

T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KİSTİK FİBROZLU HASTALARIN SOLUNUM YOLU
ÖRNEKLERİNDE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
KÜÇÜK KOLONİ VARYANTLARININ VE
METİSİLİNE DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
SUŞLARININ ARAŞTIRILMASI**

(UZMANLIK TEZİ)

Dr. Nagehan PAKAŞTİÇALİ

Tez Danışmanı

DOÇ. DR. HASAN NAZİK

İSTANBUL

2014

T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ

İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KİSTİK FİBROZLU HASTALARIN SOLUNUM YOLU
ÖRNEKLERİNDE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
KÜÇÜK KOLONİ VARYANTLARININ VE
METİSİLİNE DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
SUŞLARININ ARAŞTIRILMASI**

(UZMANLIK TEZİ)

Dr. Nagehan PAKAŞTİÇALİ

Tez Danışmanı

DOÇ. DR. HASAN NAZİK

İSTANBUL

2014

ÖNSÖZ

Tez çalışmalarım ve eğitimimle ilgili her konuda desteğini hiçbir zaman esirgemeyen tez danışmanım sayın Doç. Dr. Hasan Nazik'e ve engin bilgi ve tecrübesiyle yol göstericim olan değerli hocam sayın Prof. Dr. Betigül Öngen'e;

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle her zaman yanımda olan; İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapmakta olan tüm değerli hocalarıma, asistan arkadaşlarıma ve emeği geçen diğer tüm çalışanlara; ayrıca İstanbul Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'nda görev yapmakta olan ve tez çalışmama destek veren öğretim üyelerine ve asistanlarına;

Şu anki konumuma gelmemde çok emekleri olan sevgili aileme ve daima yanımda olan eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Nagehan PAKAŞTİÇALI

Bu tez İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje no: 32591

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ	I
İÇİNDEKİLER	II
KISALTMALAR	IV
TABLOLAR LİSTESİ	V
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VI
RESİMLER LİSTESİ.....	VII
 I. ÖZET	 1
II. İNGİLİZCE ÖZET	3
III. GİRİŞ	5
IV. GENEL BİLGİLER	6
A. TARİHÇE	7
B. EPİDEMİYOLOJİ	7
C. METABOLİZMA.....	9
D. VİRÜLANS.....	12
E. PATOGENEZ	12
F. KLİNİK ÖZELLİKLER	13
G. KİSTİK FİBROZ-MRSA VE <i>S. AUREUS</i> KKV İLİŞKİSİ	14
H. LABORATUVAR TANISI	15
I. TEDAVİ	18
V. GEREÇ VE YÖNTEM	19
A. HASTALAR	19
B. ÖRNEKLER	19
C. ÖRNEKLERİN ALINMASI	19
D. MİKROBİYOLOJİK İNCELEME.....	19
1. Kültür	19
2. Kültürlerin değerlendirilmesi	20
E. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ.....	22

F. MOLEKÜLER DENEYLER.....	23
1. DNA izolasyonu	23
2. Primerlerin Seçimi.....	23
3. PCR Deneyi.....	24
4. Elektroforez	25
G. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	26
VI. BULGULAR	27
A. DEMOGRAFİK ÖZELLİKLER.....	27
B. MSSA, MRSA VE PREVALANSI.....	27
C. <i>S. AUREUS</i> KKV FENOTİPİK ÖZELLİKLERİ.....	28
D. PCR DENEYİ SONUÇLARI.....	32
E. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK SONUÇLARI	33
VII. TARTIŞMA.....	40
VIII. KAYNAKLAR.....	49

KISALTMALAR

dUMP: Deoksiurasil monofosfat

dTMP: Deoksitimidin monofosfat

thyA: Timidilat sentazı kodlayan gen bölgesi

KF: Kistik fibrozis

KKV: Küçük koloni varyantları

MRSA: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*

MSSA: Metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus*

ATP: Adenozintrifosfat

hemA, *hemB*, *hemH*: Hemin biyosentezinde görevli gen bölgeleri

MSA: Mannitol tuzlu agar

NADH: Nikotinamid adenin dinükleotid

FADH₂: Flavın adenin dinükleotid

MİK: Minimum inhibe edici konsantrasyon

EDTA: Etilendiamin-tetra-asetik asit

TE: Tris-EDTA

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PBP 2a: Penisilin bağlayan protein 2a

nucA: *S. aureus*'a özgü gen bölgesi

mecA: metisiline dirençli *S. aureus*a özgü gen bölgesi

mecC: metisiline dirençli *S. aureus*a özgü gen bölgesi

TABLÖLAR LİSTESİ**Sayfa No**

Tablo 1: Koenfeksiyon oranları; n (%).....	28
Tablo 2: <i>S. aureus</i> KKV Fenotipik Özellikleri	29
Tablo 3: MSSA suşlarında disk difüzyon yöntemi ile belirlenen direnç yüzde oranları.....	34
Tablo 4: <i>S. aureus</i> KKV direnç yüzde oranları.....	35
Tablo 5: <i>S. aureus</i> KKV suşlarının MİK değerleri.....	36
Tablo 6: <i>S. aureus</i> KKV suşlarının korezistans fenotip durumları.....	37
Tablo 7: MRSA suşlarına ait direnç yüzde oranları.....	37
Tablo 8: MRSA suşlarında korezistans fenotip durumları.....	38
Tablo 9: MSSA, <i>S. aureus</i> KKV, MRSA üremeleri.....	39

ŞEKİLLER LİSTESİ**Sayfa No**

- Şekil 1:** MSSA suşlarının direnç oranlarının grafiksel görünümü.....34
- Şekil 2:** *S. aureus* KKV suşlarının direnç oranlarının grafiksel görünümü.....36
- Şekil 3:** MRSA suşlarına ait direnç oranlarının grafiksel görünümü.....38
- Şekil 4:** MSSA, MRSA ve *S. aureus* KKV suşlarının direnç oranlarının
grafiksel görünümü.....39

RESİMLER LİSTESİ

Sayfa No

Resim 1: CHROMagar MRSA besiyerinde üreyen bir MRSA suşu.....	20
Resim 2: Chapman besiyerinde normal <i>S. aureus</i> ve <i>S. aureus</i> KKV.....	21
Resim 3: PCR cihazı.....	25
Resim 4: <i>S. aureus</i> KKV suşunda hemoliz özelliği ve koloni büyüklüğünün normale dönmesi.....	29
Resim 5: Koagülaz deneyi.....	30
Resim 6: DNase deneyi	30
Resim 7: <i>S. aureus</i> KKV suşlarının <i>S. aureus</i> lateks kiti ile test edilmesi.....	31
Resim 8: MRSA suşlarının MRSA kiti ile test edilmesi.....	31
Resim 9: PCR sonrası <i>nucA</i> geni amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri	32
Resim 10: Multipleks PCR sonrası <i>femB</i> , <i>mecA</i> ve <i>mecC</i> genlerine ait amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri.....	33
Resim 11: <i>S. aureus</i> KKV için koyun kanlı Mueller Hinton besiyerinde penisilin G ve sefoksitin E-test duyarlılık testi.....	35

I. ÖZET

Kistik fibroz (KF), dünya genelinde beyaz ırkın en sık görülen ilerleyici ve öldürücü kalıtsal hastalıklarından bir tanesi olarak bilinmektedir. KF’de en sık tutulan organ akciğer olup solunum yolu enfeksiyonları, KF olgularında morbidite ve mortaliteden en sık sorumlu olan klinik durum olarak kabul edilmektedir. KF’de solunum yollarında kolonizasyona ve enfeksiyona en sık yol açan mikroorganizmaların başında *Staphylococcus aureus* gelmektedir. Son yıllarda; metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları ile kolonizasyon ve enfeksiyon oranı tüm topluluklarda arttığı gibi KF popülasyonunda da artış göstermektedir. *S. aureus* KKV, mikrobiyolojik besiyerlerinde yavaş ürerler ve tipik *S. aureus* morfolojisi göstermemelerinin yanı sıra, normal *S. aureus* suşlarına göre antibiyotiklere daha yüksek oranlarda direnç gösterirler.

Bu çalışmada İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi’nde takibi yapılan KF tanılı hastaların rutin alınan solunum yolu örneklerinde metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA), *S. aureus* KKV ve MRSA prevalansları ve antimikrobiyal duyarlılık sonuçları incelenmiştir.

Çalışmamızda toplam 84 KF hastasından 207’si (% 68) derin boğaz salgısı, 97’si (% 32) balgam ve 1 tane bronkoalveoler lavaj (BAL) örneği olmak üzere toplam 305 klinik örnek MSSA, *S. aureus* KKV ve MRSA varlığı açısından değerlendirilmiştir. Çalışmaya dahil edilmiş olan 84 KF hastasının 60’ında (% 71,4) MSSA, 18’inde (% 21,4) *S.aureus* KKV, 11’inde (% 13) MRSA izole edilmiştir. Respiratuvar örneklerinde MSSA üreyen hastaların *S. aureus* KKV prevalansı % 16,6 (10/60) olarak belirlenmiştir.

MSSA suşları için belirlenen duyarlılık test sonuçları değerlendirildiğinde; izolatların % 83,5’i penisiline, % 22’si eritromisine, % 14,3’ü tetrasikline ve % 13,3’ü klindamisine karşı dirençli olduğu belirlenmiştir. Vankomisin teikoplanin, linezolid, telitromisin ve sefoksitine karşı direnç MSSA suşlarında saptanmamıştır. *S.aureus* KKV suşlarının duyarlılık deneyleri sonucunda, % 81,6’sı penisiline, % 21,1’i klaritromisine, % 10,5’i tetrasikline, % 7,9’u klindamisine ve rifampisine, % 15,8’i levofloksasine, % 5,3’ü trimetoprim-sulfametoksazol (TMP-SXT) ve gentamisine karşı dirençli bulunmuştur. Vankomisin ve sefoksitine karşı direnç saptanmamıştır. Tigesiklin MİK değerleri <0,016 ile 0,19 µg/ml arasında bulunmuştur. MRSA suşlarının tümü penisiline dirençli olduğu saptanmıştır. % 50 oranında tetrasikline, %

43 oranında ise gentamisine direnç belirlenmiştir. Vankomisin, teikoplanin, linezolid ve TMP-SXT'ye karşı tüm suşlar hassas bulunmuştur.

Bu çalışmada KF hastalarının solunum yolu örneklerinde MSSA, MRSA ve *S. aureus* KKV prevalansları ve antibiyotik duyarlılıkları incelenmiştir. Özellikle MRSA ve *S. aureus* KKV suşları persistan infeksiyonla ilişkili ve birçok antibiyotiğe dirençli olabileceğinden, KF hastalarının solunum yolu örneklerinin bu yönde dikkatle incelenmesi büyük önem taşımaktadır.

II. İNGİLİZCE ÖZET

Cystic fibrosis (CF), is a hereditary, autosomal recessive disease, one of the most common progressive and lethal hereditary syndromes in Caucasian populations in the world. The most common affected tissue by CF is lung and the main causes for the high morbidity and mortality in patients with CF are recurrent respiratory infections. *S. aureus* is one of the most common colonization and infection agent in patients with CF. In recent years, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) colonization and infection in the CF population is increase as the rate of increase in all communities. SCV strains growth slowly on microbiological culture media and do not show typical *S. aureus* morphology. Besides these, they have higher rates of resistant to antibiotics according to normal *S. aureus* strains.

In this study, the prevalence and antibiotic susceptibilities of methicillin-sensitive *S. aureus* (MSSA), *S. aureus* SCV and MRSA strains isolated from routine respiratory samples of patients with CF patients in İstanbul Medical Faculty Hospital are investigated.

In our study, respiratory samples in total 305 which are comprised 97 (32%) sputum, 207 (68%) deep throat swab and only one bronchioalveolar lavage (BAL) specimens of 84 CF patients were screened for the presence of MSSA, *S. aureus* SCV and MRSA. 60 (71,4%), 18 (21,4%) *S. aureus* SCV and 11 (13%) MRSA were harboured MSSA, *S. aureus* SCV and MRSA respectively, in their respiratory specimens. The prevalence of *S. aureus* SCVs in MSSA positive patients was 16.6% (10/60).

The resistance rates of MSSA were as follows: penicilin 83,5%, erythromycin 22%, tetracycline 14,3% and clindamycin 13,3%. No resistance was detected for vancomycin, teicoplanin, linezolid, telitromycin and sefoxitin among MSSA isolates. The resistance rates of *S. aureus* SCVs were as follows: penicilin 81,6%, clarithromycin 21,1%, tetracycline 10,5%, clindamycin and rifampicin 7,9%, levofloxacin 15,8%, trimethoprim–sulphamethoxazole (TMP-SXT) and gentamicin 5,3%. No resistance was detected for vancomycin and sefoxitin among these isolates. MICs for tigecycline were between <0,016 ile 0,19 µg/ml. All MRSA isolates were resistant against penicilin. The resistance rates of MRSA were as follows; 50% for tetracycline, 43% for gentamicin,

29% for erythromycin, clindamycin, levofloxacin. All MRSA isolates were susceptible against vancomycin, teicoplanin, linezolid and TMP-SXT.

In this study MSSA, MRSA and *S. aureus* SCVs' prevalence and antibiotic susceptibilities evaluated in CF patients' respiratory samples. Especially, MRSA and *S. aureus* SCV could be associated persistent infection and more resistant to antibiotics, so it is crucial importance to evaluate CF respiratory samples.

III. GİRİŞ

Kistik fibroz (KF), dünya genelinde beyaz ırkın en sık görülen ilerleyici ve öldürücü kalıtsal hastalıklarından bir tanesi olarak bilinmektedir (2,44) KF’de en sık tutulan organ akciğer olup solunum yolu enfeksiyonları, KF olgularında morbidite ve mortaliteden en sık sorumlu olan klinik durum olarak kabul edilmektedir (33,89).

Stafilokokların neden olduğu hastalıklar, ilk kez 1880’de Ogston adlı araştırmacı tarafından tanımlanmıştır. *Staphylococcus aureus* solunum sistemi, deri, yumuşak doku, kemik, eklem ve endovasküler sistemlerde enfeksiyonlara neden olan hastalık etkenlerinden bir tanesidir (50).

S. aureus sıklıkla KF olgularında solunum yolu örneklerinden ilk izole edilen patojen olup, nazofarengeal taşıyıcılığı KF hastalarında daha yüksek olduğu bilinmektedir. Son yıllarda; metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları ile kolonizasyon ve enfeksiyon oranı tüm topluluklarda arttığı gibi KF popülasyonunda da artış göstermektedir (32,18). Dolayısıyla KF hastalarının nazofarengeal örneklerinin bu yönde dikkatle incelenmesi büyük önem taşımaktadır.

KF olgularından izole edilen *S. aureus* suşlarının bir diğer özelliği de, önceden okzotrofik formlar (timidin bağımlı izolatlar) olarak tanımlanan “küçük koloni varyantları (KKV)”nın varlığıdır (50,69). *S. aureus* KKV, normal *S. aureus* suşlarına göre daha yavaş üremektedirler ve daha küçük, pigmentsiz, hemolizsiz koloniler oluşturmaktadırlar (51). Koloni morfolojilerindeki bu farklılıklar nedeniyle laboratuvar değerlendirmelerinde normal flora üyesi zannedilerek, rahatlıkla gözden kaçabilmektedirler (69). Aynı zamanda genel olarak KKV’lerin antibiyotiklere daha dirençli olabilmesi tedavide zorluklarla neden olabilmektedir.

Bilindiği gibi metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları, birçok antibiyotiğe direnç gösterebilen mikroorganizmalardır. Hastane kaynaklı enfeksiyonların önemli bir etkeni olan MRSA, son yıllarda toplum kökenli enfeksiyonlara da neden olduğu bilinmektedir (11). Dolayısıyla MRSA ile enfekte veya kolonize hastaların belirlenmesi, enfeksiyonun toplumda yayılımını önleme açısından da büyük önem taşımaktadır (46).

Bu çalışmada İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi’nde takibi yapılan KF tanılı hastaların rutin solunum yolu örneklerinde (derin boğaz salgısı, balgam,

bronkoalveolar lavaj) *S. aureus* KKV araştırılması ve kromojenik seçici bir besiyeri ile MRSA taraması mikrobiyolojik kültür yöntemleriyle yapılacaktır.

IV. GENEL BİLGİLER

Tüm ekzokrin epitelleri etkileyebilen bir hastalık olan kistik fibroz, epitel hücresi membranındaki KF Transmembran Regülatör (KFTR) geni tarafından kodlanan klor kanalının defekti sonucunda ortaya çıkmaktadır (91,72). Klor kanalındaki bu defekt de, gerekli olan normal anyon akımını engelleyerek su hareketinin yavaşlamasına, bu da dehidratasyonuna bağlı olarak mukusun yoğunlaşmasına ve duktuslarda obstrüksiyona yol açmaktadır. Mukusun yoğun visköz yapıda olması ve buna bağlı bronşiyal obstrüksiyon, kronik infeksiyon ve inflamasyona neden olmaktadır (24).

KF’de en sık tutulan organ akciğer olup kolonizasyona ve infeksiyona en sık yol açan mikroorganizmaların başında ise *S. aureus* gelmektedir (33,52). *S. aureus* prevelansının incelendiği bir çalışmada KF hastalarının % 70’inden fazlasının akciğerlerinde normal *S. aureus* ve/veya KKV formlarının varlığı gösterilmiştir (41). *S. aureus*’un bir varyantı olan *S. aureus* KKV hem antibiyotik direnci hem de solunum yolu infeksiyonunun kronikleşmesi açısından önem taşıdığından KF hastalarının solunum yolu örnekleri KKV açısından dikkatle değerlendirilmelidir (101).

Son yıllarda; MRSA suşları ile kolonizasyon veya infeksiyon oranı tüm topluluklarda arttığı gibi KF popülasyonunda da artış göstermektedir. Dolayısıyla KF hastalarının nazofarengeal örneklerinin bu açıdan da dikkatle incelenmesi büyük önem taşımaktadır.

KF hastalarının solunum yolu örneklerinin değerlendirilmesi mikrobiyoloji laboratuvarları açısından bir takım zorluklar taşımaktadır. Balgamin yoğun visköz yapıda olması mikroorganizmaların izolasyon şansını oldukça azaltmaktadır. Ayrıca mukoid *P. aeruginosa* üremesi, kültür plaklarında sıklıkla diğer Gram negatif ve pozitif bakterileri kapatarak izolasyonlarını zorlaştırmakta hatta önlemektedir (92). Bu nedenle KF solunum yolu örneklerinin mikrobiyolojik değerlendirmesi için deneyimli personelin olması ve seçici besiyerlerinin kullanılması gerekmektedir.

A. TARİHÇE

Andersen isimli araştırmacı tarafından 1938 tarihinde ‘pankreasın kistik fibrozisi’ olarak tanımlanan kistik fibroz (KF), beyaz ırkta sık görülen bir genetik hastalıktır (2). Hastalık, adını duktuslarda meydana gelen kistik dilatasyon ve fibrozisten almıştır.

Pasteur ve Koch tarafından ilk kez görülmüş ve üretilmiş olan stafilokokları ise; 1881 yılında Ogston adlı araştırmacı ilk kez *Staphylococcus* cinsi olarak adlandırmıştır. Bundan sonra ise 1884 yılında Rosenbach tarafından *S. aureus* tür adı ve infeksiyonları tanımlanmıştır. 1950 yılında *Staphylococcus* cinslerine ait penisiline dirençli suşlar, 1962’de metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları tanımlanmıştır (32).

Küçük koloni varyantları ise ilk kez 1910 yılında *Eberthella typhosa*’nın olağan dışı bir tipi şeklinde tanımlanmıştır. Bu bakterinin şimdiki adı *S. Typhi*’dir (68). Önceden okzotrofik formlar (timidin bağımlı izolatlar) olarak tanımlanan “küçük koloni varyantları (KKV), bir dönemde de G (gonidial) formlar veya cüce (dwarf) koloniler olarak adlandırılmışlardır (50,69,66).

Bugüne kadar KKV; başta *S. aureus* olmak üzere metisiline dirençli *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. capitis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Burkholderia cepacia*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella* serovarları, *Shigella* türleri, *Lactobacillus acidophilus*, *Brucella melitensis* ve *Neisseria gonorrhoeae* gibi çok sayıda bakteri türlerinde tanımlanmıştır. Buna karşın KKV ile ilgili çalışmalar çoğunlukla stafilokoklar üzerinde yoğunlaşmıştır (69).

Klinik örneklerden *S. aureus* KKV’nın ilk izolasyonu yaklaşık 100 yıl öncesine dayanmaktadır. Ancak bu fenotipin kronik ve tekrarlayan infeksiyonlarla ilişkisi son yıllarda açığa çıkmıştır (66). Bilim tarihinde ilk *S. aureus* KKV infeksiyon vakası 1999’da Almanya’da tanımlanmıştır. Vakada 39 yaşında Darier (keratozis follikularis) hastası olan bir kişinin derisinden persistan infeksiyon etkeni olarak *S. aureus* KKV izole edildiği bildirilmiştir (99).

B. EPİDEMİYOLOJİ

KF otozomal resesif geçişli bir hastalık olup insidansının popülasyonlar arasında farklılık göstermekle birlikte 1/2.000-3.500 canlı doğumda bir olduğu bilinmektedir. Taşıyıcılık oranı ise 1/25 olarak bildirilmektedir (71). KF’nin Türkiye’deki görülme sıklığı ile ilgili kesin bir oran verilememekle birlikte, akraba evliliğinin yaygın

olmasından dolayı KF sıklığının düşünülenden daha yüksek olabileceği ve bazı hastaların da henüz tanı alamadan kaybedildiği öngörülmektedir (92).

Toplumdan kazanılmış ve hastane kaynaklı *S. aureus* infeksiyonlarının görülme sıklığı yıllar içerisinde sürekli artış göstermektedir (51). KF hastalarında *S. aureus* kolonizasyon prevelansının araştırıldığı bir çalışmada, 13-17 yaş arası grupta en yüksek olmak üzere % 50'nin üzerinde bulunmuştur. Yine aynı çalışmada bazı merkezlerden yetişkin hasta grupları için de benzer oranlar bildirilmiştir (56).

KKV'lerin ise sanılandan daha fazla oranda görüldüğü ancak tanısındaki püf noktalarının iyi bilinmemesinden dolayı az sayıda tanımlanabildiği belirtilmektedir (99). Kistik fibroz tanılı 72 hastanın balgam örneklerinin incelendiği bir çalışmada, 72 hastanın 52'sinde (% 72,2) *S. aureus* ile kolonizasyon saptanmış ve bu 52 hastanın 24'ünde (% 46) KKV izole edildiği bildirilmiştir (41). Altı yıl süren ve prospektif olan bu çalışmada, KF hastalarında *S. aureus* prevelansı ve persistansı araştırılmış, %70'ten fazla hastanın hava yollarının ortalama 37 ay boyunca, *S. aureus* ve/veya *S. aureus* KKV ile persistan olarak infekte veya kolonize olduğu saptanmıştır (41).

Kistik Fibroz Vakfı'nın 2005 yılında yayınlamış olduğu bir raporda; KF hastalarındaki MRSA infeksiyon prevelansının 2000 yılında % 6,1 iken, 2006 yılında % 17,2'ye yükseldiği bildirilmiştir (23). Amerika ve Avrupa'da KF hastalarından izole edilen *S. aureus*'ların % 8-23'ü MRSA olduğu bildirilmiştir (10,86).

KF hastalarının klinik örnekleri çoğu kez polimikrobiyal üremeli olduğundan dolayı mikroorganizmaların izolasyonunun kolaylaşması ve gözden kaçmalarının engellenmesi için çeşitli seçici besiyerlerinin kullanılması önerilmektedir (75,83). Ticari olarak da elde edilebilen seçici besiyerlerinin duyarlılık ve özgüllüklerini değerlendiren birçok çalışma yapılmıştır. MRSA izolasyonu için üç farklı kromojenik besiyerinin kullanıldığı bir çalışmada; 24 saatlik inkübasyon sonrası duyarlılıkları % 90.9 ile % 94.9; özgüllükleri % 97.1 ile % 99.5 arasında değiştiği saptanmıştır (35).

2007 yılında KF hastalarındaki *S. aureus* prevelansını ve MRSA kolonizasyonunu araştıran çok merkezli bir çalışmada, 627 hastanın 275'inde (% 44) *S. aureus* saptanmıştır. MRSA kolonizasyon oranı % 5; KKV kolonizasyon oranı ise % 4 olarak tespit edilmiştir (96). 2008 yılında Türkiye'de yapılmış bir prevelans çalışmasında ise 248 KF hastasından alınan toplam 512 klinik örnek incelenmiş ve 248 hastanın 20'sinden (% 8,1); 512 örneğin de 32'sinden (% 6,4) KKV izole edilmiştir (104).

Aynı türden Amerika’da ve Almanya’da yapılan çalışmalarda KKV oranı sırasıyla % 10 ve % 33 olarak bildirilmiştir (28,39). Almanya’dan bildirilen son yıllara ait başka bir çalışmada ise toplam 252 KF hastası incelenmiş ve 120’sinde *S. aureus* varlığı saptanmıştır. Bu 120 hastanın 100’ünün normal *S. aureus* ile, 20’sinin ise *S. aureus* KKV ile kolonize olduğu gösterilmiştir (7).

C. METABOLİZMA

S. aureus, gram pozitif kok şeklinde, tipik olarak aerob ortamda üreyebilen, bunun yanında fakültatif anaerob üreme özelliği de gösteren, biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olan bakterilerdir. Cildin normal florasında özellikle de burun mukozasında bulunmaktadır (32).

S. aureus metisilin direncine göre metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) ve metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) olmak üzere iki ana grupta incelenmektedir. 1959 yılında metisilin adlı antibiyotiğin tanımlanmasını takiben 2 yıl içinde *mecA* genlerine bağlı olarak metisilin direnci saptanmaya başlanmış ve MRSA suşları tanımlanmıştır (32). 2011 yılında Danimarka’da insan ve sığırlardan izole edilen MRSA suşlarında tip XI olarak tanımlanan yeni bir SCCmec elementi tarafından kodlanan yeni bir *mecA* gen homologu saptanmış ve *mecC* (*mecA* LGA251) olarak adlandırılmıştır (27).

S. aureus KKV mikrobiyolojik besiyerlerinde yavaş ürerler ve tipik *S. aureus* morfolojisi göstermezler. Normal *S. aureus* kolonilerinden yaklaşık 10 kat daha küçük koloniler oluştururlar. Normalden küçük koloniler oluşturuyor olmalarının nedeni genellikle onlar için kesin büyüme faktörü olarak gerekli olan menadion, hemin ve/veya timidin bağımlı olmalarından kaynaklanmaktadır (99,69). Menadion ve hemin eklenerek yapılan bir çalışmada; klinik suşlarda ve laboratuvarıda üretilmiş olan bir hemB mutantında küçük koloni varyantı fenotipinin normal boyutlara dönebildiği gösterilmiştir (4,97,65). Menadion ve hemin, elektron transport zincirinin komponentlerinin biyosentezi için gereklidir. Menadiondan menakinon sentezlenir; hemin de sitokromların biyosentezinde kullanılmaktadır (101). Menakinon ve prostetik grup olan hem, elektronların transferinde kullanılmaktadır (15). Menakinon, FADH₂ veya NADH oksidaz kompleksinden elektronları alan moleküllerin içinde ilk elektron alıcısıdır. Hem, menakinondan elektronları alan sitokromların parçasıdır (90). Burdaki eksikliğin genetik açıdan nedeni ise; bu iki molekülün biyosentezi için gerekli enzimleri

kodlayan genlerdeki mutasyondur. Hemin okzotrofik KKV'nda *hemH* geninin delesyonu, *hemA* geninin çerçeve kayması şeklindeki mutasyonu olmak üzere iki tip mutasyon söz konusudur (47). Ayrıca hemin ve menadion biyosentezinde rol alan ribozomal bir protein olan L6 proteinini kodlayan *rplF* genindeki genetik mutasyon aynı zamanda aminoglukozid grubu antibiyotiklere ve fusidik aside karşı dirençle ilişkilendirilmiştir (48).

KKV'ları fermentasyon ve solunum yetenekleri zayıf, düşük ATP düzeyine sahiptirler. Aynı zamanda elektron transportunda ve timidin biyosentezinde yetersizlik mevcuttur. (53,3).

KKV'nın koloni yapısının normalden küçük oluşunun, hücre duvarında yer alan teikoik asidin biyosentezindeki azalmaya bağlı olabileceği düşünülmektedir. Elektron transportu; teikoik asit sentezi (30,49) hücre duvar biyosentezi, ATP, aminoasit ve karbonhidratların hücreye alınması ve nükleik asitlerin yapım ve onarımı ayrıca pigment oluşumu için gereklidir. İşte bu elektron transportundaki aksama sonucunda KKV'na özgü olan fenotipik değişikliklerin ortaya çıkmış olabileceği belirtilmektedir. Sonuç olarak; düşük ATP üretimi, bakterinin normalden küçük koloni oluşturmaya neden olmaktadır (67).

Hemin eksikliğinde hem üretilmemekte ve buna bağlı olarak da elektron transportunda kullanılan sitokromların sentezi olamamaktadır. Bir araştırmaya göre porfirin biyosentezini kontrol eden genlerdeki mutasyonlar, hemin veya sitokromlar içerisine katılmış hemin prekürsörlerinin eklenmesi ile geri döndürülebilmektedir (38).

Bazı araştırmacılara göre de KKV; aslında spor eşdeğeri yapılardır. Yavaş üreme göstermeleri ve çevredeki bazı maddeleri hücre içine yavaş alıyor olmaları ile spor oluşturmayan bakterilerin bir nevi sporları gibi işlev görmektedir. Buna kaynak olarak da *B. subtilis*'in sporulasyonu aşamasındaki erken basamaklardan biri olan menadion biyosentezindeki patlama sonrasında menadion üretiminin durması olduğu gösterilmektedir (22,34).

Metabolizmada meydana gelen birtakım değişikliklerin bakterinin yavaş üremesine ve küçük koloniler oluşturmaya neden olmasına karşın, klinik örneklerden izole edilen KKV'nın tamamında metabolik yetersizlik bulunamamıştır. Dolayısıyla KKV'ları elektron transportunda yetersizlik olan KKV ve timidin biyosentezinde yetersizlik olan KKV olmak üzere iki grup altında incelenebilir (69).

Elektron transportu yetersiz KKV; menadion veya hemin biyosentezi yetersiz olan alt gruptur. Dolayısıyla menadion veya hemine karşı okzotrofizm göstermektedirler. Bu gruba ait fenotipik özellikler, menadion veya hemin ilavesi ile normal fenotipe döndürülebilmektedir. Bunun yanı sıra tiamin bağımlı KKV'den de söz edilmektedir. Tiamin, menadion biyosentezinde gerekli bir molekül olduğundan, tiamin bağımlı olan KKV, menadion gereksinimi olanların bir alt tipi olarak değerlendirilmektedir. Ancak bu alt tipe ait suşlar, insanlardan henüz çok az sayıda izole edildiğinden çalışmalarda biraz geri planda bırakılmaktadırlar (1).

Elektron transportu yetersiz KKV'nda bu yetersizlikten kaynaklanan bir takım özellikler mevcuttur. Bunlar azalmış solunum, hemoliz ve koagülaz aktivitesinde ve pigmentasyonda azalma, değişken koloni fenotipi ve aminoglikozidlere karşı artmış direnç olarak sıralanabilir (66).

Timidin biyosentezi yetersiz KKV ise; dUMP'ı dTMP' a çeviren timidilat sentaz enzimini kodlayan *thyA* genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkmaktadır (13). Yapılan bir çalışmada KF hastalarında infeksiyonları baskılamak amacıyla uzun süreli trimetoprim-sulfametoksazol (SXT) tedavisi sonucunda aynı hastada SXT'e duyarlı olan suşların aksine, SXT'e dirençli timidin bağımlı KKV suşunun ortaya çıktığının gösterilmesi ile tanımlanmıştır. İncelenen KF hastalarının solunum yolu örneklerinden izole edilen 176 KKV'nın 122'sinin timidin bağımlı olduğu saptanmıştır (40,39)

SXT, tetrahidrofolik asit yolağını engelleyerek, dTMP'tan dUMP sentezlenmesini katalize eden timidilat sentazın aktivitesini durdurmakta; sonuçta timidin biyosentezinde yetersizlik ortaya çıkmaktadır (87). Böylece özellikle KF hastalarında uzun süreli SXT tedavisi sonrası timidin bağımlı KKV suşları seçilerek ortaya çıkmaktadır. Akciğer dokusunda, KKV; hücreler içerisine girdiğinde timidin konsantrasyonu, KKV fenotipinin devamına olanak sağlayacak kadar düşük bulunmaktadır (39).

Maalesef son yıllarda yapılan çalışmalarda hastanelerde kullanılan biguanid triklosan gibi antiseptik maddelerin de herhangi bir okzotrofizm göstermeyen ancak bu bioside karşı dirençli olan bir KKV fenotipinin seçilmesine neden olabileceği bildirilmiştir (5). Tüm bu seçici ortamlar veya ajanlara karşın; KKV hiçbir hazırlayıcı zemin olmadan da ortaya çıkabilmektedir. Buna karşın bazı KKV suşları da mutasyonun düzeyine göre normal fenotipe dönebilmektedirler. Revertant KKV olarak

adlandırılan bu suşlar; delesyonla oluşmuşlara nazaran daha çok nokta mutasyonu gerçekleştirerek oluşmuş suşlardır (21).

D. VIRÜLANS

S. aureus suşları birçok virulans faktörüne sahiptirler. Bunlardan bir tanesi MRSA suşlarında daha çok eksprese olan, panton valentin lökositidin (PVL) isimli lökositolitik toksinidir. Aynı zamanda bu toksin ciddi, nekrotizan akciğer infeksiyonlarının da nedenidir (45). Toksin salınımı, KF hastalarının akciğerlerinde olduğu gibi anaerobik ortamda ve subinhibitör konsantrasyonlardaki antibiyotikler gibi birçok faktör tarafından regüle edilmektedir (29,84).

KKV, normal *S. aureus* suşlarına göre antibiyotiklere daha yüksek oranlarda direnç gösterirler (50). Antibiyotik direnç paterninin yanı sıra, KKV'nın daha çok hücre içinde yerleşim gösteriyor olmaları, konak savunma mekanizmalarına daha dirençli olmalarına yol açmaktadır (7). Aynı zamanda *S. aureus* suşlarının (MRSA ve KKV dahil) biyofilm sentezleyebilmektedirler ve bu da ayrı ve güçlü bir virülans faktörü olarak karşımıza çıkmaktadırlar (26).

Virulansı araştıran bir çalışmada; hemin (hemB) mutantı ve normal (wild) tip suşlarla enfekte edilen fare modellerinde septik artrit oluşturulmuştur. HemB mutantı ile intravenöz yoldan inoküle edilen farelerde, 'wild' tip suş verilen farelerden daha sık ve klinik olarak daha ağır artrit olduğu gözlenmiştir. Buna karşın; mutant suşla enfekte olan fare, 'wild' tip suşla enfekte olanla karşılaştırıldığında, eklem ve böbreklerde anlamlı oranda daha düşük bakteri yüküne sahip olduğu saptanmıştır. Yine bu çalışmada, hemB mutantının 'wild' tip suştan yaklaşık 20 kat daha fazla proteaz enzimi ürettiği belirlenmiştir. Sonuç olarak; hemB mutantının 'wild' tipe göre daha virulan olduğuna karar verilmiştir (37).

Bütün bu verilere bakıldığında KKV korkunç bir tablo çiziyor olsa da, virulansı normal *S. aureus* 'a göre çok yüksek değildir. Hatta KKV, düşük ekzotoksin ürettikleri için normal *S. aureus* suşlarına göre daha az doku hasarına yol açmaktadırlar. Bu konuya yönelik yapılmış bir çalışmada; KKV suşlarının normal suşlara nazaran kronik ancak daha hafif klinik gidişli infeksiyonlara neden olmaktadır (67).

E. PATOGENEZ

S. aureus antimikrobiyal ajanlardan kaçmak için, klasik mekanizmaların yanında başka birtakım stratejilere de sahiptir. Biyofilm üreterek veya hücre içi yerleşim göstererek oluşturdıkları difüzyon bariyerleri, kaçış mekanizmaları arasında sayılabilir. Genel olarak *S. aureus*, hücre içi yerleşim göstermeyen bir patojen olarak bilinmektedir. İntrasellüler yerleşim *S. aureus* KKV için tanımlanmıştır. Bu konuda yapılan birçok çalışmada bu varyantların endotelial veya epitelial hücrelerde uzun süre canlı kalabildiğini gösterilmiştir (39,99,98,41).

KKV'nın hücre içi yerleşimi ile ilgili yapılan bir araştırmada, primer insan endotelial hücreleri, normal *S. aureus* ve KKV suşları ile enfekte edilmiştir. Ardından, canlı hücre görüntüleme yöntemi ile hücreler izlenmiş; bir saat içinde tüm stafilokokların lizozomal organeller içinde akümüle olduğu ve bu durumun yaklaşık 5 gün sürdüğü gözlenmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada, KKV'nın lizozomlardaki bakterisidal aktiviteye karşı direnç gösterebildikleri saptanmıştır (80).

KKV'nın metabolik yollarındaki defektler nedeniyle yavaş üreme özelliği göstermeleri sonucu genellikle hızlı üreyen bakterilere karşı aktif olan hücre duvarına etkili antibiyotiklerin KKV'na karşı etkinliği daha az olmaktadır (65).

F. KLİNİK ÖZELLİKLER

S. aureus, KF tanılı bebek ve çocuklarda en erken saptanan mikroorganizmaların başında gelmektedir. Son 10 yıl içinde ise MRSA belirgin olarak ön plana çıkmış bulunmaktadır (32). Yapılan çalışmalarda MRSA ile enfekte olan hastaların hastaneye yatış ve oral/ inhale/intravenöz antibiyotik alım oranlarının; MSSA ile enfekte hastalarından daha yüksek olduğu saptanmıştır (70). Ayrıca MRSA ile enfekte KF hastalarındaki akut alevlenmeler sonrasında; akciğer fonksiyonlarının düzeltilmesinde başarısız olduğu belirtilmektedir (74).

S. aureus KKV, çeşitli doku ve organlarda kronik ve tekrarlayan infeksiyonlara neden olmaktadır. Bunlar; cilt infeksiyonları, osteomyelit (100), kalp pili ile ilişkili kan dolaşımı ve ventriküloperitoneal şant infeksiyonları (81,85) olarak sayılabilir.

S. aureus KKV'nın etken olduğu ilk persistan ve antibiyotik dirençli deri infeksiyon vakası 1999 yılında 39 yaşında bir Darier hastasında tanımlanmıştır (4). Von Eiff ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, derinin farklı alanlarından ve burundan

olmak üzere toplam 53 farklı klinik örnekten izole edilmiş olan 119 *S. aureus* suşunun incelemeleri yapılmış, bunun sonucunda normal *S. aureus* suşlarının yanı sıra Hemin-okzotrofik KKV'nın da deri infeksiyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Hücre içinde yaşayan *S. aureus* KKV'nın konak savunmasından kaçarak persistan deri infeksiyonlarına neden olduğu düşünülmüştür (100).

G. KİSTİK FİBROZ-MRSA VE *S. AUREUS* KKV İLİŞKİSİ

Kistik fibroz hastalarında MRSA'nın etken olduğu kronik solunum yolu infeksiyonlarının kötü klinik gidiş ve akciğer fonksiyonlarında hızlı düşüşle (FEV₁) ilişkili olduğu gösterilmiştir (94,18). *Dasenbrook* ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, KF hastalarında MRSA varlığının akciğer fonksiyonlarını doğrudan etkileyebildiğini göstermişlerdir. Araştırmacılar, 8-21 yaş aralığındaki KF hastalarının akciğer fonksiyonlarındaki kötüleşmenin, MRSA ile kolonize/infekte olanlarda non-MRSA ile kolonize/infekte olanlara nazaran daha yüksek olduğu saptanmıştır (17). Buna ek olarak; Amerika Kistik Fibroz Vakfı'nın yayınladığı raporda, persistan MRSA infeksiyonlarının, KF hastalarında yüksek mortalite ile ilişkili olduğu belirtilmektedir (18).

MRSA'yı KF hasta grubunda önemli kılan diğer bir faktör ise, MRSA ile infekte hastaların yüksek seviyede izolasyon gerekliliğidir. Yüksek seviyedeki bu hasta izolasyonu ise olumsuz psikolojik etkiyi (88), yatan hasta servislerinde bakım kalitesinde düşüşü (77) ve yüksek maliyeti de beraberinde getirmektedir (32).

Ayrıca kronik MRSA infeksiyonu, diğer KF ve KF olmayan hastalara çapraz bulaşa neden olabilmektedir. Bu potansiyel yayılma tehlikesi de, hastane ortamında veya sosyal ortamda MRSA infeksiyonlarını bir halk sağlığı sorunu haline dönüştürmektedir. Hastaneden topluma veya tam tersi şekilde yayılımın giderek arttığı bildirilmektedir (76,62). Bazı çalışmalarda ve modellerde, toplum kaynaklı MRSA infeksiyonlarının hastanelere girdiği ve artık hastanelerde görülen MRSA infeksiyonlarının asıl kaynağının toplum olabileceği gösterilmiştir. Bu da risk grubundaki hastalarda eradikasyonu ön plana çıkarmaktadır (16).

Kistik fibroz hastalarındaki KKV kolonizasyonunun araştırıldığı bir çalışmada, hastaların % 25'inde KKV saptanmıştır. Aynı çalışmada, *S. aureus* ile kolonize olan hastalar incelendiğinde ise bunların % 50'sinde *S. aureus* KKV saptanmıştır. Bu grupta ön plana çıkan özellik hastalarda uzun süreli aminoglikozid kullanımı olmuştur (67).

Prospektif bir çalışmada kistik fibroz tanılı 72 hastanın balgam örnekleri incelendiğinde, 72 hastadan 52'sinde (% 72,2) *S. aureus* ile kolonizasyon saptanmış ve bu 52 hastadan 24'ünde (% 46) KKV izole edildiği gösterilmiştir (41). Yine bu çalışmada KF hastalarında *S. aureus* prevelansı ve persistansı araştırılmış; % 70'ten fazla hastanın hava yollarının ortalama 37 ay boyunca, normal *S. aureus* ve/veya *S. aureus* KKV ile persistan olarak infekte veya kolonize olduğu saptanmıştır (41).

Kistik fibroz hastalarında yapılan çalışmalarda; uzun süreli trimetoprim-sulfometakzasol (SXT) tedavisinin özellikle timidin-bağımlı KKV'nın ortaya çıkmasına neden olduğu gösterilmiştir (39). DNA sentezinde dTMP gerekli olması nedeniyle, SXT'e duyarlı *S. aureus* suşları SXT tedavisi ile inhibe olurken; timidin-bağımlı KKV, SXT'ün inhibe ettiği sentez basamağından etkilenmeden, hücre dışındaki timidini alarak canlılığını devam ettirebilmektedirler (69).

H. LABORATUVAR TANISI

CLSI önerilerine göre metisilin direnci sefoksitin disk difüzyon testi ile belirlenebilmektedir (14). Stafilokoklarda metisilin direncinden *mecA* geni sorumlu tutulmaktadır. Direnç, penisilin bağlayan protein 2a/2' (PBP2a/PBP2') adlı proteinin üretimi ile ortaya çıkmaktadır. Ancak bu direnç geni heterojen olarak eksprese olduğu için; metisilin direncinin saptanması her zaman doğru olarak yapılamamaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile *mecA* geninin saptanması altın standart yöntem olarak kabul edilmekle birlikte, birçok laboratuvar moleküler testlerin yapılabileceği olanaklara sahip olmadığından, metisilin direncini hızlı ve doğru olarak saptayabilecek fenotipik yöntemler geliştirilmiştir.

Bu yöntemlerden biri MRSA suşlarının üremesine izin veren, MSSA suşlarının ise üremelerini inhibe eden çeşitli marka ve isimlerde seçici kromojenik besiyerleridir. Kromojenik besiyerleri, MRSA suşlarının çeşitli enzimlerinin kromojenik substratlarını içermektedir. Bakteriler bu substratları kullandığında renkli koloniler oluşturmaktadırlar. Sonuç olarak, kromojenik besiyerlerinin hedef mikroorganizmayı konvansiyonel besiyerlerine göre daha kısa sürede izole etmeyi sağladığı ve karışık üremeli kültürlerde ayrımı kolaylaştırdığı bildirilmektedir (59).

S. aureus suşlarındaki metisilin direncinin belirlenmesinde sefoksitin disk difüzyon testi (SDD), otomatize sistem ve ticari bir kromojenik besiyerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, PCR ile *mecA* geni tespiti referans yöntem olarak

değerlendirilerek testlerin duyarlılık, özgüllük değerleri SDD testi için sırasıyla %98.3, %100; otomatize sistem için sırasıyla %100, %97.4; CHROMagar MRSA besiyeri için sırasıyla %96.7, %81.6 olarak bulunmuştur (93).

S. aureus küçük koloni varyantları (KKV)'nın tipik *S. aureus* suşlarından çok farklı olan birtakım morfolojik özellikleri nedeniyle kültür değerlendirmeleri sırasında kolaylıkla gözden kaçabilmektedir. Varlığı akılda tutulsa bile izolasyon ve tanımlamada da mikrobiyologlar açısından çeşitli zorluklar taşımaktadır (67,99). Dolayısıyla mikrobiyologların dikkatini çekecek ve KKV'na yönlendirebilecek olan hastanın öyküsü laboratuvara mutlaka bildirilmelidir. Böylece KKV izolasyon şansı artmış olacaktır.

S. aureus KKV özellikle nadir görülen persistan enfeksiyonu olanlarda ve aminoglikozid ve trimetoprim-sulfometaksazolu uzun süre kullanan hastalardan izole edildiği için, bu tip vakalarda *S. aureus* KKV olasılığı daima akılda tutulmalı ve ona uygun izolasyon yöntemleri kullanılarak KKV varlığı araştırılmalıdır (67). Standart antimikrobiyal tedavi protokolleriyle yapılan tedavilerde, tekrarlayan başarısızlık yaşanan prostetik eklem enfeksiyonlarında da *S. aureus* KKV akla getirilmelidir (95). Ortopedik hastalarda tedavide gentamisin içeren boncukların kullanılmasının elektron transportu defektif KKV'larının, normal *S. aureus* suşları içerisinde seçilmesine olanak sağladığı bildirilmiştir (69).

Önceden okzotrofik formlar (timidin bağımlı izolatlar) olarak tanımlanan *S. aureus* KKV (50), normal *S. aureus* suşlarına göre daha yavaş üremektedirler ve daha küçük, pigmentsiz, hemolizsiz koloniler oluşturmaktadırlar (51). Koloni morfolojilerindeki bu farklılıklar nedeniyle laboratuvar değerlendirmelerinde normal flora üyesi zannedilerek, rahatlıkla gözden kaçabilmektedirler (69). Bu atipik koloni morfolojisinin yanı sıra, mannitol tuzlu agarda mannitol fermentasyonunun KKV'nda negatif olması gibi biyokimyasal reaksiyonlarda da farklılık görülmektedir (100). Yine bu bakterilerde hemolitik aktivite ve pigment oluşumu, normal *S. aureus*'ta % 89 civarında iken, *S. aureus* KKV'nda % 0.25 oranlarına kadar düşebilmektedir (98).

KKV iki farklı koloni morfolojisinde üreyebilmektedir: Timidin bağımlı KKV'lerin oluşturduğu küçük kabarık pigmentli merkezin etrafını çevreleyen yarı şeffaf kenarları ile 'sahanda yumurta'(fried-egg) şeklinde görülen koloni tipi ve normal *S. aureus* kolonilerinin yaklaşık onda biri büyüklüğündeki 'iğne ucu'(pinpoint) koloni tipi. 'Orta büyüklükte koloni' olarak tanımlanabilecek pinpoint koloni tipinden biraz daha

büyük koloniler de oluşturabilmektedirler. Timidin-bağımlı KKV'nın Gram boyaması ile yapılan mikroskopik incelemesinde, pleomorfik koklar görülmektedir. Elektron mikroskobu incelemesinde ise bozulan hücre bölünmesine bağlı şekli bozulmuş ve genişlemiş koklar görülmektedir (40). Hemin-bağımlı KKV'nda de bu tip özellikler bulunmaktadır.

KKV'nın laboratuvar tanısında, birtakım konvansiyonel kültür ve tanımlama yöntemlerinin uygulanması gerekmektedir. Ekim yapılan besiyerleri, 35⁰C'de aerobik koşullarda 24–48 saat inkübe edilmelidir. Daha sonra bu kültürlerden elde edilen kolonilerden KKV şüphesi olanların, koyun kanlı Columbia agar ve Schaedler agar plaklarına eş zamanlı pasajları yapılmakta ve Columbia kanlı agar plağı aerobik ortamda, Schaedler agar plağı ise %5-10 CO₂'li ortamda 35⁰C'de 24 saat inkübe edilmektedir. Bir gün sonra şüpheli olan kolonilerin büyüklükleri, hemoliz ve pigmentasyon özellikleri, Columbia kanlı agar ve Schaedler agar plaklarındaki üremeler karşılaştırılarak incelenmektedir. Columbia kanlı agardaki *S. aureus* küçük koloni varyantı fenotipindeki koloniler, hemin ve menadiona bağımlı olduklarından daha küçük koloni oluşturmaktadırlar. Buna karşın hemin ve menadion içeren Schaedler agar plaklarında daha büyük, normal tipte *S. aureus* koloni büyüklüğünde üremektedirler. Her iki besiyerinde de *S. aureus* KKV olarak şüphelenilen kolonilerden yapılan Gram boyama, katalaz ve koagülaz testleri ile *S. aureus* olduğu kesinleştirilir. *S. aureus* KKV'nın koagülaz aktivitesi azalmış olduğundan, tüpte koagülaz testini 18 saate uzatmak gerekmektedir. En doğru sonuç için ise 24 saat inkübe etmek gerekmektedir (67,99).

Lateks aglütinasyon yöntemi ile de *S. aureus* tanısının doğrulanması yapılabilmektedir. *S. aureus* KKV açısından şüphelenilen fakat koagülaz testi negatif olarak sonuçlanabilen suşların doğrulanması ise, *nuc* ve *coa* gibi bazı türe özgü genlerin araştırılması ile yapılmaktadır (6).

KKV'lerin atipik özellikleri nedeniyle antibiyotik duyarlılık testleri için günümüzde kabul görmüş bir standardizasyon henüz mevcut değildir. KKV, besiyerlerinde yavaş üredikleri için, antibiyotik duyarlılık testlerinin standardizasyonunda zorluklar ortaya çıkmaktadır. Bu konuda yapılmış olan çalışmalar değerlendirildiğinde disk difüzyon dahil olmak üzere bir çok metodun uygulandığı gözlenmektedir. Bununla birlikte sıvı dilüsyon veya E- test gibi yöntemlerle MİK tespiti daha doğru olabileceği bildirilmektedir (42-43).

I. TEDAVİ

Günümüzde KF hastalarında MRSA tedavisi için spesifik bir rehber henüz bulunmamaktadır. MRSA ile infekte bir KF hastasının akut pulmoner alevlenmesinin tedavisine yönelik istatistiksel bilgi birikimi maalesef yoktur. Bir profilaktik MRSA protokolü, ileriki zamanlarda ortaya çıkabilecek direnç sorunlarını önlemede etkin bir yöntem olabilir (32).

Son yıllarda MRSA tedavisinde kullanılan antibiyotikler; Fusidik asit, trimetoprim-sulfometaksazol (TMP-SXT), doksisiklin-minosiklin, linezolid, klindamisin, levofloksasin, vankomisin, teikoplanin, rifampin olarak sıralanabilir. Uzun dönem TMP-SXT tedavisinin *S. aureus* KKV ortaya çıkması için bir risk faktörü olduğu bildirilmekte ise de henüz sadece uzun dönem tedavi sonrası mı yoksa kısa dönem tedavi sonrası da da gelişme riskinin olup olmadığı kesinlik kazanmış değildir (32).

Yine *S. aureus* KKV'na bağlı enfeksiyonların tedavisinde izlenecek bir prosedür henüz bulunmamaktadır. Bildirilen bazı yayınlarda KKV'nın florokinolonlara karşı oldukça duyarlı oldukları (36), kinolon-rifampin kombinasyonunun tedavide kullanılabileceği belirtilmektedir (78). Gentamisinim timidin-bağımlı KKV suşlarına karşı yüksek etkinlik gösterdiğini belirten çalışmalar da mevcuttur (26). Ayrıca doku kültürü sistemlerinde yapılan çalışmalarda KKV için en etkin tedavi rejiminin trimetoprim-sulfometaksazol ile rifampin kombinasyonu olduğu saptanmıştır (67). İn vitro koşullarda yapılan antimikrobiyal hassasiyetlerde yanıltıcı olarak okzotrofizmin geri dönmesi sonucunda, bu mikroorganizmaların antibiyotiklere daha hassas görüldüğü düşünülmektedir. Menadion okzotroflarında ise bu geri dönüşüm, hastalara antibiyotik tedavisi ile eş zamanlı olarak menadionun bir formu olan K vitamini verilmesi ile sağlanabileceği belirtilmektedir. Böylece eradike edilmeye çalışılan suşun antibiyotiklere daha duyarlı hale gelebileceği düşünülmekle birlikte daha fazla klinik çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır (67).

Veriler genel olarak değerlendirildiğinde, MRSA ve *S. aureus* KKV enfeksiyonlarının etkin tedavisinin belirlenebilmesi için yeni çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.

V. GEREÇ VE YÖNTEM

A. HASTALAR

Çalışmaya 15 Nisan 2013 – 20 Şubat 2014 tarihleri arasında, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi'ne başvuran ve servislerde yatırılarak izlenen kistik fibroz tanılı hastalar dahil edilmiştir.

B. ÖRNEKLER

Çalışmaya 84 hastadan alınan 97 balgam, 207 derin boğaz salgısı örneği ve 1 bronkoalveoler lavaj örneği olmak üzere toplam 305 klinik örnek dahil edilmiştir. Olguların hepsinin adı, soyadı, cinsiyeti, yaşı, protokol ve dosya numaraları, alınan örneğin tarihi ve cinsi kaydedilmiştir.

C. ÖRNEKLERİN ALINMASI

Balgam çıkartabilen hastalardan alınan balgam örnekleri, steril bir kap içerisinde, en kısa sürede ekim yapılmak üzere laboratuvara ulaştırılmıştır. Balgam çıkartamayan hastalardan ise steril eküvyon ile posterior farenksten alınan derin boğaz salgısı örnekleri Stuart taşıyıcı (Fırat Medikal, Türkiye) besiyeri içinde laboratuvara gönderilmiştir.

D. MİKROBİYOLOJİK İNCELEME

1.Kültür

Örneklerin ekimi ve değerlendirilmesi ASM önerileri doğrultusunda yapılmıştır. Çalışmada kullanılan besiyerleri, içerikleri, firma isimleri aşağıda belirtilmiştir:

1. Koyun Kanlı Columbia Agar:

- . Columbia agar bazı
(Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, İngiltere)
- . %5 koyun kanı (yaklaşık 50°C'de eklenmiştir).

2. Chapman Besiyeri (Mannitol tuzlu agar)

(Bio Mérieux, Fransa)

3. CHROMagar MRSA

(Becton, Dickinson and Company, ABD)

2. Kültürlerin Değerlendirilmesi

CHROMagar MRSA (Becton, Dickinson and Company, ABD) besiyerindeki üremeler, 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar sonrasında değerlendirilmiştir. Seçici kromojenik olan bu besiyerinde üremiş olan açık pembe-leylak renkli kolonilerin hepsi MRSA açısından değerlendirilmeye alınmıştır (Resim 1). Kolonilerden  ze ile alınıp sıvı besiyerinde 0,5 McFarland bulanıklığında süspansiyon hazırlanmış; ardından Mueller-Hinton agar (Becton, Dickinson and Company, ABD) besiyerinde sefoksitin diski ile metisilin direnci değerlendirilmiştir. Metisiline dirençli bulunan kolonilerden Gram boyama yapılarak Gram pozitif kok; katalaz testi yapılarak stafilokok oldukları tespit edilmiştir. Gram pozitif kok olan kolonilerden *S. aureus* tanımlaması için DNaz deneyi yapılmıştır. MRSA suşlarının hepsinde konfirmasyon için MRSA lateks agglutinasyon kiti (Bio M rieux, Fransa) kullanılmıştır.



Resim 1: CHROMagar MRSA besiyerinde üreyen bir MRSA suşu

Ayrıca Chapman besiyerinde mannitol fermentasyonu sonucu besiyerini turuncudan sarı renge dönüştürmüş olan sarı renkli büyük kolonilerin varlığı *S. aureus*, dolayısıyla MRSA açısından şüpheli olarak tanımlanmış ve bu kolonilerden de yukarıda anlatılan testler yapılmıştır.

KKV için ise Chapman ve koyun kanlı Columbia agar besiyerindeki üremeler 24 ve 48 saatlik inkübasyonlar sonrasında değerlendirilmiştir. Koyun kanlı Columbia agarda küçük ve sahanda yumurta (fried egg) görünümündeki koloniler ile Chapman besiyerinde mannitol fermentasyonu nedeniyle besiyerini turuncudan sarı renge dönüştüren sarı renkli kolonilerin varlığı *S. aureus* açısından şüpheli olarak tanımlanmıştır. Chapman besiyerini sarı renge dönüştürsün ya da dönüştürmesin sarı veya pembe renkli ve özellikle küçük koloniler de *S. aureus* KKV açısından şüpheli olarak değerlendirilmiştir (40, 67). Chapman besiyerinde gözlenen küçük koloniler okla işaretlenmiş şekilde Resim 2’de gösterilmektedir.



Resim 2: Chapman besiyerinde normal *S. aureus* ve *S. aureus* KKV

S. aureus KKV şüpheli olan kolonilerden Columbia kanlı agar ve Schaedler agar (Becton, Dickinson and Company, ABD) plaklarına eş zamanlı olmak üzere tek koloni ekimleri yapılmıştır. Columbia kanlı agar plağı aerobik ortamda, Schaedler agar plağı ise % 5-10 CO₂'li ortamda olmak üzere 35 C°'de 24 saat inkübe edilmiştir. Bir gün sonra *S. aureus* KKV şüpheli olan kolonilerin boyut, pigmentasyon ve hemoliz özellikleri; Columbia kanlı agar ve Schaedler agar plaklarında karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Columbia kanlı agarda çok küçük, pigmentsiz, hemoliz oluşturmeyan kolonilerin Schaedler agarda normal boyutlarda, hemolizli ve pigment yapmış olması *S. aureus* KKV açısından anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

S. aureus KKV şüpheli kolonilerden Gram boyama yöntemi ile boyama yapılarak Gram pozitif kok olup olmadıkları incelenmiştir. Gram pozitif kok olan kolonilerden *S. aureus* tanımlaması için katalaz ve tüpte koagülaz testleri yapılmıştır. *S. aureus* KKV için, tüpte koagülaz testi 35C°'de 24 saat inkübasyon sonrası değerlendirilmiştir. *S. aureus* KKV suşlarının hepsinde konfirmasyon için *S. aureus* lateks agglutinasyon testi (Plasmatec, UK) kullanılmıştır.

S. aureus KKV'ları ve normal fenotipik özellikte izole edilmiş olan *S. aureus* suşları doğrulama testleri yapıldıktan sonra ileri moleküler çalışmalar için saklama besiyeri (% 15 gliserollü BKİ-BeyinKalp İnfüzyon Broth) içerisinde -20C° ve -70C°'de saklanmıştır.

E. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ

S.aureus KKV suşlarının % 5 koyun kanlı Columbia agardaki 24 saatlik taze pasajları kullanılarak; aşağıda listelenmiş olan E testler ile % 5 koyun kanlı Mueller Hinton Agar besiyerinde antimikrobiyal duyarlılık deneyi yapılmıştır:

E-testler: Pensilin G, sefoksitin, vankomisin, klindamisin, klaritromisin, tetrasiklin, tigesiklin (Bio Mérieux, Fransa)

Yine *S.aureus* KKV suşlarının % 5 koyun kanlı Columbia agardaki 24 saatlik taze pasajları kullanılarak; aşağıda listelenmiş olan antibiyotik diskleri ile % 5 koyun kanlı Mueller Hinton Agar besiyerinde antimikrobiyal duyarlılık deneyi yapılmıştır:

Diskler: Sefoksitin (30 µg), gentamisin (10 µg), levofloksasin (5 µg), trimetoprim-sulfametoksazol (1,25 µg-23,75 µg) (Becton, Dickinson and Company, ABD), rifampisin (5 µg) (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, İngiltere)

MSSA ve MRSA suşlarının % 5 koyun kanlı Columbia agardaki 24 saatlik taze pasajları kullanılarak; aşağıda listelenmiş olan antibiyotik diskleri ile Mueller Hinton Agar besiyerinde CLSI önerileri doğrultusunda antimikrobiyal hassasiyet deneyi yapılmıştır:

Diskler: Penisilin G (10 IU), sefoksitin (30 µg), gentamisin (10 µg), levofloksasin (5 µg), trimetoprim-sulfametoksazol (1,25 µg-23,75 µg), vankomisin (30 µg), teikoplanin (30 µg), eritromisin (15 µg), klindamisin (2 µg), telitromisin (15 µg), linezolid (30 µg), tetrasiklin (30 µg) (Becton, Dickinson and Company, ABD)

Tüm petriler 35°C’ deki etüvde normal atmosferde 24 saat süre ile inkübe edildikten sonra antibiyotik duyarlılık sonuçları değerlendirilmiştir.

F. MOLEKÜLER DENEYLER

MRSA izolatlarının *S. aureus* oldukları PCR yöntemi ile *nucA* bölgesi araştırılarak doğrulanmıştır. Yine aynı suşların *femB*, *mecA* ve *mecC* genlerini taşıyıp taşımadıklarının moleküler olarak doğrulanması multipleks PCR ile yapılmıştır.

Tüm *S. aureus* KKV izolatlarının *S. aureus* olduklarının moleküler olarak doğrulanması ise, PCR yöntemi ile *nucA* gen bölgesi araştırılarak yapılmıştır.

1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu ısı ekstraksiyonu yöntemi kullanılarak yapılmıştır (57). İzole edilen suşların 24 saatlik taze kültürlerinden 5 ml sıvı besiyeri içerisine tek koloni alınıp süspanse edilerek bir gece 37°C’de inkübe edilmiştir. Sıvı besiyerinden 2 ml alınarak steril ependorflara yerleştirilip 10.000 xg’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılıp, ependorflara 1 ml distile su koyulup vortekslendikten sonra tüpler kaynayan su içerisinde 10 dakika kaynatılmıştır. Sonra tüpler 10.000 xg’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra üst kısımdaki DNA içeren yaklaşık 150 µl’lik bölüm DNA amplifikasyonunda hedef DNA olarak kullanılmak üzere – 20 °C’de saklanmıştır.

2. Primerlerin Seçimi

nucA PCR için kullanılan primer dizileri aşağıdaki gibidir (9):

nucA primer 1: GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT

nucA primer 2: AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC

Multipleks PCR için kullanılan primer dizileri aşağıdaki gibidir (61):

femB primer 1: CAT GGT TAC GAG CAT CAT GG

femB primer 2: TGG CTG AAC CCA TTT TTG AT

mecA primer 1: TGG TAT GTG GAA GTT AGA TTG G

mecA primer 2: CTA ATC TCA TAT GTG TTC CTG TAT TGG C

mecC primer 1: CAT TAA AAT CAG AGC GAG GC

mecC primer 2: TGG CTG AAC CCA TTT TTG AT

3. PCR Deneyi

TE tamponunun hazırlanması:

- 1 M Tris pH 8

Trizma Baz (Becton, Dickinson and Company, ABD) 121,1 gr

Distile su 1000 ml

HCl eklenerek pH 8'e ayarlandıktan sonra tamamen çözülmesi beklenmiş, sonra otoklavlanmış ve oda ısısında saklanmıştır.

- 0,5 M EDTA pH 8:

EDTA (Becton, Dickinson and Company, ABD) 186,1 gr

Distile su 1000 ml

İlk olarak 800 ml distile su eklenerek, pH ayarlandıktan sonra 1000 ml'ye tamamlanmıştır (pH 8 olması için yaklaşık 20 gr NaOH eklenmiştir). Daha sonra otoklavlanarak, oda ısısında saklanmıştır.

- 1 X TE (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8) :

1 M Tris pH 7,5 10 ml

0,5 M EDTA pH 8 2 ml

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklavlanıp oda ısısında saklanmıştır.

PCR karışımının hazırlanması:

Toplam 48 μ l olan PCR karışımına 2 μ l daha önceden ekstrakte edilmiş DNA örneği eklenmiştir. Reaksiyon karışımı aşağıda belirtilen şekilde oluşturulmuştur:

Distile su	30,8 μ l
Tampon 10x	5 μ l
dNTP mix 10 mM	4 μ l
MgSO ₄ 20 mM	3 μ l
Primer forward 50 μ M	2,5 μ l
Primer reverse 50 μ M	2,5 μ l
Taq DNA polimeraz (5U/ μ l)	0,2 μ l
DNA ekstraktı	2 μ l

DNA amplifikasyonu “thermal cycler” (TaKaRa, Japan) cihazında çalışılmıştır (Resim 3). Amplifikasyonda kullanılan program aşağıda belirtildiği gibi ayarlanmıştır:

94 C’de 4 dakika 1 döngü ardından,

94 °C’ 1 dakika (Denatüreasyon),

55 °C’ de 1 dakika (Bağlanma),

72 °C’de 1 dakika (Uzama)

35 döngü ardından,

72 C’de 10 dakika 1 döngü olarak programlanmıştır.



Resim 3: PCR cihazı

4. Elektroforez

% 1,5'lik agaroz jel hazırlanması için, kullanılacak jel kasetinin büyüklüğüne göre tartılan agaroz 1xTAE tampon içerisinde kaynatılarak çözündürülmüştür. 50 ml olarak hazırlanan jel, sıcaklığı 50-55 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 10-15 dakika bekletildikten sonra içerisine 10 mg/ml konsantrasyondaki etidyum bromürden 20 µl ilave edilmiştir. Jel, düzgün bir zemin üzerinde, kenarları kapatılmış kaset üzerine dökülmüş ve cepleri oluşturacak tarak yerleştirilerek donması beklenmiştir. Jel donduktan sonra tarak jelin yırtılmamasına özen göstererek çıkarılmış ve jel kaseti elektroforez tankına yerleştirilmiştir.

10 µl amplifikasyon ürünü yaklaşık 2 µl yükleme tamponu içerisine karıştırılmış ve 1xTAE tamponu içerisinde, etidyum bromür ile boyanarak % 1,5'lik agaroz jel içerisinde 90 V'da bir saat yürütülmüştür. Elektroforez işlemi sonrasında jel, transilluminatör üzerine alınarak UV ışığı (304 nm) altında değerlendirilmiş ve jel görüntüleme cihazında (Gel Logic 212 Pro Carestream, ABD) görüntülenmiştir. PCR ürününün büyüklüğü Ø174 DNA/BsuRI (HaeIII) Marker, 9 (Thermo Scientific, Litvanya).

G. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatiksel analizler için SPSS 15.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA) programı kullanılmıştır. Verilerin karşılaştırılmasında ki-kare testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık değeri $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

VI. BULGULAR

A. DEMOGRAFİK ÖZELLİKLER:

Çalışmamızda toplam 84 KF hastasından 207'si (% 68) derin boğaz salgısı, 97'si (% 32) balgam örneği ve 1 bronkoalveolar lavaj örneği olmak üzere toplam 305 klinik örnek değerlendirilmiştir. Bu hastaların 51'i (% 61) erkek, 33'ü (% 39) kadın cinsiyettedir. Hastaların yaş ortalaması 11,3 olup en büyük yaş 42, en küçük yaş ise 1 olarak tespit edilmiştir.

B. MSSA, MRSA VE *S. AUREUS* KKV PREVALANSI:

Çalışmaya dahil edilmiş olan 84 KF hastasının 60'ında (% 71,4) metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA), 18'inde (% 21,4) *S. aureus* KKV, 11'inde (% 13) MRSA izole edilmiştir. MSSA izole edilen 60 hastanın 10'unda (% 16,6) KKV tespit edilmiştir. Farklı tarihlerde olmak üzere hastalardan 7'sinde bir defa, yine 7'sinde 2 defa, birinde 3 defa, ikisinde 4 defa, birinde 5 defa *S. aureus* KKV üremesi saptanmıştır. Aynı örnekte ise sadece 4 hastada birden fazla (iki tip) fenotipte *S. aureus* KKV izole edilmiştir. Geri kalan örneklerde bir tip *S. aureus* KKV izole edilmiştir.

MSSA izole edilen 60 hastanın 23'ü (% 38) kadın, 37'si (% 62) erkektir. *S. aureus* KKV izole edilen 18 hastanın 7'si (% 39) kadın, 11'i (% 61) erkektir. MRSA izole edilen 11 hastanın 4'ü (% 36) kadın, 7'si (% 64) erkektir. MSSA, *S. aureus* KKV, MRSA izole edilen hastaların yaş ortalaması (en büyük yaş - en küçük yaş) sırasıyla; 11 (1-42), 15 (4-42), 12 (3-35) olarak tespit edilmiştir. Çalışmaya alınan tüm KF hastalarının yaş ortalaması, *S. aureus* KKV izole edilen hastaların yaş ortalaması ile karşılaştırıldığında, *S. aureus* KKV izole edilen hastaların daha ileri yaşta oldukları belirlenmiştir.

Değerlendirilen 305 klinik örneğin 88'inde (%28,9) MSSA üremesi saptanmıştır. Toplam 18 hastadan 38 *S. aureus* KKV izole edilmiş olan 34 örneğin 16'sı (% 47,1) derin boğaz salgısı, 18'i (%52,9) balgam örneğidir.

KKV ve MRSA suşlarına ait koenfeksiyon oranları farklı fenotipe ve/veya farklı direnç paterninine sahip olan suşlar ayrı üreme olarak değerlendirilerek hesaplanmıştır. Koenfeksiyon yüzdeleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

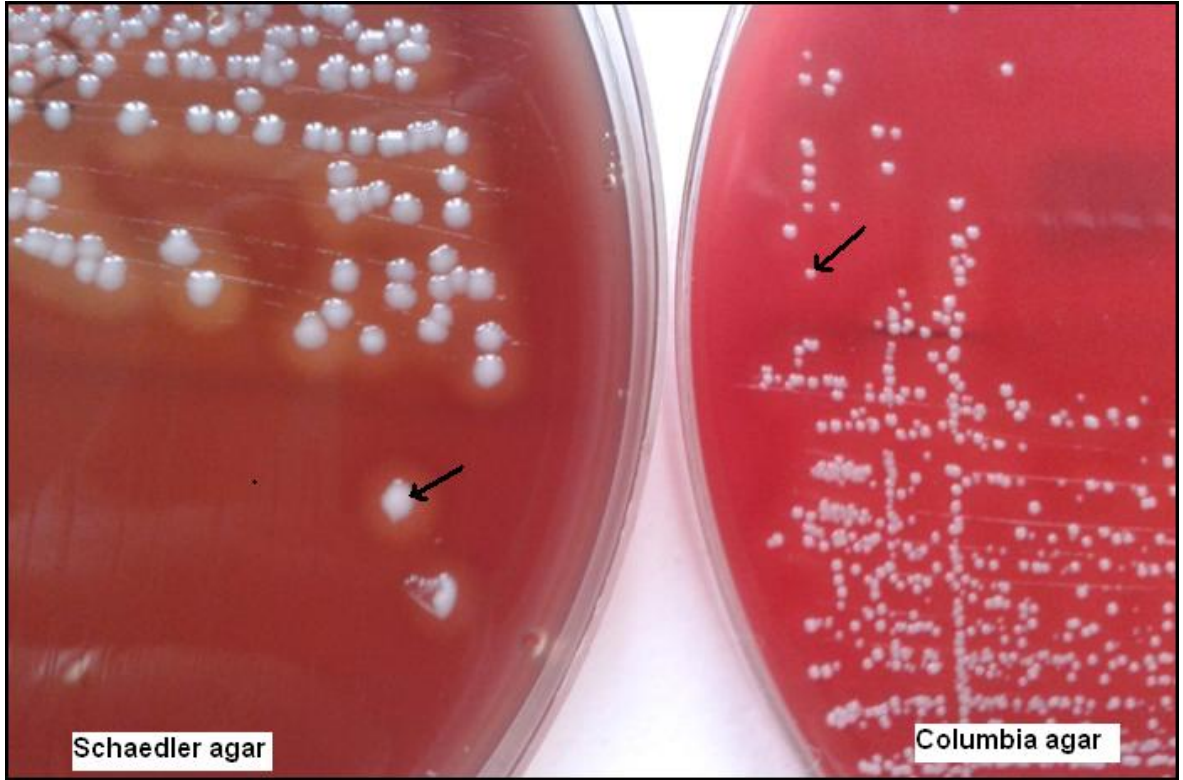
Tablo 1: Klinik örneklerde koenfeksiyon oranları: n (%)

	MSSA ¹	KKV ²	MRSA ³	MPA ⁴	NMPA ⁵	Tek başına üreme ⁶
KKV n: 34	34(%100)	4(%11,8)	2(%5,9)	14(%41,2)	11 (%32,4)	0
MRSA n: 14	6 (%42,9)	2(%14,3)	0	6 (% 42,9)	4 (% 28,6)	3(% 21,4)

1. Metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus*, 2. *Staphylococcus aureus* küçük koloni varyantı, 3. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, 4. Mukoid *Pseudomonas aeruginosa*, 5. Non mukoid *Pseudomonas aeruginosa*, 6. Ek olarak başka mikroorganizma ürememesi

C. S. AUREUS KKV FENOTİPİK ÖZELLİKLERİ

İzole edilen 38 *S. aureus* KKV suşunun 24'ünde (% 63,2) hemoliz, 26'sında (% 68,4) pigment gözlenmemiştir (Resim 4). Hemoliz saptanan 11 (% 28,9) suшта ise dar hemoliz saptanmış olup, KKV testi sonrası Schaedler agarda hemoliz zonunda artış gözlenmiştir. Aynı şekilde pigment saptanan 9 (% 23,7) suшта hafif sarı pigment saptanmış olup, KKV testi sonrası Schaedler agarda koyu sarı pigment oluşumu gözlenmiştir. Koloni büyüklüğü ve tipine ait oranlar Tablo 2'de belirtilmiştir.



Resim 4: *S.aureus* KKV suşunda hemoliz özelliği ve koloni büyüklüğünün normale dönmesi

Tablo 2: *S. aureus* KKV fenotipik özellikleri*

<i>S.aureus</i> KKV	Hemoliz yok	Pigment Yok	Hemoliz artışı	Pigment artışı	Pinpoint koloni	Fried egg koloni	Orta büyüklükte koloni
n: 38	24	26	11	9	18	9	11
% 100	% 63,2	% 68,4	% 28,9	% 23,7	% 47,4	%23,7	% 28,9

*: *S. aureus* KKV Fenotipik Özellikleri 48 saatlik inkübasyon sonrası değerlendirilmiştir.

İzole edilen bütün *S. aureus* KKV suşları Gram boyası ile yapılan mikroskopik incelemesinde farklı büyüklükte küme yapmış pleomorfik Gram pozitif koklar gözlenmiştir. Katalaz testi sonucu tüm *S. aureus* KKV'ları katalaz pozitif olarak saptanmıştır. Tavşan plazması kullanılarak yapılan tüpte koagülaz deneyi sonucunda ise, 38 suşun 36'sı koagülaz pozitif, 2'si koagülaz negatif olduğu gözlenmiştir (Resim

3). Ayrıca DNaz besiyerine ekim yapılmış, 24 saatlik inkübasyon sonrası besiyeri üzerine 1 normal hidroklorik asit (HCL) damlatılıp 2-3 dakika sonra koloniler etrafında şeffaf alan olan suşlar DNaz pozitif olarak değerlendirilmiştir (Resim 4). Sonuç olarak 38 suşun 38'i de DNaz pozitif olarak saptanmıştır.

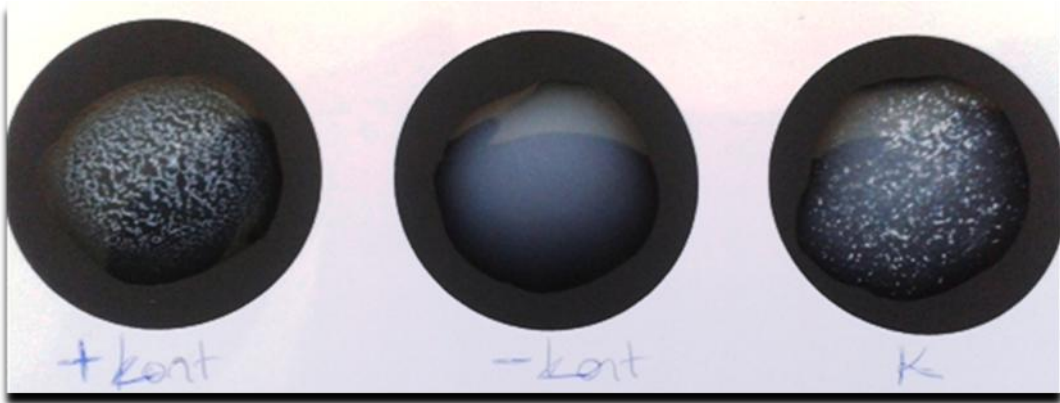


Resim 5: Koagülaz deneyi



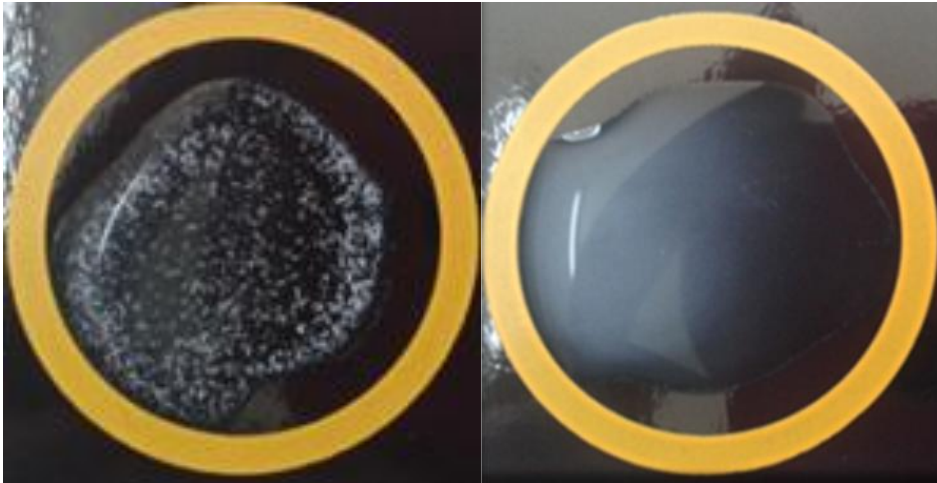
Resim 6: DNaz deneyi

İzole edilen *S. aureus* KKV suşlarının tümü lateks aglutinasyon testi ile pozitif sonuç vermiştir. Testin kontrolünde pozitif (*S. aureus* ATCC 25923) ve negatif kontroller kullanılmıştır (Resim 5). MRSA suşları ise MRSA lateks aglutinasyon kiti (Bio Mérieux, Fransa) ile denenmiş tüm suşlar pozitif sonuç vermiştir. Testin kontrolünde pozitif (MRSA ATCC 43300) ve negatif kontroller kullanılmıştır (Resim 6-7-8).



Resim 7: *S. aureus* KKV suşlarının *S. aureus* lateks kiti ile test edilmesi

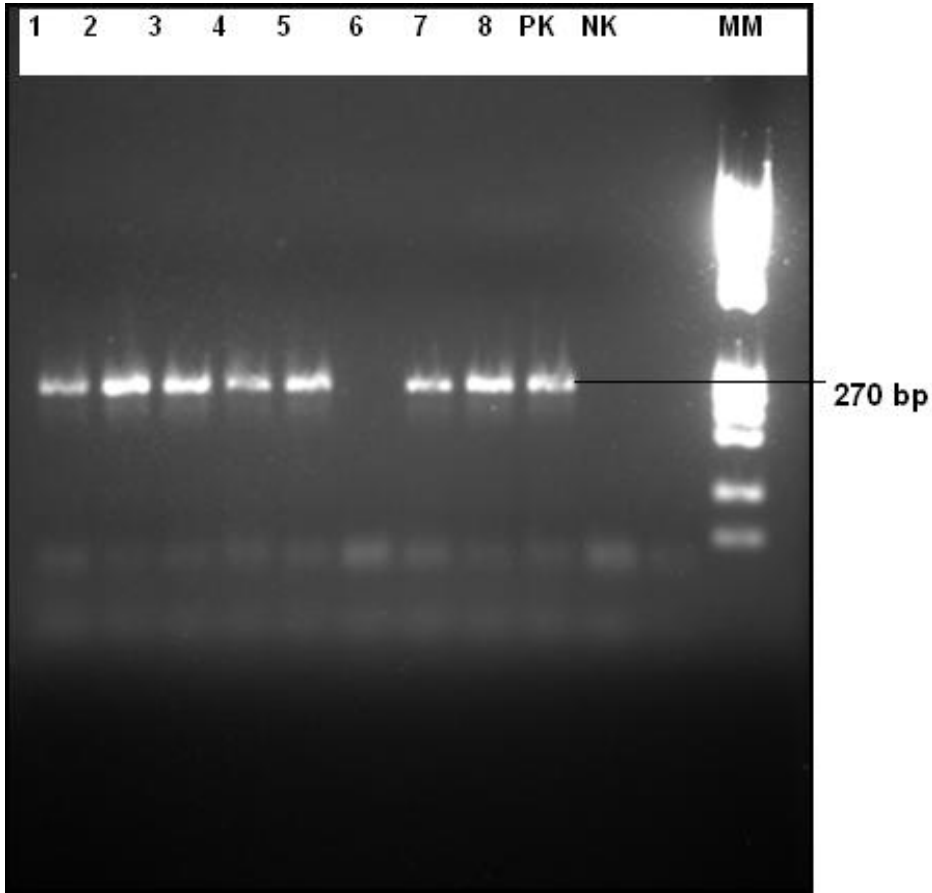
Pozitif kontrol (*S. aureus* ATCC 25923), negatif kontrol (KNS), *S. aureus* KKV suşu



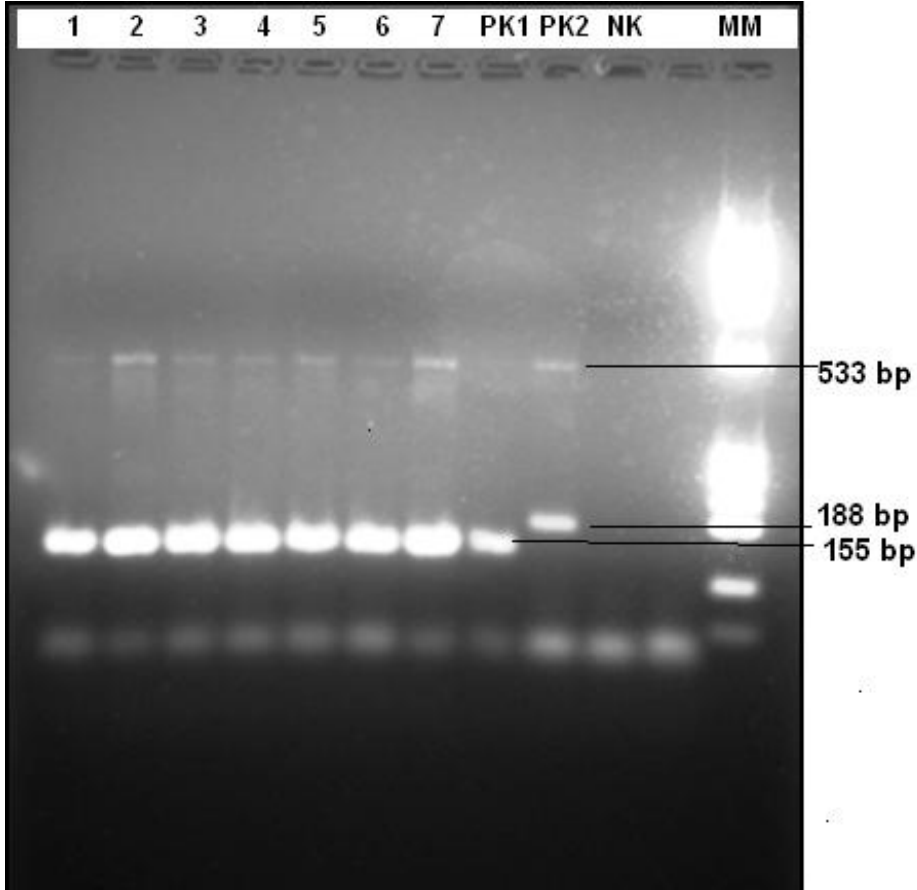
Resim 8: MRSA suşlarının MRSA kiti ile test edilmesi(1. Pozitif sonuç, 2. Negatif sonuç)

D. PCR DENEYİ SONUÇLARI

İzole edilen 38 *S. aureus* KKV ve 14 MRSA suşu olmak üzere toplam 52 suşta PCR ile *S. aureus*’a özgü *nucA* gen bölgesinin varlığı araştırılarak doğrulama testleri yapılmıştır. *S. aureus* KKV ve MRSA suşlarının tamamı *nucA* geni açısından pozitif bulunmuştur. Ayrıca 14 MRSA suşunun *femB*, *mecA* ve *mecC* gen bölgelerini taşıyıp taşımadıkları multipleks PCR deneyi ile tespit edilmiştir. MRSA suşlarının tamamı *femB*, *mecA* geni açısından pozitif bulunmasına karşın suşların hiçbirinde *mecC* geninin olmadığı saptanmıştır. PCR sonrası amplifikasyon ürünleri agaroz jelde yürütülmüş ve görüntüleme cihazı ile görüntülenmiştir (Resim 8 ve 9).



Resim 9: PCR sonrası *nucA* geni amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri. 1-8: suşlara ait bantlar, PK: pozitif kontrol, NK: negatif kontrol, MM: moleküler ağırlık standardı.



Resim 10: Multipleks PCR sonrası *femB*, *mecA* ve *mecC* genlerine ait amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri

1-7: suşlara ait bantlar, PK1: pozitif kontrol (MRSA ATCC 43300), PK2: pozitif kontrol (*mecC* geni taşıyan MRSA suşu) NK: negatif kontrol, MM: moleküler ağırlık standardı.

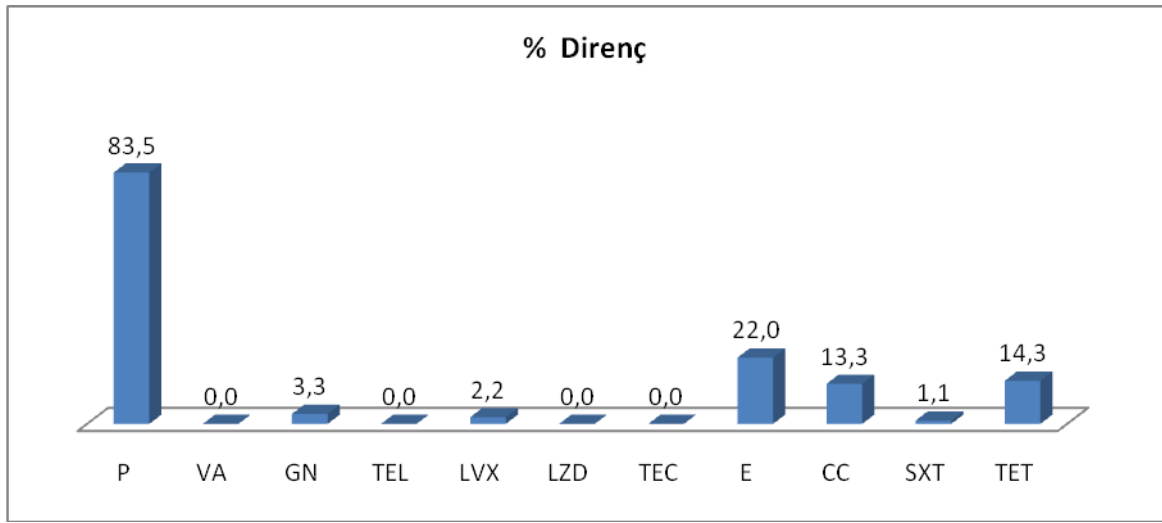
C. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK SONUÇLARI

Çalışmada izole edilmiş olan toplam 91 MSSA, 38 *S. aureus* KKV ve 14 MRSA suşunun antibiyotik duyarlılık sonuçları değerlendirilmiştir. MSSA suşları için CLSI verileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ile belirlenen duyarlılık test sonuçları ile elde edilen direnç yüzdeleri Tablo 3'te gösterilmiştir. Buna göre; MSSA izolatlarının % 83,5'i penisiline, % 22'si eritromisine, % 14,3'ü tetrasikline ve % 13,3'ü klindamisine karşı dirençli bulunmuştur. Vankomisin, teikoplanin, linezolid, telitromisin ve sefoksitine karşı direnç MSSA suşlarında saptanmamıştır.

Tablo 3: MSSA suşlarında disk difüzyon yöntemi ile belirlenen direnç yüzde oranları

MSSA	P	FOX	GN	TEL	VA	TEC	LZD	E	CC	SXT	TET	LVX
Sayı	76	0	3	0	0	0	0	20	12	1	13	2
%	83,5	0	3,3	0	0	0	0	22	13,3	1,1	14,3	2,2

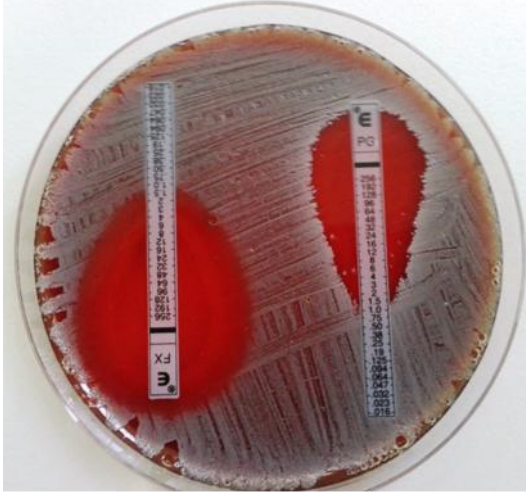
P: Penisilin G, FOX: Sefoksitin, GN: Gentamisin, TEL: Telitromisin, VA: Vankomisin, TEC: Teikoplanin, LZD: Linezolid, E: Eritromisin, CC: Klindamisin, SXT: Trimetoprim-Sulfametoksazol, TET: Tetrasiklin, LVX: Levofloksasin

**Şekil 1:** MSSA suşlarının direnç oranlarının grafiksel görünümü

P: Penisilin G, VA: Vankomisin, GN: Gentamisin, TEL: Telitromisin, LVX: Levofloksasin, LZD: Linezolid, TEC: Teikoplanin, E: Eritromisin, CC: Klindamisin, SXT: Trimetoprim-Sulfametoksazol, TET: Tetrasiklin.

Toplam 38 *S. aureus* KKV izolatlarının antibiyotik hassasiyet testleri, CLSI verileri doğrultusunda, penisilin G, sefoksitin, vankomisin, klindamisin, klaritromisin, tetrasiklin E test ile MİK tespiti ve gentamisin (10 µg), levofloksasin (5 µg), rifampisin (5 µg), trimetoprim-sulfametoksazol (SXT) (1,25 µg-23,75 µg) diskleri disk difüzyon yöntemi kullanılarak yapılmıştır. (Resim 11) Bu testlere ait sonuçlar Tablo 4'te verilmiştir. E test sonuçlarına bakılacak olursa; *S. aureus* KKV suşlarının % 81,6'sı penisiline, % 21,1'i klaritromisine, % 10,5'i tetrasikline ve klindamisine karşı dirençli bulunmuştur. Aynı yöntemle vankomisin ve sefoksitine karşı direnç saptanmamıştır. Disk difüzyon testi sonuçlarına göre ise; % 15,8'i levofloksasine, % 7,9'u rifampisine ve gentamisine, % 5,3'ü ise SXT'ye karşı dirençli olarak tespit edilmiştir. *S. aureus*

KKV suşlarına ait belirlenmiş olan MİK aralıkları, MİK50 ve MİK90 değerleri Tablo 5'te gösterilmiştir.

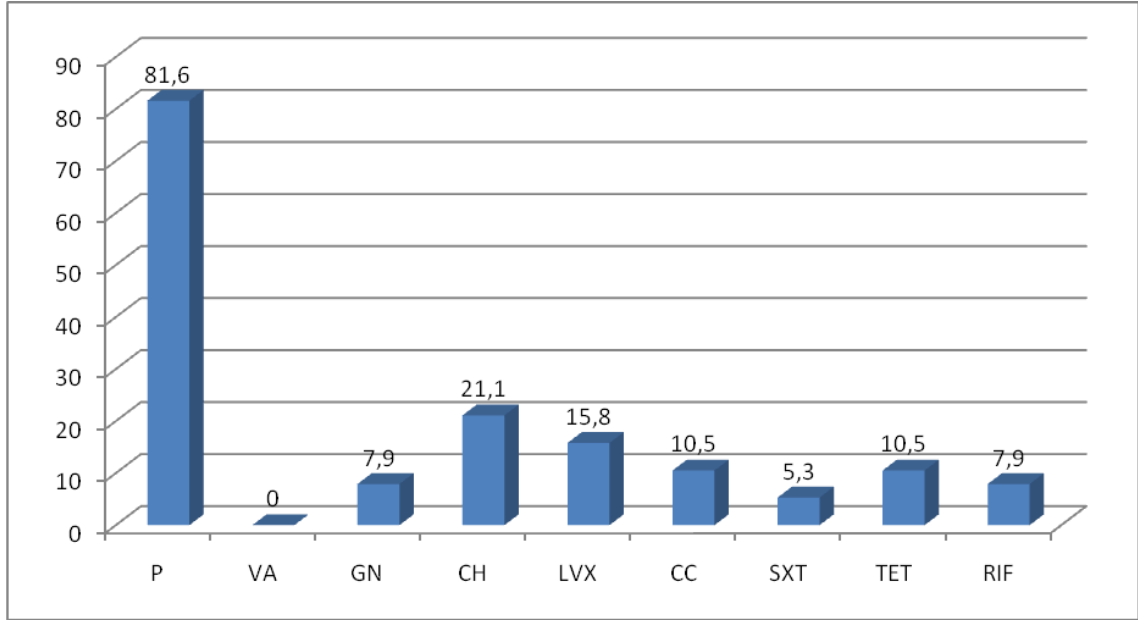


Resim 10: *S. aureus* KKV için koyun kanlı Mueller Hinton besiyerinde penisilin G ve sefoksitin E-test duyarlılık testi

Tablo 4: *S. aureus* KKV direnç yüzde oranları (n: 38)

<i>S.aureus</i> KKV (n: 38)	P*	FOX*	CC*	CH*	TET*	VA*	GN**	RIF**	SXT**	LVX**
Sayı	31	0	4	8	4	0	3	3	2	6
(%)	81,6	0	10,5	21,1	10,5	0	7,9	7,9	5,3	15,8

P: Penisilin G, FOX: Sefoksitin, CC: Klindamisin, CH: Klaritromisin, TET: Tetrasiklin, VA: Vankomisin, GN: Gentamisin, RIF: Rifampisin, SXT: Trimetoprim-Sulfametoksazol, LVX: Levofloksasin, *:E-test yöntemi kullanılmıştır. **: Disk difüzyon yöntemi ile test edilmiştir



Şekil 2: *S. aureus* KKV suşlarının direnç oranlarının grafiksel görünümü (n:38)

P: Penisilin G, FOX: Sefoksitin, CC: Klindamisin, CH: Klaritromisin, TET: Tetrasiklin, VA: Vankomisin, GN: Gentamisin, RIF: Rifampisin, SXT: Trimetoprim-Sulfametoksazol, LVX: Levofloksasin

Tablo 5: *S.aureus* KKV suşlarının MİK değerleri

<i>S. aureus</i> KKV	P	FOX	CC	CH	TET	TGC	VA
MİK aralığı	<0,016-96	1-3	<0,016-256	0,047-256	0,064-64	<0,016-0,19	0,38-1
MİK 50	1,5	2	0,047	0,094	0,25	0,047	0,75
MİK 90	16	2	1	256	24	0,094	1

P: Penisilin G, FOX: Sefoksitin, CC: Klindamisin, CH: Klaritromisin, TET: Tetrasiklin, TGC: Tigesiklin, VA: Vankomisin.

Vankomisin ve sefoksitin duyarlılık sonuçları açısından *S. aureus* KKV ve MSSA suşları birbirine benzer sonuçlar vermiştir. Penisiline karşı hassas ve dirençli suşların dağılımı MSSA suşları ve *S. aureus* KKV’nda benzer oranlarda saptanmıştır. Levofloksasine direnç, MSSA suşlarında düşük oranda (% 2,2) saptanırken; *S. aureus* KKV’nda % 15,8 oranında direnç belirlenmiş ve bu oran istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Tigesiklin için belirlenen MİK değerlerinin tüm *S. aureus* KKV izolatları için <0,016 ile 0,19 µg/ml arasında olduğu ve EUCAST verilerine göre tüm suşların tigesikline duyarlı olduğu bulunmuştur.

Korezistans fenotiplerine bakıldığında *S. aureus* KKV suşlarının 19 (% 50) tanesi sadece penisiline dirençli olarak bulunmuştur. Bir suş penisiline dirençli olmanın yanında klaritromisine karşı orta duyarlı olarak tespit edilmiştir (Tablo 6). Gentamisin dirençli olan üç *S. aureus* KKV suşu aynı zamanda levofloksasine ve rifampisine karşı da dirençli olarak tespit edilmiştir

Tablo 6: *S.aureus* KKV suşlarının korezistans fenotipleri

<i>S. aureus</i> KKV (n: 38)	Korezistans fenotipi
19	P
3	P, CC, CH, TC, GN, LVX, RD
3	P, CH
2	CH
1	P, CC
5	-
2	P, LVX
2	P, SXT
1	P, TET

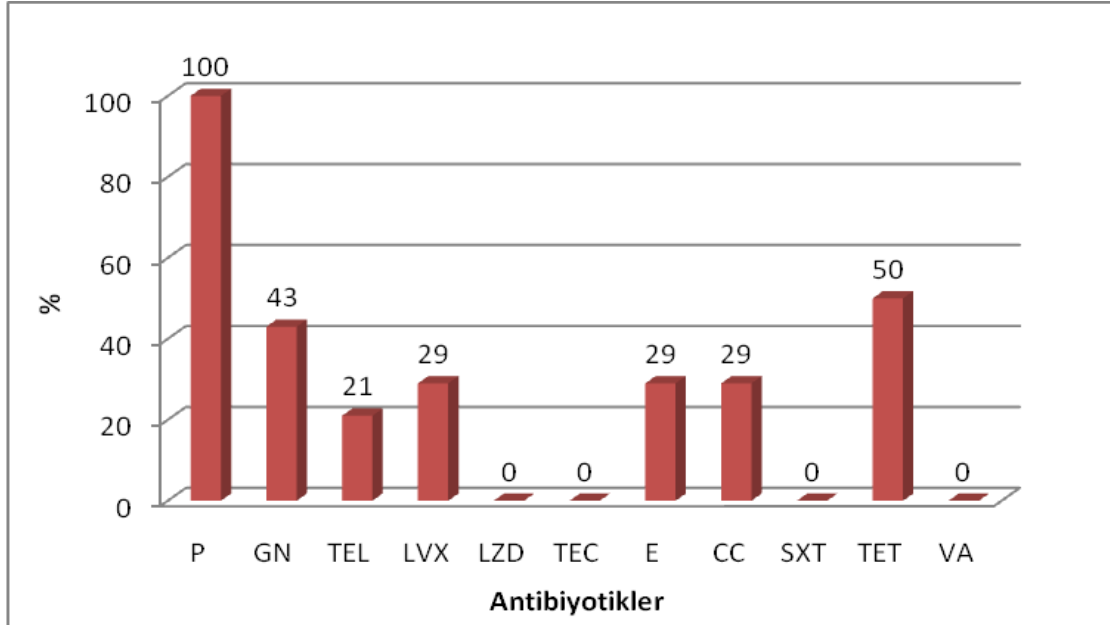
P: Penisilin G, GN: Gentamisin, LVX: Levofloksasin, CC: Klindamisin, SXT: Trimetoprim-Sulfametoksazol, TET: Tetrasiklin.

Çalışmada toplamda 14 adet MRSA izolatına ait antibiyotik duyarlılık deneyleri disk difüzyon yöntemi ile yapılmıştır. Sonuç olarak tüm MRSA suşlarının penisilin ve sefoksitine karşı dirençli olduğu saptanmıştır. Altı suş yukarıdaki dirençli olduğu antibiyotiklere ek olarak gentamisine de dirençli bulunmuştur (% 43). Diğer antibiyotiklere karşı direnç oranları Tablo 8’de gösterilmiştir. Vankomisin, teikoplanin, linezolid ve SXT’e karşı tüm suşlar hassas bulunmuştur. Korezistans fenotipleri değerlendirildiğinde, penisilin ve sefoksitine en sık eşlik eden iki antibiyotik, % 50 yüzde oranı ile tetrasiklin, % 43 ile gentamisin olduğu tespit edilmiştir (Tablo 9).

Tablo 7: MRSA suşlarına ait direnç yüzde oranları (n:14)

MRSA	P	FOX	GN	TEL	VA	TEC	LZD	E	CC	SXT	TET	LVX
Sayı	14	14	6	3	0	0	0	4	4	0	7	4
%	100	100	43	21	0	0	0	29	29	0	50	29

P: Penisilin G, FOX: Sefoksitin, GN: Gentamisin, TEL: Telitromisin, VA: Vankomisin, TEC: Teikoplanin, LZD: Linezolid, E: Eritromisin, CC: Klindamisin, SXT: Trimetoprim-Sulfametoksazol, TET: Tetrasiklin, LVX: Levofloksasin



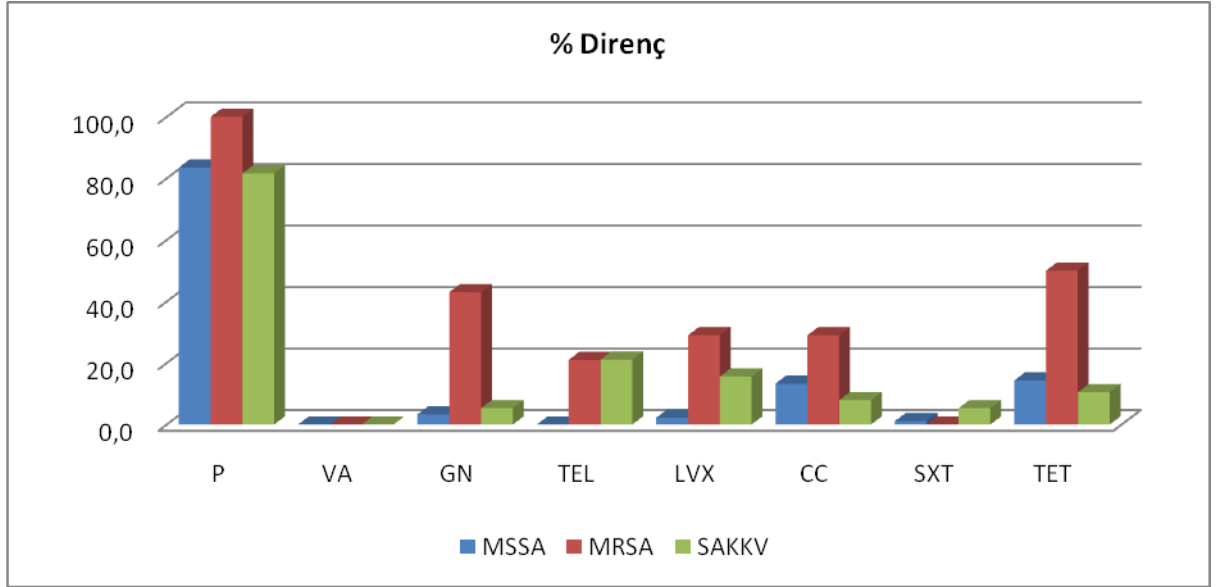
Şekil 3: MRSA suşlarına ait direnç oranlarının grafiksel görünümü (n:14)

P: Penisilin G, GN: Gentamisin, TEL: Telitromisin, LVX: Levofloksasin, LZD: Linezolid, TEC: Teikoplanin, E: Eritromisin, CC: Klindamisin, SXT: Trimetoprim-Sulfametoksazol, TET: Tetrasiklin, VA: Vankomisin.

Tablo 8: MRSA suşlarında korezistans fenotipleri

Suş no	Korezistans
1	P, FOX, GN, LVX
2	P, FOX
3	P, FOX, GN, LVX, TE, E, CC, TEL
4	P, FOX, GN
5	P, FOX
6	P, FOX, TE
7	P, FOX
8	P, FOX, TE, E, CC
9	P, FOX, GN
10	P, FOX
11	P, FOX, TE
12	P, FOX, GN, LVX, TE, E, CC, TEL
13	P, FOX, TE
14	P, FOX, GN, LVX, TE, E, CC, TEL

P: Penisilin G, FOX: Sefoksitin, GN: Gentamisin, TEL: Telitromisin, VA: Vankomisin, TEC: Teikoplanin, LZD: Linezolid, E: Eritromisin, CC: Klindamisin, SXT: Trimetoprim-Sulfametoksazol, TET: Tetrasiklin, LVX: Levofloksasin



Şekil 4: MSSA (n:91), MRSA (n:14) ve *S. aureus* KKV (n:38) suşlarının direnç oranlarının grafiksel görünümü

MSSA: Metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus*, MRSA: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, SAKKV: *Staphylococcus aureus* küçük koloni varyantı P: Penisilin G, VA: Vankomisin, GN: Gentamisin, TEL: Telitromisin (*S. aureus* KKV için klaritromisin denenmiştir), LVX: Levofloksasin, CC: Klindamisin, SXT: Trimetoprim-Sulfametoksazol, TET: Tetrasiklin.

Tablo 9: MSSA, *S. aureus* KKV, MRSA üremeleri

Mikroorganizma	Hasta sayısı	Örnek sayısı	Suş sayısı
MSSA	60	88	91
<i>S. aureus</i> KKV	18	34	38
MRSA	11	14	14

MSSA: Metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus*, MRSA: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* KKV: *Staphylococcus aureus* küçük koloni varyantı

VII. TARTIŞMA

Tüm ekzokrin epitelleri etkileyebilen bir hastalık olan kistik fibroz, epitel hücreleri membranındaki KF Transmembran Regülatör (KFTR) geni tarafından kodlanan klor kanalının defekti sonucunda ortaya çıkmaktadır (91,72). Klor kanalındaki bu defekt, gerekli olan normal anyon akımını engelleyerek su hareketinin yavaşlamasına, bu da dehidratasyon sonucu mukusun yoğunlaşmasına ve duktuslarda obstrüksiyona yol açar. Mukusun yoğun visköz yapıda olması ve buna bağlı bronşiyal obstrüksiyon sonucunda solunum yollarındaki mikroorganizmalar temizlenememekte, kronik kolonizasyon ve enfeksiyon gelişmektedir (24).

KF hastalarının solunum yolu enfeksiyonlarında çocuklarda en sık *S. aureus* ve *Haemophilus influenzae*, daha ileriki yaşlarda ise *P. aeruginosa* izole edilmektedir. Bunların dışında; *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Legionella pneumophila*, mikoplazma gibi bakteriler, virüsler ve *Aspergillus fumigatus* sık olmak üzere mantarlar türleri de KF hastalarının solunum yollarından enfeksiyon etkeni olarak saptanabilmektedir (20). Son yıllarda tıbbi tanı tekniklerindeki gelişmelere bağlı olarak KF hastalarının solunum yollarından izole edilen bakterilerin çeşitliliğinde de artışlar gözlenmektedir. Bu etkenler arasında *Burkholderia cepacia complex*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Pandorea* cinsinden ve *Ralstoniae* cinsinden bakteriler yer almaktadır (86,31).

KF’te en sık tutulan organ akciğer olup solunum yolu enfeksiyonları, KF olgularında morbidite ve mortaliteden en sık sorumlu olan klinik durum olarak kabul edilmektedir (33,89). Solunum yollarında kolonizasyona ve enfeksiyona en sık yol açan mikroorganizmaların başında ise *S. aureus* gelmektedir (52,33). KF olgularından izole edilen *S. aureus* suşlarının bir diğer özelliği de; küçük koloni varyantlarının varlığıdır (50,69). Koloni morfolojilerindeki birtakım farklılıklar nedeniyle laboratuvar değerlendirmelerinde normal flora üyesi zannedilerek, rahatlıkla gözden kaçabilmektedirler (69). Aynı zamanda antimikrobiyal direnç paterni açısından da tedavide zorluklarla karşılaşmaktadır. *S. aureus* prevalansının incelendiği bir çalışmada KF hastalarının % 70’inden fazlasının solunum yolu örneklerinde normal *S. aureus* ve/veya KKV formlarının varlığı gösterilmiştir (44).

KF hastalarının örnekleri ile yapılan çeşitli çalışmalarda değişen oranlarda *S. aureus* prevalansları bildirilmiştir. Vilma Almeida ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada; KF hastalarında en sık üreyen patojenlerin başında % 35 oranla *S.*

aureus'un geldiğini vurgulamışlardır (6). Bizim çalışmamızda ise 305 klinik örneğin 88'inde (% 28,9) MSSA üremesi saptanmıştır. Daha önce 2007-2012 yılları arasında kistik fibroz tanısı almış olan hastaların solunum yolu örneklerinden izole edilen bakteriler ve antibiyotik duyarlılıklarının retrospektif olarak incelendiği bir başka çalışmamızda, KF tanılı 106 hastanın 1009 örneği incelenmiş ve 252 (% 25)'sinde MSSA üremesi saptanmıştır (58).

KF hastalarının klinik örneklerinden izole edilen suşlarla yapılan çeşitli çalışmalarda *S. aureus* KKV prevalansları değişen oranlarda bildirilmiştir. Polonya'da yapılan bir çalışmada Sadowska B ve arkadaşları 1,5 -19 yaş arasındaki KF hastalarının *S. aureus* üreyen 63 solunum yolu örneğinin 20'sinde (% 31,7) *S. aureus* KKV ürediğini saptamışlardır (73). Wolter ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise % 88'inde normal *S. aureus* izole edilen 100 KF hastasının %24'ünde *S. aureus* KKV saptanmıştır (104). Almanya'da 1998 yılında Kahl ve arkadaşlarının 78 KF hastasının bronş sekresyonu ve boğaz sürüntü örneği ile yaptığı bir çalışmada, *S. aureus* taşıyıcılarında KKV prevalansını % 49,1 olarak belirlenmiştir (39). Yine Almanya'da 2007 yılında Besier ve arkadaşlarının 252 KF hastasının balgam ve derin boğaz sürüntü örneklerini inceledikleri çalışmada, 120 hastanın *S. aureus* ile kolonize/infekte olduğu; bunların da 20 (% 17)'sinde KKV olduğu saptanmıştır (7). Sözü edilen araştırmalardaki yüksek prevalans değerinin çalışmanın yapıldığı popülasyonlardaki SXT kullanımının yüksek olmasına bağlı olabileceği belirtilmiştir. Çalışmamızda ise *S. aureus* üreyen hastalardaki *S. aureus* KKV prevalans değeri % 27 (18/67) bulunmuştur.

Türkiye'de Yağcı ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, KF hastalarının solunum yolu örneklerinde *S. aureus* KKV prevalansı % 6,4 olarak saptanmıştır (105). Bizim çalışmamızda ise 84 KF hastasının 18 (% 21,4)'inde, yine bu hastalardan elde edilen toplam 305 klinik örneğin 34'ünde (% 11,1) *S. aureus* KKV izole edilmiştir. . Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz prevalans oranının ülkemizde yapılan yukarıdaki çalışmadaki prevalans oranından yüksek olması, KF hastalarındaki *S. aureus* KKV infeksiyon ve/veya kolonizasyonunun giderek arttığını ve ileriki yıllarda bu fenotipten daha sık bahsedilir olacağının bir göstergesi olabilir.

Çalışmamızda toplam 207 derin boğaz salgısı, 97 balgam örneği incelenmiştir. İncelenen örnekler arasında derin boğaz salgısı daha fazla (% 68) olmasına rağmen, *S. aureus* KKV izolasyonu balgam örneklerinde % 53 (n= 18); derin boğaz salgısı örneklerinde ise % 47 (n= 16) oranında saptanmıştır. KF hastalarının genelde 8

yaşından küçük olmaları sonucu balgam çıkaramamaları nedeniyle derin boğaz salgısı örneklerinin sayısı balgam örneklerine kıyasla daha fazla olması beklenen bir durumdur. Ancak kaliteli bir balgam örneğinin etken mikroorganizmaları yakalayabilmek için derin boğaz salgısı örneklerinden daha değerli olduğu; hasta balgam çıkartabiliyorsa derin boğaz salgısına tercih edilmesi gerektiği unutulmamalıdır (103).

Çalışmamıza dahil edilen hastaların cinsiyet dağılımı incelendiğinde erkek yönünde baskın olduğu görülmektedir (erkek % 61; kadın % 39). Hastaların yaşları 1 – 42 (Ortalama: 11.3) arasında değişmektedir. *S. aureus* KKV saptanan hastaların yaşları ise 4 – 42 (Ortalama: 15) arasındadır. Schneider ve arkadaşları 2008 yılında yaptıkları bir çalışmada *S. aureus* KKV saptanan hastaların anlamlı bir şekilde daha büyük yaşlarda oldukları saptanmıştır.(>18 yaş için $p<0,05$) (79). 2007 yılında Vergison ve arkadaşlarının 627 KF hastasında yaptıkları benzer bir çalışmada ise *S. aureus* KKV saptanan hastaların yaş ortalamasının 21 olduğu ($P= 0.001$) bildirilmişlerdir (96). *S. aureus* KKV'nın daha ileriki yıllarda daha sık saptanıyor olması; KF hastalarının yıllar içinde giderek artan oranda antibiyotik tedavisi alıyor olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (7). Kahl ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada antifolat ya da aminoglikozid kullanımının *S. aureus* KKV izolasyon oranlarının artmasına neden olduğunu bildirmişlerdir (39). Bizim çalışmamızda da *S. aureus* KKV saptanan hastaların yaş ortalamasının genel yaş ortalamasına kıyasla daha yüksek bulunmuş olması bu verilerle benzerlik göstermektedir. Buna karşın bu sonucu desteklemeyen araştırma sonuçları da mevcuttur. Örneğin Wolter ve arkadaşlarının 100 KF hastasını inceledikleri bir çalışmada, KKV izole edilen ve edilmeyen grubun yaşlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (104).

S. aureus KKV Chapman/Mannitol salt agar, Colombia koyun kanlı agar, kromojenik *S. aureus* agar gibi farklı besiyerleri kullanılabilir. Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda Chapman ve Colombia koyun kanlı agar ile iyi sonuç alınabildiği bildirilmektedir (96,105). Toplam 106 suşun dahil edildiği Kipp ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ise klinik örneklerin Columbia kanlı agara ve kromojenik SAID agara ekilmesinin hızlı ve doğru bir yöntem olduğu bildirilmiştir (43).

S. aureus izolasyonunda kullanılan Chapman besiyerinde üreyen *S.aureus* suşları mannitolu fermente ederek sarı renkli koloniler oluşturmaktadırlar. *S. aureus* KKV suşları ise mannitolu her zaman fermente etmedikleri için pembe renkli koloniler

oluşturabileceği ve bu yönden kültürlerin dikkatle incelenmesi gerektiği bildirilmektedir (67). *S. aureus* KKV mannitolü fermente etmemelerine rağmen, *S. aureus* KKV'nin bir özelliği olan nokta şeklindeki (pinpoint) kolonilerin normal boyutlardaki *S. aureus* kolonilerinin yanında görülmesi uyarıcı bir bulgu olmalıdır. KKV'nin pinpoint koloniler dışında biraz daha büyük koloniler oluşturabileceği de akılda tutulmalıdır. Bunun yanı sıra özellikle Columbia kanlı agarda izlenebilen, timidin-bağımlı KKV'nin ortasında küçük kabarık pigmentli alan etrafında yarı şeffaf kenarları ile 'sahanda yumurta' görünümüne benzeyen koloni şekli de mevcuttur (40). Çalışmamızda izole edilen 38 adet *S. aureus* KKV'nin 11'inin (% 28,9) küçük koloniler, 9'unun (% 23,7) "sahanda yumurta", 18'inin (% 47,4) ise nokta şeklinde koloni oluşturduğu gözlenmiştir.

Koloni şekil ve büyüklüğünün yanı sıra üreme hızı, hemoliz, pigment özellikleri değerlendirildiğinde, yapılan diğer çalışmalara benzer şekilde çalışmamızda da normal *S. aureus* fenotipine göre *S. aureus* KKV'lerinin daha yavaş ürettiği, hemoliz oluşumu ve pigment üretiminin azalmış olduğu saptanmıştır (7). Çalışmamızda *S. aureus* KKV'nin 24'ünün (% 63,2) hemoliz yapmadığı saptanmıştır. Hemoliz oluşturan 11 (% 28,9) *S. aureus* KKV suşunun da KKV testi sonrası hemoliz zonunda artış olduğu belirlenmiştir. *S. aureus* KKV'nin çoğunun (% 68,4) pigment oluşturmadığı, oluşturanların da (% 23,7) hafif sarı pigmentli oldukları ve *S. aureus* KKV testi sonrası pigmentlerinde koyulaşma olduğu saptanmıştır.

Koagülaz deneyi konusunda bazı araştırmacılar tarafından çoğu *S. aureus* KKV suşunun >18 saat inkübasyon sonrasında tüp koagülaz testinin pozitifleştiği (67,100) belirtilse de başka bir araştırmacı *S. aureus* KKV suşlarının bazılarının yanlış negatif koagülaz test sonucu verebileceği; bu tür suşlarda *nuc* ve *coa* gibi türe özgü genlerin varlığının araştırılması gerektiği vurgulanmaktadır (6). Çalışmamızda 38 KKV suşu ile genel olarak rehberlerde önerildiği gibi tavşan plazması kullanılarak koagülaz deneyi yapılmış suşların 36 (% 94,7)'sinin pozitif olduğu saptanmıştır. Yağcı ve arkadaşları araştırmalarında koagülaz deneyi için insan plazması kullanarak test ettikleri 48 *S. aureus* KKV suşunun altısını koagülaz negatif olarak saptamışlardır. Araştırmada negatif sonuçların nedeninin insan plazması kullanımı olabileceği belirtilmektedir (105). Çalışmamıza dahil edilen *S. aureus* KKV'lerinin koagülaz deneyi sonrasında lateks agglütinasyonu ve PCR yöntemi ile *nucA* geni saptanarak *S. aureus* oldukları doğrulanmıştır.

MSSA suşlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları değerlendirildiğinde, toplam 91 MSSA suşunun penisiline yüksek oranda direnç gösterdiği saptanmış (% 83,5) bu sırasıyla eritromisin (% 22), tetrasiklin (% 14,3) ve klindamisin (% 13,3) takip etmiştir. MSSA suşlarında vankomisin, teikoplanin, linezolid ve telitromisine direnç saptanmamıştır. Daha önce yaptığımız ve MSSA suşlarının retrospektif antibiyotik direnç oranlarını incelediğimiz çalışmamızda, penisiline % 84, eritromisine % 28, tetrasikline % 13 ve klindamisine % 19 oranında direnç gözlenmiştir (58). Bu sonuçlar mevcut çalışmamızla karşılaştırıldığında penisilin ve tetrasiklin direnç oranları yaklaşık aynı oranlarda iken, eritromisin ve klindamisin direnç oranlarında düşüş saptanmıştır.

S. aureus KKV suşları ile ilgili henüz rehberlere girmiş standart bir antibiyotik duyarlılık testi bulunmamaktadır. Literatür genel olarak değerlendirildiğinde disk difüzyon dahil bir çok metodun denendiği görülmektedir. Bununla birlikte sıvı dilüsyon veya E- test gibi yöntemlerle MİK tespitinin daha doğru olabileceği bildirilmektedir (7,8). Çalışmamızda da imkanlar dahilinde E test yöntemi kullanılmış, bazı antibiyotikler için de disk difüzyon yöntemi tercih edilmiştir. Bu çerçevede *S. aureus* KKV suşlarının E-test ile yapılan antibiyotik duyarlılık sonuçları değerlendirildiğinde; *S. aureus* KKV suşlarının % 81,6'si penisiline, % 21,1'i klaritromisine, % 10,5'si tetrasikline ve % 7,9'u klindamisine % 15,8'i levofloksasine, % 7,9'u rifampisine, % 5,3'si gentamisine ve SXT'ye dirençli olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda *S. aureus* KKV suşlarında vankomisin ve sefoksitin direnci (MRSA KKV) saptanmamış, direnç oranları MSSA suşlarınıninkiyle karşılaştırıldığında, MSSA suşlarının gentamisine (% 3.3) ve SXT'e (% 1.1) daha duyarlı olduğu gözlenmektedir. Levofloksasine direnç, MSSA suşlarında düşük oranda (% 2,2) saptanırken; *S. aureus* KKV'nda % 15,8 oranında direnç belirlenmiş ve bu oran istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Besier ve arkadaşları da 252 KF hastasından suşları ile yaptıkları çalışmalarında bizim bulgularımıza benzer şekilde *S. aureus* KKV suşlarının gentamisin, SXT ve siprofloksasine, normal fenotipteki *S. aureus* suşlarından daha dirençli oldukları saptamışlardır (7).

Tigesiklin için belirlenen MİK değerlerinin tüm *S. aureus* KKV suşlarında <0,016 ile 0,19 µg/ml arasında olduğu ve EUCAST verilerine göre tüm suşların tigesikline duyarlı olduğu bulunmuştur. Yağcı ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada tigesiklin için belirlenen MİK değerleri tüm normal *S. aureus* suşlarında 0,5 µg/ml'nin altında saptanırken, 48 *S. aureus* KKV'ndan 6 tanesinde MİK değeri 1 µg/ml'den

yüksek olarak belirlenmiş ve aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (105). Yeni geliştirilmiş bir antibiyotik olan tigesiklin duyarlılığının *S. aureus* KKV'nda ilk kez değerlendirildiği Yağcı ve arkadaşlarının çalışmasında bu antibiyotik için MİK değerlerinin normal fenotipteki *S. aureus* suşlarına göre daha yüksek çıkması bu suşların tigesikline daha dirençli olduğunu destekleyen yeni ve önemli bir bulgu olarak değerlendirilmiştir. Yağcı ve arkadaşlarının bulguları ile karşılaştırıldığında çalışmamızda *S. aureus* KKV için tigesiklin için MİK değerleri genel olarak daha düşük bulunmuş, en yüksek değerin 0,19 µg/ml olduğu saptanmıştır.

Aminoglikozid grubu antibiyotiklere karşı direnç gelişimi, elektron transportundaki eksiklikler sonucunda, *S. aureus* KKV'nda hücre zarının elektrik gradientinin azalarak antibiyotiklerin hücre içine girişinin engellenmesi mekanizmasına dayanmaktadır. Buna karşın bazı *S. aureus* KKV suşlarının bu antibiyotiklere karşı hassas olabileceği belirtilmektedir (100). Yapılan bazı çalışmalara göre aminoglikozid direnç oranları %6,3(105), %9 (96) arasında değişmektedir. Bizim araştırmamızda da gentamisin direnci % 5,26 oranında saptanmıştır.

Günümüzde de *S. aureus* sıklıkla KF olgularında solunum yolu örneklerinden ilk izole edilen patojen olmasının yanında nazofarengeal taşıyıcılığın KF hastalarında daha yüksek olduğu bilinmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda; MRSA suşları ile kolonizasyon ve infeksiyon oranının tüm popülasyonlarda arttığı gibi KF popülasyonunda da artış gösterdiği bildirilmektedir (32,18). MRSA suşları, birçok antibiyotiğe direnç gösterebilen mikroorganizmalardır. Hastane kaynaklı infeksiyonların önemli bir etkeni olan MRSA bakterisinin, son yıllarda toplum kökenli infeksiyonlara da neden olduğu bilinmektedir (11).

MRSA'nın klinik örneklerden izolasyonunu kolaylaştıran ve hızlandıran çeşitli kromojenik besiyerleri kullanılmaktadır. Seçici kromojenik besiyeri kullanılarak hem normal flora elemanlarının ürememesi hem de MSSA ile birlikte üreyebilen MRSA kolonilerinin açığa çıkması sağlanmaktadır. Yapılan çalışmalarda MRSA kromojenik agar besiyerlerinin genel olarak duyarlılık ve özgüllük oranlarının yüksek olduğu, bazı çalışmalarda ise özgüllükle ilgili problemler olduğu belirtilmektedir. 2012 yılında Perez ve arkadaşları MRSA izolasyonunda kromojenik seçici bir besiyeri olan MRSA ID (BioMerieux, Fransa) ile konvansiyonel yöntemleri karşılaştırmışlardır. Araştırmada konvansiyonel yöntem olarak örnekler % 5 koyun kanlı agar ve MSA besiyerlerine ekilmiş, şüpheli kolonilerden koagülaz ve disk difüzyon metodu ile sefoksitin duyarlılık

deneyleri yapılmıştır. 130 KF hastasından alınan 179 klinik örnek (128 balgam, 51 orofarengeal sürüntü) incelenmiştir. Sonuç olarak; MRSA ID besiyeri ile 54 MRSA suşu saptanmasına karşın konvansiyonel yöntemlerle bunun sadece 24 (% 44) tanesi saptanabilmiştir. Bunun yanı sıra MRSA ID besiyerinde 6 tane MSSA üremesi saptanmıştır. Yazar MRSA ID besiyerinin duyarlılığın yüksek ancak yanlış pozitifliklerden dolayı özgüllüğünde düşüklük olduğunu belirtmektedir (63). Bizim çalışmamızda da kromojenik seçici bir besiyeri olan CHROMagar MRSA (Becton Dickinson and Company, ABD) kullanılmıştır. Çalışmamızda 84 hastanın incelenen toplam 305 solunum yolu örneğinde; 14 (% 4,6) tane MRSA izole edilmiştir. Dünya genelinde yapılan çalışmalarda MRSA prevalansı değişen oranlarda bildirilmiştir. Almanya'da yapılmış bir çalışmada da bizim sonuçlarımızla benzer şekilde olup % 5 oranında bildirilmekle birlikte (102) Belçika'da %15,2 oranında bildirilmiştir (94).

Ülkemizde MRSA izolasyonunda çeşitli kromojenik agarları ve konvansiyonel yöntemleri karşılaştıran çalışmalar yayınlanmıştır. 2013 yılında Uzun ve ark. yaptığı bir çalışmada, stafilokoklarda metisilin direncinin belirlenmesinde *mecA* gen analizi çift primerli jel tabanlı multipleks PCR (Seeplex, Kore), sefoksitin disk difüzyon testi (30 µg, Oxoid, İngiltere), otomatize sistem (Phoenix 100, Becton Dickinson and Company, ABD) ve kromojenik CHROMagar MRSA besiyerinin (Salubris, Türkiye) performansları karşılaştırılmıştır. *mecA* geni varlığı altın standart olarak alındığında kromojenik agar kullanımının 24 ve 48. saatlerdeki duyarlılık ve özgüllükleri sırasıyla, % 91,7-% 89,5; % 96,7-% 81,6 olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada sefoksitin disk difüzyon testi ve otomatize sistemin duyarlılık ve özgüllükleri sırasıyla, % 98,3-% 100; % 100-% 97,4 olarak saptanmıştır (93).

Kromojenik agarların iki farklı firmaya ait olan türleri arasında yapılan karşılaştırmalı bir çalışmada ise Cesur ve arkadaşları MRSA suşlarının tanımlanmasında kullanılan ticari besiyerlerinden oksasilin direnci tarama agar (Oxacillin Resistance Screening Agar Base; ORSAB; Oxoid, İngiltere) ve kromojenik MRSA agar (BBL CHROMagar MRSA; BD, Fransa) besiyerlerinin özgüllük, duyarlılık araştırmışlardır. Çalışmaya Mueller-Hinton agar besiyerinde oksasilin ve sefoksitin diskleri kullanılarak disk difüzyon yöntemiyle metisilin duyarlılığı belirlenen 45 MRSA ile 130 MSSA suşu olmak üzere toplam 175 suş dahil edilmiştir. Besiyerlerinin duyarlılık, özgüllükleri, oksasilin disk difüzyon yöntemi referans alınarak hesaplanmış ve bu değerler ORSAB için sırasıyla % 97,7, % 40; CHROMagar MRSA için ise sırasıyla % 95,5, % 37,6

olarak saptanmıştır. Sonuç olarak çalışmada; kromojenik besiyerlerinin, personel sayısının az ve çalışma yükünün ağır olduğu laboratuvarlarda tarama amaçlı olarak birlikte ya da ek bir besiyeri ile (ör. MSA) beraber kullanılabileceği; ancak özgüllüğün düşük olması nedeniyle, yalancı pozitiflik ihtimaline karşı pozitif saptanan suşların diğer yöntemlerle (ör. disk difüzyon) doğrulanması gerektiği kanaatine ulaşılmıştır (12).

Çalışmada toplamda 14 adet MRSA izolatına ait antibiyotik duyarlılık deneyleri yapılmış; sonuçta tüm MRSA suşlarının penisilin ve sefoksitine karşı dirençli olduğu saptanmıştır. Altı suş yukarıdaki dirençli olduğu antibiyotiklere ek olarak gentamisine de dirençli bulunmuştur (% 43). Vankomisin, teikoplanin, linezolid ve SXT'ye direnç saptanmamıştır. Korezistans fenotipleri değerlendirildiğinde, penisilin ve sefoksitine en sık eşlik eden iki antibiyotiğin tetrasiklin (% 50) ve gentamisin (% 43) olduğu belirlenmiştir. Moore ve arkadaşlarının 2008 yılında KF hastalarından izole edilen suşlarda klindamisin direncini MSSA suşlarında % 10 (25/254), MRSA suşlarında ise % 40 (57/143) oranında saptamışlardır (55). Bizim çalışmamızda ise MSSA ve MRSA suşlarında klindamisin direnci sırasıyla % 13,3 ve % 29 olarak belirlenmiştir.

Daha önce yaptığımız ve KF hastalardan izole edilen suşlarda retrospektif olarak antibiyotik direnç oranlarını incelediğimiz çalışmamızda, toplam 11 MRSA izolatının 5'i tetrasikline, 4'ü levofloksasine, 4'ü eritromisine, 3'ü klindamisine, 2'si gentamisine ve 1 tanesi SXT'ye dirençli olarak tespit edilmiştir (57). Bu çalışmamızda ise; izole ettiğimiz 14 MRSA suşunun 7'si tetrasikline, 4'ü levofloksasine, 4'ü eritromisine, 4'ü klindamisine, 6 tanesi de gentamisine dirençli bulunmuş, SXT'le ise direnç saptanmamıştır.

Sonuç olarak; çalışmamızda İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi'nde takip edilen KF hastalarımızdaki *S. aureus* KKV ve MRSA sıklığı ve antibiyotik duyarlılıkları belirlenmiştir. *S. aureus* KKV, normal *S. aureus* suşlarına kıyasla gösterdikleri birtakım farklılıklar nedeniyle laboratuvar değerlendirmelerinde normal flora üyesi zannedilerek, rahatlıkla gözden kaçabilmektedirler. Bu fenotipin normal *S. aureus* suşlarına göre daha dirençli olabilmesi, hücre içi yaşama gibi çeşitli özelliklerinden dolayı daha kolay ve uzun süreli enfeksiyona neden olabilmesi gibi açılardan klinik pratikte zorluklara neden olabilmektedir. Bunun yanı sıra MRSA suşlarının da birçok antibiyotiğe direnç gösterebilen mikroorganizmalar oldukları göz önünde bulundurularak *S. aureus* KKV ve MRSA ile enfekte veya kolonize hastaların belirlenmesi enfeksiyonun gerek KF hastaları arasında gerekse toplumun diğer bireyleri arasında yayılmasını önleme

açısından büyük önem taşımaktadır (46). Dolayısıyla mikrobiyoloji laboratuvarlarında KF hastalarının solunum yolu örneklerinin bu açıdan dikkatle incelenmesi önemlidir.

VIII. KAYNAKLAR

1. Acar JF, Goldstein FW, Lagrange P. Human infections caused by thiamine- or menadione-requiring *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 1978; 8: 142-7
2. Andersen DH, Hodges RG. Celiac syndrome; genetics of cystic fibrosis of the pancreas, with a consideration of etiology. Am J Dis Child. 1946; 72: 62-80.
3. Baldwin JE, Krebs H. The evolution of metabolic cycles. Nature. 1981; 291: 381-2.
4. Balwit JM, van Langevelde P, Vann JM, Proctor RA. Gentamicin resistant menadione and hemin auxotrophic *Staphylococcus aureus* persist within cultured endothelial cells. J Infect Dis. 1994; 170: 1033-7.
5. Bayston R, Ashraf W, Smith T. Triclosan resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressed as small-colony variants: a novel mode of evasion of susceptibility to antiseptics. J Antimicrob Chemother 2007; 59: 848-53
6. Becker K, Harmsen D, Mellmann A, Meier C, Schumann P, Peters G, et al. Development and evaluation of a qualitycontrolled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. J Clin Microbiol. 2004; 42: 4988-95.
7. Besier S, Smaczny C, Mallinckrodt CV, Krahle A, Ackermann H, Brade V, et al. Prevalence and Clinical Significance of *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants in Cystic Fibrosis Lung Disease. J Clin Microbiol. 2007; 168–172
8. Besier S, Zander J, Siegel E, Saum SH, Hunfeld KP, Ehrhart A, et al. Thymidine-Dependent *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants: Human Pathogens That Are Relevant Not Only in Cases of Cystic Fibrosis Lung Disease. J Clin Microbiol. 2008; 3829-3832.
9. Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. J Clin Microbiol. 1992; 30: 1654-60.

- 10.Branger C, Fournier JM, Loulergue J, Bouvet A, Goullet P, Boutonnier A et al. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. Epidemiol Infect 1994; 112: 489-500.
- 11.Brown DF, Edwards DI, Hawkey PM, Morrison D, Ridgway GL, Towner KJ, et al. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). J Antimicrob Chemother 2005; 56: 1000-18.
- 12.Cesur S, Yıldız E, Irmak H, Aygün Z, Karakoç E, Kınıklı S, et al. Evaluation of oxacillin resistance screening agar and chromogenic MRSA agar media for the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* clinical isolates. Mikrobiyol Bul 2010; 44: 279-284
- 13.Chatterjee I, Kriegeskorte A, Fischer A, Deiwick S, Theimann N, Proctor RA, et al. In vivo mutations of thymidylate synthase are responsible for thymidine dependency in clinical small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 2008; 190: 834-42
- 14.Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 21. Informational Supplement M100-S21. Wayne, PA. 2011
- 15.Collins M, Jones, D. Distribution of isoprenoid quinone structure types in bacteria and their taxonomic implications. Microbiol Rev. 1981; 45: 316-54.
- 16.D'Agata EM, Webb GF, Horn MA, Moellering Jr RC, Ruan S. Modeling the invasion of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* into hospitals. Clin Infect Dis 2009;48(3):274-84.
- 17.Dasenbrook EC, Merlo CA, Diener-West M, Lechtzin N, Boyle MP. Persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and rate of FEV1 decline in cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2008; 178(8): 814–21.
- 18.Dasenbrook EC, Checkley W, Merlo CA, Konstan MW, Lechtzin N, Boyle MP. Association between respiratory tract methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and survival in cystic fibrosis. J Am Med Assoc 2010; 303(23): 2386–92.

- 19.Dasenbrook EC. Update on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 2011; 17(6): 437-41.
- 20.David P. Pathophysiology of the lung disease in cystic fibrosis. *Lung biology in health and disease*. New York, Marcel Dekker, 1993; 193-218.
- 21.Edwards A.M. Phenotype switching is a natural consequence of *Staphylococcus aureus* repliation. *J Bacteriol* 2012;194: 5404-12
- 22.Farrand SK, Taber HW. Changes in menaquinone concentration during growth and early sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 1974;117:324-6
- 23.Foundation CF. Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry Annual Data Report for 2004: cystic Fibrosis Foundation; 2005
- 24.Gadsby DC, Vergani P, Csanády L. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* 2006; 440: 477-83.
- 25.Garcia LG, Lemaire S, Kahl BC, Becker K, Proctor RA, Denis O, et al. Pharmacodynamic evaluation of the activity of antibiotics against hemin- and menadione-dependent small-colony variants of *Staphylococcus aureus* in models of extracellular(broth) and intracellular (THP-1 monocytes) infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 3700-11.
- 26.Garcia LG, Lemaire S, Kahl BC, Becker K, Proctor RA, Denis O, et al. Antibiotic activity against small-colony variants of *Staphylococcus aureus*: review of invitro, animal and clinical data. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 1455-64
- 27.Garcia-Alvarez L, Holden MTG, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, et al. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* 2011; 11: 595–603.
- 28.Gilligan PH, Gage PA, Welch DF, Muszynski MJ, Wait KR. Prevalence of thymidine dependent *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1987; 25: 1258-61.

29. Gilpin D, McGrath S, Moffitt K, Steinhuber A, Dolhoff A, Botzenhart K, et al. MRSA from cystic fibrosis patients: a comparison of virulence factor expression under aerobic & anaerobic conditions. *Pediatr Pulmonol* 2010; S33: 339.
30. Goldenbaum PE, White DC. Role of lipid in the formation and function of the respiratory system of *Staphylococcus aureus*. *Ann NY Acad Sci.* 1974; 236: 115-23.
31. Goss CH, Mayer-Hamblett N, Aitken ML, Rubenfeld GD, Ramsey BW. Association between *Stenotrophomonas maltophilia* and lung function in cystic fibrosis. *Thorax.* 2004; 59: 955-959.
32. Goss CH, Muhlebach MS. *Staphylococcus aureus* and MRSA in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2011; 10(5): 298-306.
33. Govan JR, Deretic V. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 1996; 60: 539-74
34. Hederstedt L. The Krebs citric acid cycle. In: Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R, eds. *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1993: 181-97
35. Hee-Young Yang, Jin-Tae Suh and Hee-Joo Lee. Evaluation of Commercial Selective Agars in Screening for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, vol. 40, no. 3, 2010
36. Idelevich EA, Kriegeskorte A, Stubbings W, Kahl BC, Peters G, Becker K. Comparative in vitro activity of flaxloxacins against staphylococci displaying normal and small colony variant phenotypes. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 2809-13.
37. Jonsson IM, von Eiff C, Proctor RA, Peters G, Ryden C, Tarkowski A. Virulence of a hemB mutant displaying the phenotype of a *Staphylococcus aureus* small colony variant in a murine model of septic arthritis. *Microb Pathog.* 2003; 34: 73-9.

- 38.Kafala B, Sasarman A. Cloning and sequence analysis of the hemB gene of *Staphylococcus aureus*. Can J Microbiol. 1994; 40: 651-7.
- 39.Kahl B, Herrmann M, Everding AS, Koch HG, Becker K, Harms E. Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. J Infect Dis 1998; 177: 1023–9.
- 40.Kahl BC, Belling G, Reichelt R, Herrmann M, Proctor RA, Peters G. Thymidine-dependent small-colony variants of *Staphylococcus aureus* exhibit gross morphological and ultrastructural changes consistent with impaired cell separation. J Clin Microbiol. 2003; 41: 410-3.
- 41.Kahl BC, Duebbers A, Lubritz G. Population dynamics of persistent *Staphylococcus aureus* isolated from the airways of cystic fibrosis patients during a 6-year prospective study. J Clin Microbiol. 2003; 41: 424-7
- 42.Kipp F, Becker K, Peters G, von Eiff C. Evaluation of different methods to detect methicillin resistance in small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2004; 42: 1277-9.
- 43.Kipp F, Kahl BC, Becker K, Baron EJ, Proctor RA, Peters G, et al. Evaluation of two chromogenic agar media for recovery and identification of *Staphylococcus aureus* small-colony variants. J Clin Microbiol. 2005; 43: 1956 9.
- 44.Kolak M, Karpati F, Monstein H-J, Jonasson J. Molecular typing of the bacterial flora in sputum of cystic fibrosis patients. Int. J. Med. Microbiol. 2003; 293, 309-317
- 45.Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, Brown EL, Bes M, Benito Y, et al. *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. Science 2007; 315 (5815): 1130–3.
- 46.Lagace-Wiens PR, Alfa MJ. Reductions in workload and reporting time by use of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening with MRSA Select. J Clin Microbiol 2008; 46: 1174-7.

- 47.Lannergard J, Von Eiff C, Sander G, Cordes T, Seggewiss J, Peters G, et al. Identification of the genetic basis for clinical menadione-auxotrophic small-colony variant isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agent Chemother* 2008;52: 4017-22.
- 48.Lannergard J, Cao S, Norstrom T, Delgado A, Gustafson JE, Hughes D. Genetic complexity of fusidic acid-resistant small-colony variants(SCV) in *Staphylococcus aureus*. *PLos One* 2011; 6:e28366
- 49.Lewis L, Li K, Bharosay M, Cannella M, Jorgenson V, Thomas R, et al. Characterization of gentamicin-resistant respiratory-deficient (Res⁻) variant strains of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol Immunol.* 1990; 34: 587-605.
- 50.Looney WJ. Small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Br J Biomed Sci.* 2000; 57: 317-22.
- 51.Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med.* 1998; 339: 520-32.
- 52.Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB. Lung infections associated with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15 (2): 194-222.
- 53.McNamara PJ, Proctor RA. *Staphylococcus aureus* small colony variants, electron transport and persistent infections. *Int J Antimicrob Agents.* 2000; 14: 117-22.
- 54.Miller MH, Wexler MA, Steigbigel NH. Single and combination antibiotic therapy of *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis: emergence of gentamicin-resistant mutants. *Antimicrob Agents Chemother.* 1978; 14: 336-43.
- 55.Moore Z S, Jerris R C, Hilinski J A. High prevalence of inducible clindamycin resistance among *Staphylococcus aureus* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2008; 206-209.
- 56.Navarro J, Rainisio M, Harms HK et al. Factors associated with poor pulmonary function: cross-sectional analysis of data from the ERCF. European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis. *Eur Respir J* 2001; 18: 298-305.

57. Nazik H, Öngen B, Kuvat N. Investigation of Plasmide-Mediated Quinolone Resistance Among Isolates Obtained in a Turkish Intensive Care Unit. *Jpn J Inf Dis* 2008; 61: 310-312.
58. Nazik H, Kipritçi Ö, Kaya G, Pakaştıçalı N, Tamay Z, Güler N, et al. Kistik fibroz ve diğer kronik akciğer hastalığı tanısı alan hastaların solunum yolu örneklerinden izole edilen bakteriler ve antibiyotik direnç oranları. *ANKEM*, 2013; 27(1): 109
59. Özen NS, Dağlar D, Özhak Baysan B, Yıldırım Ç, Yazısız H, Öğünç D, et al. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının saptanmasında MRSA ID kromojenik besiyerinin değerlendirilmesi. *ANKEM* 2011; 25(1): 31-4.
60. Paixão VA, Barros TF, Mota CM, Moreira TF, Santana MA, Reis JN. Prevalence and antimicrobial susceptibility of respiratory pathogens in patients with cystic fibrosis. *Brazil J Infect Dis*. 2010, 14 (4):406-409.
61. Paterson GK, Larsen AR, Robb A, Edwards GE, Pennycott TW, Foster G, et al. The newly described *mecA* homologue, *mecALGA251*, is present in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a diverse range of host species. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Dec; 67(12): 2809-13.
62. Patrozou E, Reid K, Jefferson J, Mermel LA. A cluster of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in hospital security guards. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009;30(4): 386–8.
63. Perez LR, Antunes AL, Bonfanti JW, Pinto JB, Roesch EW, Rodrigues D. Et al. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in clinical specimens from cystic fibrosis patients by use of chromogenic selective agar. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(7): 2506-8.
64. Proctor RA, Balwit JM, Vesga O. Variant subpopulations of *Staphylococcus aureus* as cause of persistent and recurrent infections. *Infect Agents Dis*. 1994; 3: 302-12.
65. Proctor A. Microbial pathogenic factors: small colony variants. Infections associated with indwelling medical devices. Bisno A, Waldvogel, FA, Editor. 1994; ASM: Washington, DC. 77-90.

66. Proctor RA, van Langevelde P, Kristjansson M, Maslow JN, Arbeit RD. Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus* Clin Infect Dis. 1995; 20 (1): 95-102.
67. Proctor RA, Peters G. Small colony variants in staphylococcal infections: Diagnostic and Therapeutic Implications. Clin Infect Dis. 1998; 27: 419-22.
68. Proctor RA, Bates DM, McNamara PJ. Electron transport deficient *Staphylococcus aureus* small-colony variants as emerging pathogens. Emerging infections. Scheld WM, Craig WA, Hughes JM, Editors. 2001; ASM: Washington D. C. 95-110.
69. Proctor RA, Von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, et al. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. Nat Rev Microbiol 2006; 4: 295–305.
70. Ren CL, Morgan WJ, Konstan MW, Schechter MS, Wagener JS, Fisher KA, et al. Presence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in respiratory cultures from cystic fibrosis patients is associated with lower lung function. Pediatr Pulmonol 2007; 42(6): 513-8.
71. Romeo G, Devoto M, Galletta LJV. Why is the cystic fibrosis gene so frequent? Hum Genet 1989; 84: 1-5.
72. Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. Science. 1989; 245(4922): 1059-65.
73. Sadowska B, Bonar A, von Eiff C, Proctor RA, Chmiela M, Rudnicka W, et al. Characteristics of *Staphylococcus aureus*, isolated from airways of cystic fibrosis patients, and their small colony variants. FEMS Immunol Med Microbiol. 2002; 32(3): 191-7.
74. Sanders DB, Bittner RC, Rosenfeld M, Hoffman LR, Redding GJ, Goss CH. Failure to recover to baseline pulmonary function after cystic fibrosis pulmonary exacerbation. Am J Respir Crit Care Med 2010; 182(5): 627-32.

- 75.Saiman L, Siegel J. Infection control recommendations for patients with cystic fibrosis: Microbiology, important pathogens, and infection control practices to prevent patient-to-patient transmission. *Am J Infect Control* 2003; 31(3): 1–62.
- 76.Saiman L, O'Keefe M, Graham PL, Wu F, Said-Salim B, Kreiswirth B, et al. Hospital transmission of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among postpartum women. *Clin Infect Dis* 2003; 37 (10): 1313-9.
- 77.Saint S, Higgins LA, Nallamotheu BK, Chenoweth C. Do physicians examine patients in contact isolation less frequently? A brief report. *Am J Infect Control* 2003; 31(6): 354-6.
- 78.Schmitz FJ, Von Eiff C, Gondolf M, Fluit AC, Verhoef J, Peters G, et al. *Staphylococcus aureus* small colony variants: rate of selection and MIC values compared to wild-type strains, using ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, sparfloxacin and moxifloxacin. *Clin Microbiol Infect* 1999, 5: 376-8.
- 79.Schneider M, Mühlemann K, Droz S, Couzinet S, Casaulta C, Zimmerli S. Clinical characteristics associated with isolation of small-colony variants of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from respiratory secretions of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*. 2008; 46 (5): 1832-4.
- 80.Schroder A, Kland R, Peschel A, von Eiff C, Aepfelbacher M. Live cell imaging of phagosome maturation in *Staphylococcus aureus* infected human endothelial cells: small colony variants are able to survive in lysosomes. *Med Microbiol Immunol* 2006; 195: 185-94.
- 81.Seifert H, Wisplinghoff H, Schnabel P, von Eiff C. Small colony variants of *Staphylococcus aureus* and pacemaker-related infection. *Emerg Infect Dis*. 2003; 9: 1316-8.
- 82.Shortle D. A genetic system for analysis of staphylococcal nuclease gene. 1983; 22: 181-189.

83. Shreve MR, Butler S, Kaplowitz HJ, Rabin HR, Stokes D, Light M, et al. Impact of microbiology practice on cumulative prevalence of respiratory tract bacteria in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 753–57
84. Smith K, Gould KA, Ramage G, Gemmell CG, Hinds J, Lang S. Influence of tigecycline on expression of virulence factors in biofilm-associated cells of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(1): 380–7.
85. Spanu T, Romano L, D'Inzeo T, Masucci L, Albanese A, Papacci F, et al. Recurrent ventriculoperitoneal shunt infection caused by small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*. 2005; 41: 48-52.
86. Steinkamp G, Wiedemann B, Rietschel E, Krahle A, Gielen J, Bärmeier H, et al. Prospective evaluation of emerging bacteria in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2005; 4: 41–8.
87. Stryer L. *Biochemistry*. 1995; Freeman and Company: New York. 739-62.
88. Tarzi S, Kennedy P, Stone S, Evans M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: psychological impact of hospitalization and isolation in an older adult population. *J Hosp Infect* 2001; 49(4): 250-4.
89. Thomassen MJ, Demko CA, Doershuk CF. Cystic fibrosis: a review of pulmonary infections and interventions. *Pediatr Pulmonol*. 1987; 3(5): 334-51.
90. Tien W, White DC. Linear sequential arrangement of genes for the biosynthetic pathway of heme in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1968; 61: 1392-8.
91. Tsui LC, Buchwald M, Barker D, Braman JC, Knowlton R, Schumm JW, Eiberg H, Mohr J, Kennedy D, Plavsic N, et al. Cystic fibrosis locus defined by a genetically linked polymorphic DNA marker. *Science*. 1985; 230(4729): 1054-7.
92. Türk Toraks Derneği Kistik Fibroz Tanı Tedavi Rehberi. *Türk Toraks Dergisi*. 2011; 12 (2).

93. Uzun B, Karataş Şener AG, Güngör S, Afşar İ, Yüksel Ergin Ö, Demirci M. *S.aureus* suşlarındaki metisilin direncinin belirlenmesinde sefoksitin disk difüzyon testi, otomatize sistem ve kromojenik besiyerinin karşılaştırılması. Mikrobiyoloji Bul. 2013; 47(1): 11-18
94. Vanderhelst E, De Meirleir L, Verbanck S, Pierard D, Vincken W, Malfroot A. Prevalence and impact on FEV₁ decline of chronic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) colonization in patients with cystic fibrosis. A single-center, case control study of 165 patients. J Cyst Fibros 2012; 11: 2-7.
95. Vaudaux P, Kelley WL and Lew DP. *Staphylococcus aureus* small-colony variants: Difficult to Diagnose and Difficult to Treat. Clin Infect Dis, 2006-43
96. Vergison A, Denis O, Deplano A, Casimir G, Claeys G, DeBaets F, et al. National survey of molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* colonization in Belgian cystic fibrosis patients. J Antimicrob Chemother. 2007; 59: 893-9.
97. Von Eiff C, Bettin D, Proctor RA, Rolauffs B, Lindner N, Winkelmann W, et al. Recovery of small colony variants of *Staphylococcus aureus* following gentamicin bead placement for osteomyelitis. Clin Infect Dis. 1997; 25: 1250-1.
98. Von Eiff C, Heilmann C, Proctor RA, Woltz C, Peters G, Gotz F. A site-directed *Staphylococcus aureus* hemB mutant is a small colony variant which persists intracellularly. J Bacteriol. 1997; 179: 4706-12.
99. Von Eiff C, Becker K, Metze D, Lubritz G, Hockmann J, Schwarz T, et al. Intracellular persistence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants within keratinocytes: a cause for antibiotic treatment failure in a patient with Darier's disease. Clin Infect Dis. 2001; 32: 1643-7.
100. Von Eiff C, Peters G, Becker K. The small colony variant (SCV) concept - the role of staphylococcal SCVs in persistent infections. Injury. 2006; 37/2: 26-33.
101. Von Eiff C. *Staphylococcus aureus* small colony variants: a challenge to microbiologists and clinicians. Int J Antimicrob Agent, 2008; 31: 507-510

102. Valenza G1, Tappe D, Turnwald D, Frosch M, König C, Hebestreit H, Abele-Horn M. Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2008 Mar;7(2):123-7. Epub 2007 Aug 13.
103. Winn W, Jr, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, et al. Collection of specimens for the diagnosis of lower respiratory infection. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Montalbano J, Editor. 2006; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. 76-77.
104. Wolter DJ, Emerson JC, McNamara S, Buccat AM, Qin X, Cochrane E, et al. *Staphylococcus aureus* small-colony variants are independently associated with worse lung disease in children with cystic fibrosis. *Clin Infect Dis*. 2013; 57(3): 384-91.
105. Yagci S, Hascelik G, Dogru D, Ozcelik U and Sener B. Prevalence and genetic diversity of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol and Infect*, 2013; 19(1): 77-84.