcal ve ark. ise çalışmalarında %31,3 oranında *IS256* pozitifliği bulmuşlardır (101).

Çalışmamızda *IS256* pozitif toplam 75 suşun 49'u gentamisin dirençli iken 26'sı duyarlıydı. *IS256* pozitif suşlarda daha yüksek oranda gentamisin direnci bulundu ve fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,001$). Ancak Montanora ve ark.'nın yaptığı çalışmada *IS256* pozitif izolatlarda gentamisin direnci görülmemiştir. Bu sonuç ekleme dizisinin stafilokok genomunda Tn4001'i çevrelemenin yanında bağımsız kopyalar halinde de bulunabilmesi ile açıklanmıştır (110).

ACME *Arc(arcR/A/D/B/C)*, *opp3(A/B/C/D/E)* ve *kdp(E/D/A/B/C)* operonlarından oluşan özellikle toplum kaynaklı USA300 klonunun deri kolonizasyonu ve immun yanıtlardan korunma gibi avantajlar sağladığı bilinen 30-55kp büyüklüğünde yeni tanımlanmış bir genetik adadır. ACME *ArcA* tarafından kodlanan arjinin deaminaz sistemi L arjinini karbomoil ornitin, amonyak ve ATP'ye dönüştürür. Üretilen amonyak sayesinde cilt pH'sı dengelenir, ATP üretiminin kolaylaşmasıyla bakterinin hayatta kalması ve büyümesi desteklenmiş olur. Ayrıca kutanöz immun yanıtta önemli bir aminoasit olan arjininin, iNOS aracılığı ile NO üretimi yerine arjinin deaminaz tarafından kullanımı doğal immun yanıtı azaltır. *Opp3* genlerinin sağladığı rol çok belirgin olmamakla birlikte birçok metabolitin taşınmasını sağlayan permeazı kodlar. *Kdp* operonu yüksek osmolarite koşullarında up regüle olarak metabolik süreçlerde gerekli pH homeostazını sağlamak için hücre içindeki K^+ konsantrasyonunu artırır (24).

ACME bu üç operonun tek başına veya birlikte varlığına göre 5 tipe ayrılmıştır. ACME tip I ilk defa toplum kaynaklı metisiline dirençli *S. aureus*'da, tip II ise *S. epidermidis* ATCC 12228'de bulunmuştur. O'Conner ve ark. tüm genom sekans analizleriyle *kdp* genini tanımlamalarıyla ACME tip IV ve tip V'de tanımlanmıştır. *S. epidermidis*'de tanımlı 5 tip ACME varlığı gösterilmiştir (24).

S. aureus'un metisilin direncinden sorumlu *mecA* ve ACME gibi gen bölgelerini mobil genetik elementler yoluyla KNS'lerden elde ettiği düşünülmektedir. ACME kromozomal *orfX* lokusunda aynı *attB* bağlanma bölgesinde yer alan homolog ters çevrilmiş ve doğrudan tekrar dizileri (DR'ler) içeren SCC benzeri bir elementtir. *S. epidermidis*'de tanımlanan ACME, USA300 klonunda tanımlanan ile yüksek homoloji göstermektedir. Ayrıca USA 300 suşu diğer *S. aureus*'ların yaygın kolonizasyon bölgesi burun yerine koltuk altı, kasık ve perine bölgelerinden sıklıkla izole edilmektedir. USA 300'ün ACME'yi bölgede kolonize olan ACME pozitif *S. epidermidis*, *S. hemolyticus* ve *S. capitis* izolatlarından rekombinazlar tarafından keserek yatay gen transferi yoluyla kazandığı düşünülmektedir (4, 24, 27, 112).

ACME ilk olarak *S. aureus*'da tanımlanmasına rağmen çeşitli coğrafik alanlarda ve farklı klinik örneklerden izole edilen KNS suşlarında yapılan çalışmalarda bu genetik adanın *S. epidermidis*'de daha yüksek oranda bulunduğu tespit edilmiştir. Daha önceden çeşitli klinik örnekler ve farklı türler ile yapılan çalışmalarda özellikle *S. epidermidis* izolatlarının farklı sekans tiplerinde MRSE'de %40 ile %65,4 ve MSSE'de %64,4 ile %83 arasında değiştiği bildirilmiştir (24).

Çalışmamızda kan kültürlerinden izole edilen 150 suşun 38 (%25,3)'sinde ACME varlığı tespit edildi. İzolatların 32 tanesi kontaminasyon grubunda 6'sı etken grubunda bulunmaktaydı. ACME pozitifliği kontaminasyon grubunda istatistiksel olarak anlamlı olarak daha yüksek oranda bulunmaktaydı. Türler arasındaki dağılım incelendiğinde en fazla 24 *S. epidermidis* suşunda ACME pozitif bulundu. Geriye kalan ACME pozitif izolatlar 6 (%15)'sı *S. hominis*, 5 (%13)'ü *S. haemolyticus* ve 3 (%7)'ü *S. capitis* olarak dağıldı. ACME pozitif izolatların 23'ü tip II, 4'ü tip IV, 4'ü tip V, 5'i tip I ve 2'si tip III olarak sınıflandırıldı. *mecA* gen bölgesi pozitif saptanan 125 suşun 30'unda ACME pozitifliği bulunurken, *mecA* pozitif ve negatif suşlar arasında ACME pozitifliği oranı açısından anlamlı fark bulunmadı.

Barbier ve ark. çeşitli coğrafi bölgelerde bulunan hastanelerdeki yatan hastalardan ve ayaktan başvuran hastaların burun sürüntülerinden izole edilen 78 metisilin dirençli *S. epidermidis* izolatında ACME varlığını araştırmışlar ve 51'inde (%64,4) *ArcA*, 16'sında (%20,5) ise *Opp3* pozitif bulunduğunu bildirmişlerdir. Coğrafi bölgeler arasında prevelans değişmekle birlikte ayaktan başvuran hastalardan izole edilen izolatlarda daha yüksek oranda ACME pozitifliği saptanmış ve MRSE'nin toplumda yayılmasına katkı sağlayabileceği vurgulanmıştır (113).

Miragaia ve ark. farklı coğrafi bölgelerden izole ettikleri 127 *S. epidermidis* izolatından 65'inde (%52) *ArcA* ve/veya *opp3* geni pozitif bulmuştur. 65 pozitif izolattan 43'ü ACME tip I, 18'i ise tip II olarak tiplendirilmiş. İzolatların 93'ü metisiline dirençliydi. İzole edilen kolonizasyon ve enfeksiyon izolatları arasında ACME pozitifliği açısından fark bulunmadığı bildirilmiştir (27).

O'Conner ve ark. yaptığı çalışmada, 32 *S. epidermidis* izolatının 10'unda *kdp* genini ilk defa tanımlamışlardır. 9 suş *ArcA* ve *kdp* pozitif olduğu için tip IV,1 suş *ArcA*, *kdp* ve *opp3*'ün hepsini barındırdığı için tip V olarak tiplendirilmiştir (24).

Pi ve ark. çeşitli klinik örneklerden izole edilen 88 metisiline dirençli *S. haemolyticus* izolatının 42'sinde (%47,7) *ArcA* pozitifliği bulmuşlardır. ACME pozitifliğini enfeksiyon türü ve kolonizasyon bölgesi ile ilişkilendiren kanıt gözlenmediği bildirilmiştir (114).

Kan kültürlerinden izole edilen 24 *S. epidermidis* izolatında yapılan bir diğer çalışmada suşların 23'ünde *ArcA* pozitif bulmuşlardır. İzolatların %67'si tip I, 3'ü tipII, 1'i tipIII ve 5'i tip V olarak sınıflandırıldığını bildirmişlerdir. Çalışmadaki ACME pozitifliği olan suşların %71'i metisiline dirençli bulunmuştur(115).

Çalışmamız kan kültüründen izole edilen farklı türlerdeki KNS suşlarında ACME pozitifliğinin araştırılması bakımından literatüre yeni bir katkı yapmaktadır. Önceki çalışmalarla kıyaslandığında daha düşük bir oranda ACME pozitifliği saptanmasına rağmen, *S. epidermidis* izolatları ayrı olarak incelendiğinde oranın arttığı görülmektedir. Daha önce yapılmış olan çalışmalar ile uyumlu olarak ACME pozitif izolatlarda yüksek oranda metisilin direnci bulunmaktaydı. Değişik çalışmalarda ACME *ArcA* prevelansını diğer gen bölgelerine göre daha yüksek sıklıkta bulunmuştur (27, 113). Çalışmamızda da *ArcA* pozitifliği 36 suşa olmak üzere en yüksek sıklıkta tespit edilen ACME gen bölgesidir.

Tiplendirme yapıldığında ise izolatlar arasında en sık görülen tip II'ydı. Kontaminasyon grubunda etken grubuna göre daha yüksek oranda ACME ve *ArcA* pozitifliği bulunmuştur.

Granslo ve ark. yenidoğanlardan izole ettikleri 128 *S. epidermidis* izolatını sepsis bulgularının varlığı ve CRP düzeyleri değerlendirilerek etken ve kontaminant olarak sınıflamışlardır. 128 izolattan 42'si (%32) ACME pozitif olarak bulunmuştur. Etken grubunda pozitiflik oranı %23, kontaminasyon grubunda ise %40 olarak bulunmuş ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirtilmiştir. ACME pozitif ve negatif izolatların neden olduğu enfeksiyonda oluşan inflamatuvar yanıtı değerlendirildiğinde ise fark bulunmamıştır. Bu çalışmanın sonucunda ACME pozitifliğinin yüksek oranda deri florasındaki suşlardan kaynaklandığı ve kan kültürlerinin değerlendirilmesinde ACME pozitifliğinin kontaminasyon kriteri olarak kullanılabileceği sonucuna varmışlardır (116).

Çalışmamızda ACME pozitif izolatların 22'si biyofilm oluşturmazken, 9'u zayıf derecede, 2'si orta derecede ve 5'i güçlü biyofilm oluşturmıştır. ACME pozitif ve negatif suşlar arasında biyofilm oluşumu yönünden anlamlı fark bulunmamıştır. ACME pozitif izolatlardan 36'sında *ArcA* pozitifliği bulundu. *ArcA*'nın deri yüzeyinde bakterinin kolonizasyonu ve gelişimi açısından bazı faydaları da göz önüne alındığında, ACME pozitifliğinin özellikle de *ArcA* pozitifliğinin biyofilm oluşturmeyen suşlarda kontaminasyon kararı vermede belirteç olarak kullanılabileceği düşünüldü.

Metisiline dirençli *S. aureus*'lar hastane ortamında en önemli mortalite ve morbitide sebeplerinden biridir. MRSA'lar 1990 yıllarında itibaren topluma yayılmaya başlamıştır. Özellikle askeri personel, mahkumlar ve cezaevi çalışanları, sporcular ve çocuklar gibi toplu alanlarda bulunan kişiler risk faktörü olan popülasyonlardır. Tüm dünyada metisilin dirençli *S. aureus*'ların yayılımı önemli bir halk sağlığı sorunudur. İnsanların %20-30'unda ön burun deliklerinde kolonize olabilmektedir. Özellikle hastane ortamında duyarlı hastalar endojen kolonizasyon veya sağlık personelinin kazanım yoluyla *S. aureus* ile enfekte olabilmektedir. KNS'lerin *S. aureus* için genetik rezervuar işlevi görmesi nedeniyle yüksek ACME prevelansı olan KNS varlığı, kolonizasyon ve enfeksiyon yeteneği artmış *S. aureus* klonlarının oluşumuna neden olabilmektedir (117, 118).

Bu yüzden başta sağlık personeli olmak üzere toplu alanlarda birlikte bulunan gruplarda burun kültürlerinde *S. aureus* yanında ACME pozitif KNS izolatlarının varlığı taranarak yayılım azaltılabilir.

S. aureus'larda kolonizasyon kapasitesini arttırdığı bilinen ve mobil genetik elementler ile aktarıldığı düşünülen *sasX* ilişkili gen bölgesi çalışmamızda *S. epidermis* izolatlarının 11'inde, *S. hominis* izolatlarının 3'ünde, *S. haemolyticus* izolatlarının 4'ünde, *S. capitis* izolatlarının 1'inde olmak üzere toplam 19 izolatta (%12,7) pozitif bulundu. Kontaminasyon grubunda %14, etken grubunda ise %10 oranında *sasX* pozitifliği bulunurken iki grup arasında *sasX* pozitifliği açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. *sasX* pozitif izolatların, 17'sinde *mecA* geni pozitif bulundu ve 13'ünde ise biyofilm oluşumu gözlemlendi (5'i güçlü, 4'ü orta ve zayıf).

Yapılan benzer bir çalışmada, Soumya ve ark.'ları 40 KNS suşu arasında 1 *S. epidermidis* suşunda *sasX* pozitifliği bulmuşlardır. Kandan saptanan bu suşun eş zamanlı olarak güçlü biyofilm oluşturduğu ve biyofilm ilişkili *icaAB*, *aap*, *embp* ve *atlE* gibi çoklu biyofilm ilişkili gen bölgelerini de taşıdığı bildirilmiştir (21).

Soumya ve ark. yaptığı bir diğer çalışmada ise 55 KNS izolatının (4 *S. epidermidis*, 3 *S. haemolyticus* ve 1 *S. saprophyticus* izolatında) 8'inde *sasX* pozitif bulunmuştur. Bu 8 izolat incelendiğinde eş zamanlı olarak *mecA* ve *IS256* pozitifliği de bulunmakta olduğu bildirilmiştir (119).

Tekeli ve ark. 180 KNS izolatında yaptığı çalışmada ise, 9 *S. haemolyticus*, 4 *S. epidermidis*, 3 *S. hominis* ve 1 *S. capitis* olmak üzere 17 suşta *sasX* geni pozitif bulunmuştur. Farklı klinik örneklerin kullanıldığı çalışmada kateter ve nazal örneklerde daha yüksek oranda *sasX* pozitifliği saptanırken hastane dışındaki sağlıklı gönüllülerin ellerinden alınan örneklerde pozitiflik bulunamamıştır. Çalışmamızda bulunan %12,7 *sasX* pozitifliği Tekeli ve ark. yaptığı çalışmanın sonucuna benzerlik göstermektedir (20). De Backer ve ark. ise endotrakeal tüplerden izole ettikleri 32 KNS suşunda *sasX* varlığını araştırdıkları çalışmada pozitiflik bulamamışlardır (120).

Yapılan çalışmalar *sasX* pozitifliğinin, adezyon kapasitesini arttırmada rolü olabileceğini düşündürmektedir (20, 21, 119). Çalışmamızda *sasX* pozitif bulunmasına rağmen 6 suşta fenotipik olarak biyofilm oluşumu gösterilememiştir. Bu izolatların biyofilm oluşumunun farklı yöntemlerle doğrulanması yararlı olacaktır.

Bununla birlikte etken grubundaki *sasX* pozitif 1 izolatta, kontaminasyon grubundaki *sasX* pozitif 3 izolatta *ica* genleri negatif olmasına rağmen zayıf düzeyde biyofilm oluşumu fenotipik olarak gösterilmiştir. Biyofilm oluşumunun kompleks yapısı düşünüldüğünde araştırılan genlerden bağımsız olarak mı yoksa *sasX* 'in biyofilm oluşumuna *ica*'dan bağımsız bir etki sonucu mu bu durumun oluştuğunun araştırılması için daha fazla sayıda izolat ile yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler değerlendirildiğinde tek başına *sasX* pozitifliğinin gruplar arasında ayırım yapmada katkısı olmamakla birlikte daha önce yapılmış literatürdeki diğer çalışmaların da işaret ettiği gibi KNS'lerde metisilin direncinin, biyofilm ile ilişkili çoklu genlerin ve *sasX* geninin varlığının enfeksiyon kararı vermede bir belirteç olabileceği düşünülmüştür (20, 21, 119). Bu konuda çeşitli coğrafi bölgelerden izole edilen ve enfeksiyon etkeni farklı klinik KNS suşlarında yapılacak yeni çalışmalara ihtiyaç vardır (120).

Kan kültür sonuçları değerlendirilirken hastanın enfeksiyona ait klinik ve laboratuvar bulguları, izole edilen KNS suşunun mikrobiyolojik olarak (üreme olan set sayısı, morfolojik özellikleri, pozitif sinyal süresi, tür düzeyinde tanımlanması ve antibiyotik duyarlılığı gibi) değerlendirilmesinin yanında virulans ilişkili gen bölgelerinin araştırılması yol gösterici bir yöntem olabilir. Çalışmamızın sonuçlarına göre; güçlü biyofilm oluşturma, kateter vb. yabancı cisim bulunduran hastalardan izole edilmiş olma, kan kültürlerinde 36 saatin altında pozitif sinyal vermiş olma gibi özellikler yanı sıra biyofilm ilişkili gen bölgelerinden *icaA*, *icaD*, *IS256* 'yı tek olarak ya da çoklu bulundurmuş olmanın da etken olarak sınıflandırmada değerlendirilmesinin yararlı olacağı düşünüldü. Enfeksiyona dair klinik bulguları olmayan hastalardan izole edilmiş, mikrobiyolojik bulguları taşımayan suşlarda ise ACME pozitifliği özellikle de *ArcA* pozitifliği saptanması kontaminasyon olarak sınıflandırmada değerlendirilebilir.

Çalışmamızda etken ve kontaminasyon grubundaki suşlar arasında bazı virulans ilişkili genler açısından anlamlı farklar bulunmuş olmasına rağmen çalışmamızın en büyük kısıtlılıklarından biri kan kültürü alımının preanalitik evresinin takip edilememiş olmasıdır.

Etken kontaminant ayrımında klavuz önerilerine uyularak en az iki farklı sette benzer antibiyotik duyarlılık profiline sahip, tür tanımlaması aynı KNS'nin üremiş olması ve enfeksiyonun klinik bulgularının varlığında izole edilen suş etken kabul edilmiştir. Güvenilir sonuçlar için kan kültürü; doğru endikasyonla, uygun set sayısında, yeterli volümde, antisepsi kurallarına ve etiketlemeye dikkat edilerek alınmalıdır. Preanalitik süreçte kan kültürlerinde kontaminasyonu arttıran nedenler arasında cilt antisepsisinde uygun ajanların yeterli süre kullanılmamasına bağlı olarak yetersiz antisepsi, temizlenen bölgeye dokunulması, şişelerin kültüre doğru şekilde hazırlanmaması ve kateter enfeksiyonu tanısı haricinde kültürün kateterden alınması sayılabilir. Hastanemizde yapılan kan kültür alımı eğitimlerinde, kontaminasyonu arttıran en sık rastladığımız hata yetersiz antisepsi uygulanması; yanlış raporlamayı arttıran hatanın ise tek periferik venden alınmış örneğin farklı set gibi kültür şişelerine ekilmesi olduğu görülmüştür. Sorunun çözümü için kan kültür alımı eğitimlerinin düzenli olarak tekrar edilmesi, raporlama aşamasında sıkı bir klinik laboratuvar işbirliği ve hastane şartları uygun ise kültür alımı için deneyimli bir ekip kurulması uygun olacaktır.

Bir diğer kısıtlılık ise sağlık personelinin ellerinin ve özellikle uzun süreli yatışı olan hastalarda cilt yüzeyinin hastane florasıyla kolonize olabilmesidir. Bu nedenle kontaminasyon olarak sınıflandırılan bir suşun hastane florasıyla kolonize olan ciltten elde edilebilmesi nedeniyle antibiyotik direnç genlerinin kazanımı, biyofilm ilişkili genlerin varlığı ve ACME kazanımı gibi faktörlerin ayırım gücü azalmaktadır.

Sonuç olarak uygun teknikle kültür alımı, sağlık personeli için el hijyeni başta olmak üzere enfeksiyon kontrol önlemlerine uyum ile, araştırılan faktörlerin etken kontaminant sınıflamasındaki ayırım gücü arttırılabilir. Metisilin direnç kazanımının, biyofilm ilişkili genlerin ve ACME varlığı gibi faktörlerin prevelansının hastanede uzun süreli yatışı olan ve enfeksiyon belirtileri olmayan hastalar ile ayaktan başvuran hastaların cilt kültürlerinin karşılaştırıldığı, sağlık personelinin el ve burun kültürlerinin araştırıldığı yüksek izolat sayısındaki yeni çalışmaların yapılması bu faktörlerin ayırım gücünü belirlemek adına faydalı olacaktır.

SONUÇLAR

- 1) Pamukkale üniversitesi hastanelerinde değişik kliniklerde tedavi gören hastaların kan kültürlerinden izole edilen ve çalışmaya alınan KNS suşlarının 50 tanesi etken, 100 tanesi kontaminasyon grubunda sınıflandırıldı.
- 2) Çalışmaya alınan suşlar en fazla (%45,3) yoğun bakım ünitelerinde tedavi alan hastaların kan kültürlerinden izole edildi.
- 3) Kontaminasyon grubundaki suşlarda ortalama pozitif sinyal süresi 35,81 saat; etken grubunda ise 21,78 saatti. Etken grubundaki suşlar, kontaminasyon grubundaki suşlara göre daha erken pozitif sinyal verirken; 12-24 saat aralığında sinyal alınması etken, 24-36 saat aralığında pozitif sinyal alınması ise kontaminasyon lehine anlamlıydı ($p<0,001$).
- 4) Her iki grupta da en yüksek sayıda tanımlanan KNS türü *S. epidermidis*'di. Etken grubundaki suşların %58'i, kontaminasyon grubundaki suşların %66'sı *S. epidermidis* olarak tanımlandı. Etken grubunda ikinci en sık tanımlanan suş *S. haemolyticus* (%24) iken, kontaminasyon grubunda ise *S. hominis* (%19)'di.
- 5) Tüm suşlarda sefoksitin disk difüzyonu yöntemiyle %81,3; oksasilin MİK yöntemiyle %77,3 oranında metisilin direnci tespit edildi. Gruplar arasında metisilin direnci açısından anlamlı fark bulunmadı ($p=0,138/0,073$). Metisilin direnci genotipik olarak araştırıldığında tüm suşların 125'inde *MecA* geni pozitif bulunurken gruplara arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0,877$).
- 6) Etken grubundaki suşların %52'si herhangi bir düzeyde biyofilm oluşturduken, kontaminasyon grubundaki suşların %57'si herhangi bir düzeyde biyofilm oluşturdu. Gruplar arasında biyofilm oluşumu açısından anlamlı fark bulunmazken ($p=0,561$), etken grubundaki suşlarda daha yüksek oranda güçlü biyofilm oluşumu görüldü.

- 7) Etken grubundaki hastaların izole edildiği suşlarda %70 oranında kateter bulunurken bu oran kontaminasyon grubundaki hastaların izole edildiği suşlara oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0,001$). Güçlü biyofilm oluşturan suşların izole edildiği hastalarda, biyofilm oluşturmeyen suşların izole edildiği hastalara göre daha yüksek oranda kateter bulunmaktaydı ($p=0,012$).
- 8) Tüm suşların %12,6'sında *sasX* ilişkili gen bölgesi pozitif bulundu. Gruplar arasında *sasX* pozitifliği açısından anlamlı fark bulunmadı ($p=0,327$).
- 9) ACME ilişkili *ArcA*, *kdpA* ve *Opp3* varlığı araştırıldığında; kontaminasyon grubunda sırasıyla %32, %30, %7 ve %8 oranında, etken grubunda %12, %12, %2 ve %6 oranında pozitiflik bulundu. Kontaminasyon grubunda etken grubuna göre daha yüksek oranda ACME ve *ArcA* pozitifliği bulunurken bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (sırasıyla $p=0,008$ ve $p=0,015$). ACME tiplendirmesi yapıldığında 23 suş tip 2, 4'er suş tip 4 ve tip 5, 5 suş tip 1 ve 2 suş tip 3 olarak tanımlandı.
- 10) Biyofilm ilişkili gen bölgelerinden *icaA*, *icaD*, *IS256*, *aap* ve *bhp* genleri araştırıldığında; kontaminasyon grubunda sırasıyla %33, %45, %43, %74 ve %6 oranında; etken grubunda sırasıyla %64, %62, %64, %74 ve %8 oranında pozitif bulundu. Etken grubunda *icaA*, *icaD* ve *IS256* genleri kontaminasyon grubuna göre anlamlı düzeyde yüksek bulunurken (sırasıyla $p<0,001$, $p=0,050$, $p=0,015$), *aap* ve *bhp* genlerinin pozitifliği açısından iki grup arasında anlamlı fark bulunmadı (sırasıyla $p=1$, $p=0,643$).
- 11) *icaA* ve *icaD* gen bölgelerinin birlikte pozitifliği etken grubunda %56, kontaminasyon grubunda %29 oranında pozitif bulunurken iki grup arasındaki fark etken grubunda anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p=0,001$). *icaA*, *icaD* ve *IS256*'nın birlikte pozitifliği etken grubunda %38, kontaminasyon grubunda %17 oranında pozitif bulunurken her üç geni birlikte bulundurma

oranı etken grubunda anlamlı düzeyde daha yüksekti ve fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,005$).

12) *icaA*, *icaD* genlerinin tek başına ya da birlikte pozitifliği ile biyofilm oluşumu arasında anlamlı ilişki bulunurken ($p<0,001$), tüm suşların %8' inde *ica* genleri negatif olmasına rağmen zayıf düzeyde biyofilm oluşumu gözlenmiştir.

13) Güçlü biyofilm oluşturma, biyofilm ilişkili *icaA*, *icaD*, *IS256* genlerini tek ya da çoklu bulundurma oranı etken olarak sınıflandırılan suşlarda daha yüksek oranda saptanmıştır. ACME ilişkili *ArcA* pozitifliği ise kontaminasyon grubundaki suşlarda daha yüksek oranda bulunmuştur. Kan kültür sonuçları değerlendirilirken mikrobiyolojik ve hastanın klinik bulgularına ek olarak izole edilen suşun antibiyotik direnci, biyofilm ilişkili gen bölgeleri ve ACME varlığı gibi virulans özelliklerinin de incelenmesi etken kontaminasyon ayırımında yol gösterici olacaktır.

KAYNAKLAR

- 1) Becker K, Heilmann C, Peters G. Coagulase-negative staphylococci. Clin Microbiol Rev 2014;27(4):870-926.
- 2) Heilmann C, Ziebuhr W, Becker K. Are coagulase-negative staphylococci virulent? Clin Microbiol Infect 2019;25(9):1071-80.
- 3) Bier K, Schitteck B. Beneficial effects of coagulase-negative staphylococci on *Staphylococcus aureus* skin colonization. Exp Dermatol 2021;30(10):1442-52.
- 4) Otto M. How colonization factors are linked to outbreaks of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the roles of SasX and ACME. Biomol Concepts 2013;4(5):533-7.
- 5) França A, Gaio V, Lopes N, Melo LDR. Virulence factors in coagulase-negative staphylococci. Pathogens 2021;10(2):170.
- 6) Doern GV, Carroll KC, Diekema DJ, Garey KW, Rupp ME, Weinstein MP, et al. Practical guidance for clinical microbiology laboratories: a comprehensive update on the problem of blood culture contamination and a discussion of methods for addressing the problem. Clin Microbiol Rev 2019;33(1):e00009-19.
- 7) Rupp ME, F.P. *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative staphylococci Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Elsevier Inc. 2014: 2272-82
- 8) Wos PD, Garrity GM, Jones D, Krieg NR, Ludwig W, Rainey F, Schleifer K, Whitman WB. Bergey's, Manual of Systematic Bacteriology Volume 3: The Firmicutes. London New York Springer Science & Business Media, 2009: 392-420

- 9) Kloos WE, Schleifer KH. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. J Clin Microbiol 1975;1(1):82-8.
- 10) Bilgehan H. Gram olumlu koklar, Bilgehan H. ed. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 5.baskı İzmir: Barış Yayınları 2009: 495-532
- 11) Lamers RP, Muthukrishnan G, Castoe TA, Tafur S, Cole AM, Parkinson CL. Phylogenetic relationships among *Staphylococcus* species and refinement of cluster groups based on multilocus data. BMC Evol Biol 2012;12:171.
- 12) T. F. Moriarty, S. A. J. Zaat, H. J. Busscher. Biomaterials Associated Infection: *Staphylococcus epidermidis* in biomaterial-associated infections. İn: Moriarty T, Zaat S, Busscher H. (eds). New York, Springer 2013: 25-56
- 13) Otto M. Virulence factors of the coagulase-negative staphylococci. Front Biosci 2004;9:841-63.
- 14) Otto M. *Staphylococcus epidermidis* the 'accidental' pathogen. Nat Rev Microbiol 2009;7(8):555-67.
- 15) Namvar AE, Bastarahang S, Abbasi N, Ghehi GS, Farhadbakhtiarian S, Arezi P, et al. Clinical characteristics of *Staphylococcus epidermidis*: a systematic review. GMS Hyg Infect Control. 2014;9(3):Doc23.
- 16) Otto M. Staphylococcal biofilms. Microbiol Spectr 2018;6(4):10.1128
- 17) Heilmann C, Hussain M, Peters G, Götz F. Evidence for autolysin-mediated primary attachment of *Staphylococcus epidermidis* to a polystyrene surface. Mol Microbiol 1997;24(5):1013-24.

- 18) Rohde H, Burdelski C, Bartscht K, Hussain M, Buck F, Horstkotte MA, et al. Induction of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation via proteolytic processing of the accumulation-associated protein by staphylococcal and host proteases. *Mol Microbiol* 2005;55(6):1883-95.
- 19) Bateman A, Holden MT, Yeats C. The G5 domain: a potential N-acetylglucosamine recognition domain involved in biofilm formation. *Bioinformatics* 2005;21(8):1301-3.
- 20) Tekeli A, Öcal DN, Dolapçı İ. Detection of *sasX* gene and distribution of *sccmec* types in invasive and non-invasive coagulase-negative staphylococci. *Balkan Med J* 2020;37(4):215-21.
- 21) Soumya KR, Mathew S, Sugathan S, Mathew J, Radhakrishnan EK. Studies on prevalence of biofilm associated genes and primary observation on *sasX* gene in clinical isolates of coagulase negative staphylococci (CoNS). *APMIS* 2016;124(4):319-26.
- 22) Li M, Du X, Villaruz AE, Diep BA, Wang D, Song Y, et al. MRSA epidemic linked to a quickly spreading colonization and virulence determinant. *Nat Med* 2012;18(5):816-9.
- 23) Diep BA, Gill SR, Chang RF, Phan TH, Chen JH, Davidson MG, et al. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2006;367(9512):731-9.
- 24) O'Connor AM, McManus BA, Kinnevey PM, Brennan GI, Fleming TE, Cashin PJ, et al. significant enrichment and diversity of the staphylococcal arginine catabolic mobile element *acme* in *Staphylococcus epidermidis* isolates from subgingival peri-implantitis sites and periodontal pockets. *Front Microbiol* 2018;9:1558.

- 25) Thurlow LR, Joshi GS, Clark JR, Spontak JS, Neely CJ, Maile R, et al. Functional modularity of the arginine catabolic mobile element contributes to the success of USA300 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Cell Host Microbe* 2013;13(1):100-7.
- 26) Joshi GS, Spontak JS, Klapper DG, Richardson AR. Arginine catabolic mobile element encoded speG abrogates the unique hypersensitivity of *Staphylococcus aureus* to exogenous polyamines. *Mol Microbiol* 2011;82(1):9-20.
- 27) Miragaia M, de Lencastre H, Perdreau-Remington F, Chambers HF, Higashi J, Sullam PM, et al. Genetic diversity of arginine catabolic mobile element in *Staphylococcus epidermidis*. *PLoS One* 2009;4(11):e7722.
- 28) Diep BA, Stone GG, Basuino L, Graber CJ, Miller A, des Etages SA, et al. The arginine catabolic mobile element and staphylococcal chromosomal cassette mec linkage: convergence of virulence and resistance in the USA300 clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 2008;197(11):1523-30.
- 29) Schoenfelder SM, Dong Y, Feßler AT, Schwarz S, Schoen C, Köck R, et al. Antibiotic resistance profiles of coagulase-negative staphylococci in livestock environments. *Vet Microbiol* 2017;200:79-87.
- 30) Schito GC. The importance of the development of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2006;12 Suppl 1:3-8.
- 31) Flamm RK, Mendes RE, Ross JE, Sader HS, Jones RN. An international activity and spectrum analysis of linezolid: ZAAPS Program results for 2011. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;76(2):206-13.
- 32) Kloss P, Xiong L, Shinabarger DL, Mankin AS. Resistance mutations in 23 S rRNA identify the site of action of the protein synthesis inhibitor linezolid in the ribosomal peptidyl transferase center. *J Mol Biol* 1999;294(1):93-101.

- 33) Pournaras S, Ntokou E, Zarkotou O, Ranellou K, Themeli-Digalaki K, Stathopoulos C, et al. Linezolid dependence in *Staphylococcus epidermidis* bloodstream isolates. *Emerg Infect Dis* 2013;19(1):129-32.
- 34) Castanheira M, Watters AA, Mendes RE, Farrell DJ, Jones RN. Occurrence and molecular characterization of fusidic acid resistance mechanisms among *Staphylococcus spp.* from European countries (2008). *J Antimicrob Chemother* 2010;65(7):1353-8.
- 35) Falagas ME, Roussos N, Gkegkes ID, Rafailidis PI, Karageorgopoulos DE. Fosfomycin for the treatment of infections caused by Gram-positive cocci with advanced antimicrobial drug resistance: a review of microbiological, animal and clinical studies. *Expert Opin Investig Drugs* 2009;18(7):921-44.
- 36) Connell SR, Tracz DM, Nierhaus KH, Taylor DE. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(12):3675-81.
- 37) Sakar H, Mumcuoğlu I, Aksu N, Karahan ZC, Kurşun S, Kuştımur S. Koagülaz-negatif stafilokoklarda makrolid-linkozamid-streptogramin b grubu antibiyotiklere karşı nadir direnç genlerinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2012;46(2):170-9.
- 38) Livermore DM. Antibiotic resistance in staphylococci. *Int J Antimicrob Agents*. 2000;16 Suppl 1:S3-10.
- 39) Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1984;158(2):513-6.

- 40) International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(12):4961-7.
- 41) Del Bene VE, John JF Jr, Twitty JA, Lewis JW. Anti-staphylococcal activity of teicoplanin, vancomycin, and other antimicrobial agents: the significance of methicillin resistance. *J Infect Dis* 1986;154(2):349-52.
- 42) Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis* 2004;39(3):309-17.
- 43) Weiner LM, Webb AK, Limbago B, Dudeck MA, Patel J, Kallen AJ, et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: Summary of data reported to the national healthcare safety network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2016;37(11):1288-1301.
- 44) Mermel LA, Allon M, Bouza E, Craven DE, Flynn P, O'Grady NP, et al. Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; 49(1):1–45.
- 45) Beam E, Osmon D. Prosthetic joint infection update. *Infect Dis Clin North Am* 2018;32(4):843-59.
- 46) Kunutsor SK, Whitehouse MR, Blom AW, Beswick AD; Inform Team. Patient-related risk factors for periprosthetic joint infection after total joint arthroplasty: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2016 3;11(3):e0150866.

- 47) Berbari EF, Osmon DR, Lahr B, Eckel-Passow JE, Tsaras G, Hanssen AD, et al. The Mayo prosthetic joint infection risk score: implication for surgical site infection reporting and risk stratification. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2012;33(8):774-81.
- 48) Lewis SS, Dicks KV, Chen LF, Bolognesi MP, Anderson DJ, Sexton DJ, et al. Delay in diagnosis of invasive surgical site infections following knee arthroplasty versus hip arthroplasty. *Clin Infect Dis* 2015 1;60(7):990-6.
- 49) Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE. Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med* 2004;351(16):1645-54.
- 50) Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM, et al. Infectious Diseases Society of America. Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2013;56(1):e1-e25.
- 51) Azimi T, Mirzadeh M, Sabour S, Nasser A, Fallah F, Pourmand MR. Coagulase-negative staphylococci (CoNS) meningitis: a narrative review of the literature from 2000 to 2020. *New Microbes New Infect* 2020;37:100755.
- 52) Jung YJ, Chang MC. Bacterial meningitis and cauda equina syndrome after trans-sacral epiduroscopic laser decompression: A case report. *Medicine (Baltimore)* 2019;98(11):e14874.
- 53) Chu VH, Cabell CH, Abrutyn E, Corey GR, Hoen B, Miro JM, et al. Native valve endocarditis due to coagulase-negative staphylococci: report of 99 episodes from the International Collaboration on Endocarditis Merged Database. *Clin Infect Dis* 2004;39(10):1527-30.

- 54) Vandenesch F, Etienne J, Reverdy ME, Eykyn SJ. Endocarditis due to *Staphylococcus lugdunensis*: report of 11 cases and review. Clin Infect Dis 1993;17(5):871-6.
- 55) von Graevenitz A, Amsterdam D. Microbiological aspects of peritonitis associated with continuous ambulatory peritoneal dialysis. Clin Microbiol Rev 1992;5(1):36-48.
- 56) Gentile RC, Shukla S, Shah M, Ritterband DC, Engelbert M, Davis A, et al. Microbiological spectrum and antibiotic sensitivity in endophthalmitis: a 25-year review. Ophthalmology 2014;121(8):1634-42.
- 57) Ormerod LD, Ho DD, Becker LE, Cruise RJ, Grohar HI, Paton BG, et al. Endophthalmitis caused by the coagulase-negative staphylococci. 1. Disease spectrum and outcome. Ophthalmology 1993;100(5):715-23.
- 58) Kline KA, Lewis AL. Gram-positive uropathogens, polymicrobial urinary tract infection, and the emerging microbiota of the urinary tract. Microbiol Spectr 2016;4(2):10.1128/microbiolspec. UTI-0012-2012.
- 59) Kolman KB. Cystitis and pyelonephritis: Diagnosis, treatment, and prevention. Prim Care 2019;46(2):191-202.
- 60) Yogo A, Yamamoto S, Sumiyoshi S, Iwamoto N, Aoki K, Motobayashi H, et al. Two cases of pyelonephritis with bacteremia by *Staphylococcus epidermidis* in male patients with nephrolithiasis: Case reports and a literature review. J Infect Chemother 2022;28(8):1189-92.
- 61) Natsis NE, Cohen PR. Coagulase-negative staphylococcus skin and soft tissue infections. Am J Clin Dermatol 2018;19(5):671-7.

- 62) Hessam S, Sand M, Georgas D, Anders A, Bechara FG. Microbial profile and antimicrobial susceptibility of bacteria found in inflammatory hidradenitis suppurativa lesions. *Skin pharmacol Physiol* 2016;29(3):161-7.
- 63) Kutsyk RV, Kurovets' LM. Species composition and antibiotic sensitivity of staphylococci isolated from patients with furunculosis. *Mikrobiol Z* 2002;64(5):59-62.
- 64) Bellamy R, Barkham T. *Staphylococcus lugdunensis* infection sites: Predominance of abscesses in the pelvic girdle region. *Clin Infect Dis* 2002;35(3):E32-4.
- 65) Shields BE, Tschetter AJ, Wanat KA. *Staphylococcus simulans*: An emerging cutaneous pathogen. *JAAD Case Rep* 2016;2(6):428-9.
- 66) Goldstein EJ. Bite wounds and infection. *Clin Infect Dis* 1992;14(3):633-8.
- 67) Bellou V, Gkentzi D, Giormezis N, Verveniotti A, Spiliopoulou I, Dimitriou G. Persistent Coagulase-negative staphylococcal bacteremia in neonates: Clinical, Microbiological Characteristics and Changes within a Decade. *Antibiotics (Basel)* 2022;11(6):765.
- 68) Gram pozitif koklar kısım 1: Stafiloklar ve ilişkili Gram Pozitif Koklar (Çev,Hasçelik G, Yılmaz S, Göl N) Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology (Türkçe Baskısı) Başustaoğlu A, Us D, Çev. Ed,7.Baskı, Ankara: Sözkese Matbaacılık 2017:670-732
- 69) Ulusal Mikrobiyoloji Standartları Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi Cilt 2.2014
https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Mikrobiyoloji_Referans_Laboratuvarlari_ve_Biyolojik_Urunler_DB/rehberler/UMS_LabTaniRehberi_Cilt_2.pdf

- 70) De Paulis AN, Predari SC, Chazarreta CD, Santoianni JE. Five-test simple scheme for species-level identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol 2003;41(3):1219-24.
- 71) Kan Dolaşım Örneklerinin Laboratuvar İncelemesi Rehberi Ver02. 2022, Ankara. https://www.klimud.org/public/uploads/content/files/KLIMUD%20Rehberleri_Kan%20Dolasimi_ver02.pdf
- 72) The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0, 2023 https://www.eucast.org/clinical_breakpoints.
- 73) Stepanović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. APMIS. 2007;115(8):891-9.
- 74) Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. J Clin Microbiol. 1985;22(6):996-1006.
- 75) Skiba-Kurek I, Nowak P, Empel J, Tomczak M, Klepacka J, Sowa-Sierant I, et al. Evaluation of biofilm formation and prevalence of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus epidermidis* isolated from neonates with sepsis in southern Poland. Pathogens 2021;10(7):877.
- 76) Oliveira A, Cunha Mde L. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. BMC Res Notes 2010;3:260.

- 77) Ripon MK, Hasan M, Ahasan MM, Alam M, Kabir S. Comparison of three different methods of genomic DNA extraction from gram positive and gram negative bacteria. J. Expt Biosci, 2011; 2(1):55-60.
- 78) Rohde H, Kalitzky M, Kröger N, Scherpe S, Horstkotte MA, Knobloch JK, et al. Detection of virulence-associated genes not useful for discriminating between invasive and commensal *Staphylococcus epidermidis* strains from a bone marrow transplant unit. J Clin Microbiol 2004; 42(12):5614-9.
- 79) McManus BA, O'Connor AM, Kinnevey PM, O'Sullivan M, Polyzois I, Coleman DC. First detailed genetic characterization of the structural organization of type III arginine catabolic mobile elements harbored by *Staphylococcus epidermidis* by using whole-genome sequencing. Antimicrob Agents Chemother 2017;61(10):e01216-7.
- 80) Arciola CR, Baldassarri L, Montanaro L. Presence of *icaA* and *icaD* genes and slime production in a collection of staphylococcal strains from catheter-associated infections. J Clin Microbiol 2001;39(6):2151-6.
- 81) Zhou S, Chao X, Fei M, Dai Y, Liu B. Analysis of *S. epidermidis* *icaA* and *icaD* genes by polymerase chain reaction and slime production: a case control study. BMC Infect Dis 2013;13:242.
- 82) Petrelli D, Zampaloni C, D'Ercole S, Prenna M, Ballarini P, Ripa S, et al. Analysis of different genetic traits and their association with biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis* isolates from central venous catheter infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2006;25(12):773-81.
- 83) Diemond-Hernández B, Solórzano-Santos F, Leños-Miranda B, Peregrino-Bejarano L, Miranda-Novales G. Production of *icaADBC*-encoded polysaccharide intercellular adhesin and therapeutic failure in pediatric patients with staphylococcal device-related infections. BMC Infect Dis 2010;10:68.

- 84) Qin Z, Yang X, Yang L, Jiang J, Ou Y, Molin S, et al. Formation and properties of in vitro biofilms of ica-negative *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates. J Med Microbiol 2007;56(Pt 1):83-93.
- 85) Bowden MG, Chen W, Singvall J, Xu Y, Peacock SJ, Valtulina V, et al. Identification and preliminary characterization of cell-wall-anchored proteins of *Staphylococcus epidermidis*. Microbiology (Reading) 2005;151(Pt 5):1453-64.
- 86) Salgueiro VC, Iorio NL, Ferreira MC, Chamon RC, Dos Santos KR. Methicillin resistance and virulence genes in invasive and nasal *Staphylococcus epidermidis* isolates from neonates. BMC Microbiol 2017;17(1):15.
- 87) Vandecasteele SJ, Peetermans WE, R Merckx R, Rijnders BJ, Van Eldere J. Reliability of the ica, aap and atlE genes in the discrimination between invasive, colonizing and contaminant *Staphylococcus epidermidis* isolates in the diagnosis of catheter-related infections. Clin Microbiol Infect 2003;9(2):114-9.
- 88) Lisowska-Łysiak K, Lauterbach R, Międzobrodzki J, Kosecka-Strojek M. Epidemiology and pathogenesis of *Staphylococcus* bloodstream infections in humans: A review. Pol J Microbiol 2021;70(1):13-23.
- 89) Chebbi Y, Frigui S, Raddaoui A, Belloumi D, Lakhel A, Torjemane L, et al. Coagulase negative *Staphylococcus* bacteremia in hematopoietic stem cell transplant recipients: Clinical features and molecular characterization. Acta Microbiol Immunol Hung 2021;68(2):73-9.
- 90) Karakullukçu A, Kuşkucu MA, Ergin S, Aygün G, Midilli K, Küçükbasımacı Ö. Determination of clinical significance of coagulase-negative staphylococci in blood cultures. Diagn Microbiol Infect Dis 2017;87(3):291-294.

- 91) García-Vázquez E, Fernández-Rufete A, Hernández-Torres A, Canteras M, Ruiz J, Gómez J. When is coagulase-negative *Staphylococcus* bacteraemia clinically significant? Scand J Infect Dis 2013;45(9):664-71.
- 92) Siti NM, Wan Nazirah WAB, Rosni I, Mohamed AN, Salbiah N. Species distribution and clinical profiles of coagulase-negative staphylococci (CoNS) isolated from blood cultures among paediatric patients in Hospital Kuala Lumpur. Med J Malaysia 2020;75(3):266-73.
- 93) Berends MS, Luz CF, Ott A, Andriesse GI, Becker K, Glasner C, et al Trends in occurrence and phenotypic resistance of coagulase-negative staphylococci (CoNS) found in human blood in the northern netherlands between 2013 and 2019. Microorganisms 2022;10(9):1801.
- 94) Asai N, Sakanashi D, Suematsu H, Kato H, Hagihara M, Watanabe H, et al. Clinical characteristics and relevance of coagulase-negative *Staphylococci* other than *S. epidermidis* by positive blood culture. J Microbiol Immunol Infect 2021;54(4):632-8.
- 95) Hitzenbichler F, Simon M, Salzberger B, Hanses F. Clinical significance of coagulase-negative staphylococci other than *S. epidermidis* blood stream isolates at a tertiary care hospital. Infection 2017;45(2):179-86.
- 96) Osaki S, Kikuchi K, Moritoki Y, Motegi C, Ohyatsu S, Nariyama T, et al. Distinguishing coagulase-negative *Staphylococcus* bacteremia from contamination using blood-culture positive bottle detection pattern and time to positivity. J Infect Chemother 2020;26(7):672-5.
- 97) Ishihara S, Bitner JJ, Farley GH, Gillock ET. Vancomycin-resistant gram-positive cocci isolated from the saliva of wild songbirds. Curr Microbiol 2013;66(4):337-43.

- 98) Gu B, Kelesidis T, Tsiodras S, Hindler J, Humphries RM. The emerging problem of linezolid-resistant *Staphylococcus*. J Antimicrob Chemother 2013;68(1):4-11.
- 99) Szk Yıldız S, Kastepe B, naldı , ŐimŐek H, Karahan ZC. Tek sağlık yaklaŐımında multidisipliner uygulamalı antibiyotik duyarlılık testi eğitimi: Anadolu projesi Mikrobiyol Bul 2021;51(4):341-7.
- 100) Du X, Zhu Y, Song Y, Li T, Luo T, Sun G, et al. Molecular analysis of *Staphylococcus epidermidis* strains isolated from community and hospital environments in China. PLoS One 2013;8(5):e62742.
- 101) cal DN, Dolapçı İ, Karahan ZC, Tekeli A. Stafilokok izolatlarının biyofilm oluşturma zelliklerinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2017;51(1):10-9.
- 102) Stewart PS. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. Int J Med Microbiol 2002;292(2):107-13.
- 103) Arciola CR, Campoccia D, Speziale P, Montanaro L, Costerton JW. Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. Biomaterials 2012;33(26):5967-82.
- 104) de Silva GD, Kantzanou M, Justice A, Massey RC, Wilkinson AR, Day NP, et al. The ica operon and biofilm production in coagulase-negative staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. J Clin Microbiol 2002;40(2):382-8.
- 105) Pantanella F, Valenti P, Natalizi T, Passeri D, Berlutti F. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. Ann Ig 2013;25(1):31-42.

- 106) Pinheiro L, Brito CI, Oliveira Ad, Pereira VC, Cunha Mde L. *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*: detection of biofilm genes and biofilm formation in blood culture isolates from patients in a Brazilian teaching hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2016;86(1):11-4.
- 107) Papadimitriou-Olivgeri I, Giormezis N, Papadimitriou-Olivgeris M, Zotou A, Kolonitsiou F, Koutsileou K, et al. Number of positive blood cultures, biofilm formation, and adhesin genes in differentiating true coagulase-negative staphylococci bacteremia from contamination. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2016;35(1):57-66
- 108) Rohde H, Burandt EC, Siemssen N, Frommelt L, Burdelski C, Wurster S, et al. Polysaccharide intercellular adhesin or protein factors in biofilm accumulation of *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus* isolated from prosthetic hip and knee joint infections. *Biomaterials* 2007;28(9):1711-20.
- 109) Los R, Sawicki R, Juda M, Stankevic M, Rybojad P, Sawicki M, et al. A comparative analysis of phenotypic and genotypic methods for the determination of the biofilm-forming abilities of *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett* 2010;310(2):97-103.
- 110) Montanaro L, Campoccia D, Pirini V, Ravaioli S, Otto M, Arciola CR. Antibiotic multiresistance strictly associated with *IS256* and *ica* genes in *Staphylococcus epidermidis* strains from implant orthopedic infections. *J Biomed Mater Res A* 2007;83(3):813-8.
- 111) Kozitskaya S, Cho SH, Dietrich K, Marre R, Naber K, Ziebuhr W. The bacterial insertion sequence element *IS256* occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* isolates: association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides. *Infect Immun* 2004;72(2):1210-5.

- 112) Rolo J, de Lencastre H, Miragaia M. Strategies of adaptation of *Staphylococcus epidermidis* to hospital and community: amplification and diversification of SCCmec. J Antimicrob Chemother 2012;67(6):1333-41.
- 113) Barbier F, Lebeaux D, Hernandez D, Delannoy AS, Caro V, François P, et al. High prevalence of the arginine catabolic mobile element in carriage isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis*. J Antimicrob Chemother. 2011;66(1):29-36.
- 114) Pi B, Yu M, Chen Y, Yu Y, Li L. Distribution of the ACME-*arcA* gene among methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* and identification of a novel ccr allotype in ACME-*arcA*-positive isolates. J Med Microbiol 2009;58(Pt 6):731-6.
- 115) Al-Jabri Z, Al-Shabibi Z, Al-Bimani A, Al-Hinai A, Al-Shabibi A, Rizvi M. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates reveals variable composite SCCmec ACME among different STs in a tertiary care hospital in Oman. Microorganisms 2021;9(9):1824.
- 116) Granslo HN, Klingenberg C, Fredheim EG, Rønnestad A, Mollnes TE, Flaegstad T. Arginine catabolic mobile element is associated with low antibiotic resistance and low pathogenicity in *Staphylococcus epidermidis* from neonates. Pediatr Res 2010;68(3):237-41
- 117) Otto M. Community-associated MRSA: what makes them special? Int J Med Microbiol 2013;303(6-7):324-30.
- 118) Miller LG, Diep BA. Clinical practice: colonization, fomites, and virulence: rethinking the pathogenesis of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Clin Infect Dis 2008;46(5):752-60.
- 119) Soumya KR, Sugathan S, Mathew J, Radhakrishnan EK. Studies on coexistence of mec gene, IS256 and novel *sasX* gene among human clinical coagulase-negative staphylococci. 3 Biotech 2016;6(2):233.

- 120) De Backer S, Xavier BB, Vanjari L, Coppens J, Lammens C, Vemu L, et al. Remarkable geographical variations between India and Europe in carriage of the staphylococcal surface protein-encoding *sasX/sesI* and in the population structure of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* belonging to clonal complex 8. Clin Microbiol Infect 2019;25(5):628.e1-628.e7.

