

**T. C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**STAFİLOKOKLARDA METİSİLİN DİRENCİNİN
BELİRLENMESİNDE FARKLI YÖNTEMLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Bio. Dilek YÜZAK

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Haziran 2014
BOLU**



**T. C.
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**STAFİLOKOKLARDA METİSİLİN DİRENCİNİN
BELİRLENMESİNDE FARKLI YÖNTEMLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Bio. Dilek YÜZAK

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Tekin TAŞ**

Bu çalışma Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje numarası: 2013.08.01.635)

**Haziran 2014
BOLU**

ONAY SAYFASI

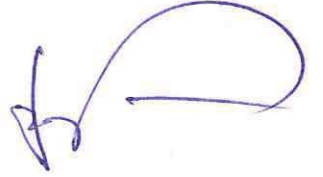
Abant İzzet Baysal Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği / oy çokluğu ile "Stafilokoklarda Metisilin Direncinin Belirlenmesinde Farklı Yöntemlerin Karşılaştırılması" Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

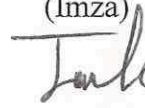
Prof. Dr. Mustafa ALTINDIŞ (Jüri başkanı)
(Sakarya Üniversitesi, SABE, Mikrobiyoloji AD)

(İmza)



Doç. Dr. Tekin TAŞ (Tez danışmanı)
(AİBÜ, SABE, Mikrobiyoloji AD)

(İmza)



Prof. Dr. Erol AYAZ
(AİBÜ, SABE, Mikrobiyoloji)

(İmza)

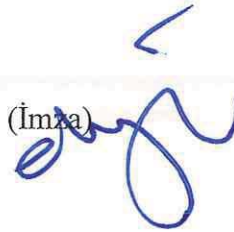


Tarih: 19/ 06/ 2014

Bu tez ile AİBÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Bio. Dilek Yüzak'ın Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Doç. Dr. Esra KOÇOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

(İmza)



ÖZET

STAFİLOKOKLARDA METİSİLİN DİRENCİNİN BELİRLENMESİNDE FARKLI YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI

Metisiline dirençli stafilocoklar, hastane ve toplum kökenli enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu nedenle stafilocoklarda metisilin direncinin hızlı ve doğru tanımlanması önemlidir. Çalışmamızda stafilocoklarda metisilin direncinin farklı yöntemlerle belirlenmesi ve bu yöntemlerin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda 84 *Staphylococcus aureus* ve 82 koagülaz negatif stafilocok (KNS) izolatu kullanıldı. Metisilin direncini belirlemek için disk difüzyon, mikrodilüsyon, oksasilin tuz agar tarama, kromojenik besiyeri ve PBP2a lateks aglütinasyon testleri kullanıldı. Referans yöntem olarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanıldı. Sonuçlar *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) ve *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* (BSAC) kılavuzlarına göre değerlendirildi.

CLSI kriterleri göz önünde bulundurulduğunda oksasilin disk difüzyon testine göre *S. aureus*'ların 29 (%34,5)'u, KNS'lerin 54 (%65,9)'ü; sefoksitin disk difüzyon testine göre *S. aureus*'ların 32 (%38,1)'si, KNS'lerin 48 (%58,5)'i; oksasilin mikrodilüsyon yöntemine göre *S. aureus*'ların 33 (%39,3)'ü, KNS'lerin 59 (%72,0)'u; sefoksitin mikrodilüsyon yöntemine göre *S. aureus*'ların 32 (%38,1)'si; oksasilin tuz agar tarama yöntemine göre *S. aureus*'ların 33 (%39,3)'ü, KNS'lerin 45 (%54,9)'i; PBP2a lateks aglütinasyon testine göre *S. aureus*'ların 30 (%37,5)'u, KNS'lerin 32 (%39,0)'si; kromojenik besiyeri testine göre *S. aureus*'ların 31 (%36,9)'i metisilin dirençli bulunmuştur. PCR yöntemiyle *mecA* geni *S. aureus*'ların 31 (%36,9)'inde KNS'lerin 47 (%57,3)'sinde pozitif bulunmuştur. Çalışmamızda *mecA*_{LGA251} geni saptanmamıştır.

CLSI kriterlerine göre değerlendirilerek elde edilen sonuçlar, referans yöntemle kıyaslandığında *S. aureus*'larda metisilin direncini belirlemede sefoksitin disk difüzyon ve mikrodilüsyon test sonuçlarının aynı olup diğer yöntemlerden

daha uygun olduğu görülmüştür (duyarlılık %100,0, özgüllük %98,1). KNS'lerde sefoksitin disk difüzyon yöntemi diğerk yöntemlere göre daha uygun bulunmuştur (duyarlılık %97,9, özgüllük %94,3). Çalışmamızda bulunan değerler, CLSI, EUCAST ve BSAC kriterlerine göre değerlendirilip elde edilen sonuçlar referans yöntemle kıyaslandığında CLSI ve EUCAST duyarlılık ve özgüllük açısından birbiriyle uyumlu bulunurken, BSAC için duyarlılık ve özgüllük değerleri değişkenlik göstermektedir. Stafilokoklarda metisilin direncini belirlemek için ülkemizde kullanılmakta olan CLSI kriterleri yerine EUCAST'ın da kullanılabileceğı kanaatine varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Stafilokok, metisilin, *mecA*, *mecA*_{LGA251}, PBP2a

ABSTRACT

COMPARISON OF DIFFERENT METHODS FOR DETERMINING METHICILLIN RESISTANCE IN STAPHYLOCOCCI

Methicillin-resistant *Staphylococcus* strains cause hospital acquired infections and community acquired infections. Therefore rapid and accurate identification of methicillin resistant strains is most important. In the present study, we aimed to investigate the detection of methicillin resistance in clinically isolated *Staphylococcus* strains by different methods and to compare the specificity and sensitivity of these methods.

In this study, 84 *S. aureus* and 82 coagulase negative *Staphylococcus* strains were used. We used to determine the methicillin resistance with disc diffusion, microdilution, oxacillin salt agar screening, chromogenic media and latex agglutination tests. Polymerase chain reaction (PCR) technique was used as reference. Test results were evaluated according to the guidelines which are *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) and *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* (BSAC).

In the oxacillin disk diffusion test, 29 (%34,5) of the *S. aureus* and 54 (%65,9) of the CNS isolates; in the cefoxitin disk diffusion test, 32 (%38,1) of the *S. aureus* and 48 (% 58,5) of the CNS isolates; in the oxacillin microdilution test, 33 (%39,3) of the *S. aureus* and 59 (%72,0) of the CNS isolates; in the cefoxitin microdilution test, of the 32 (%38,1) *S. aureus* and 33 (%39,3) of the CNS isolates; in the oxacillin salt screen agar test, 33 (%39,3) of the *S. aureus* and 45 (%54,9) of the CNS isolates; in the latex agglutination test, 30 (%37,5) of the *S. aureus* and 32 (%39,0) of the CNS isolates; in the chromogenic media test, 31 (%36,9) of the *S. aureus* isolates were found to be resistant. According to PCR technique 31 (% 36,9) of the *S. aureus* and 47 (%57,3) of the CNS isolates were found to be resistant. In our study, *mecA*_{LGA251} gene was not found in any of the Staphylococci isolates. When the results obtained according to CLSI compared reference methods, the microdilution

and cefoxitin disk diffusion test results were the same was found to be more suitable than other methods for determining the methicillin resistance in *S.aureus* isolates (sensitivity %100, specificity %98,1). Cefoxitin disk diffusion test was found more suitable than other methods for CNS isolates. When the results provided by the study were evaluated according to the criteria of CLSI, EUCAST, and BSAC, and were compared to the reference method, CLSI and EUCAST criteria were found to be accordant with each other, and BSAC criteria showed variability in terms of sensitivity and specificity. In order to determine methicillin resistance in Staphylococci, EUCAST could also be used instead of CLSI which criteria that are being used in our country was concluded.

Key Words: Staphylococcus, methicillin, *mecA*, *mecA*_{LGA251}, PBP2a

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgisini ve deneyimlerini her zaman cömertçe paylaşan, hayata yaklaşımıyla bizlere örnek olan, sorularımın çokluğuna rağmen sabırla cevaplayan, tez çalışmalarım süresince değerli vaktini ve bilimsel desteğini esirgemeyen, değerli hocam tez danışmanım Doç. Dr. Tekin Taş'a en içten dileklerimle teşekkür ederim.

Eğitimim ve tezimin gerçekleşmesinde büyük katkıları olan, bilimsel titizliği ve çalışma disiplini örnek aldığım, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı başkanı saygıdeğer hocam Doç. Dr. Esra Koçoğlu'na, eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocam Prof. Dr. Erol Ayaz'a, tez çalışmalarım sürecinde pratik fikirleri ile önerilerde bulunarak beni deneylerin karmaşasından kurtaran, çalışmamın istatistiksel analiz bölümünde yardımlarıyla destek olan, değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Zafer Mengeloğlu'na teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Bir çok laboratuvar becerisini kazanmamı sağlayan Dr. Özlem Bucak, Uzm. Şeyda Özsoy Karabörk, Bio. Kübra Ayaz ve mikrobiyoloji laboratuvar teknisyenlerine;

Yüksek lisans dönemimi huzurlu bir şekilde geçirmemi sağlayan Kadriye Duran, Sümeyra Çile Kocakavuk ve diğer öğrenci arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Zor anlarımda her zaman gülen yüzü ve destek veren sözleri ile yanımda olan, sevgili eşim M. Haşim Yüzak'a,

Hayatım boyunca her zaman bana destek olan ve bugüne gelmem için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan başta babam olmak üzere, annem ve kardeşlerime,

Sonsuz teşekkürlerimle...

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	ii
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar	x
GRAFİK ve ŞEKİLLER	xi
KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Stafilokokların Tarihçesi.....	3
2.2. Sınıflandırma.....	3
2.3. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri.....	5
2.4. Üreme ve Kültür Özellikleri.....	5
2.5. Biyokimyasal Özellikleri	6
2.6. Virulans ve Patojeniteleri.....	6
2.6.1. Kapsül	6
2.6.2. Genom	6
2.6.3. Hücre duvarı.....	6
2.6.3.1. Peptidoglikan tabaka	6
2.6.3.2. Teikoik asit.....	7
2.6.3.3. Yüzey proteinleri.....	7
2.6.4. Toksinler	8
2.6.4.1. Sitolitik toksinler.....	8
2.6.4.2. Enterotoksinler	9
2.6.4.3. Eksfoliyatif toksin (Eksfoliyatin).....	9
2.6.4.4. Toksik şok sendrom toksin-1 (TSST-1).....	10
2.6.5. Enzimler	10
2.6.5.1. Katalaz.....	10
2.6.5.2. Koagülaz	10
2.6.5.3. Lipaz.....	10
2.6.5.4. Hyalüronidaz	11
2.6.5.5. Fibrinolizin (Stafilokinaz).....	11
2.6.5.6. Deoksiribonükleaz (DNase)	11
2.6.5.7. Penisilinaz (β -Laktamaz)	11
2.6.5.8. Slime faktör	11
2.7. Epidemiyoloji.....	12
2.8. Stafilokokların Neden Olduğu Enfeksiyonlar	12
2.8.1. <i>Staphylococcus aureus</i> enfeksiyonları	12
2.8.1.1. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları.....	12
2.8.1.2. Dolaşım sistemi enfeksiyonları	13
2.8.1.3. Solunum sistemi enfeksiyonları	13
2.8.1.4. Kas ve iskelet sistemi enfeksiyonları	13
2.8.1.5. Santral sinir sistemi enfeksiyonları	13
2.8.1.6. Üriner sistem enfeksiyonlar	13

2.8.1.7. Toksinlere bağılı olarak gelişen enfeksiyonlar.....	13
2.8.2. Koagülaz negatif stafilokok enfeksiyonları	14
2.9. Tanı	15
2.9.1. Koloni morfolojisi.....	15
2.9.2. Gram boyama	15
2.9.3. Katalaz testi.....	15
2.9.4. Koagülaz testi.....	15
2.9.5. <i>Micrococcus</i> türlerinin <i>Staphylococcus</i> türlerinden ayrılması	16
2.10. Tedavi.....	17
2.10.1. Stafilokok enfeksiyonlarında kullanılan başlıca antibiyotikler	17
2.10.2. Stafilokoklarda penisilin direnci	21
2.10.3. Stafilokoklarda metisilin direnci	21
2.10.4. Stafilokoklarda metisilin direnç mekanizmaları	22
2.10.4.1. Kromozomal (intrinsik) metisilin direnci	22
2.10.4.2. Aşırı miktarda β -laktamaz salgılanması.....	23
2.10.4.3. PBP'lerdeki yapısal değişiklikler.....	23
3. MATERYAL ve METOT	25
3.1. Mikrobiyolojik Kültür ve İdentifikasyon İşlemleri.....	25
3.2. Kullanılan Besiyerleri	26
3.2.1. Kanlı agar	26
3.2.2. Mueller- Hinton agar (MHA).....	26
3.2.3. Triptik soy broth.....	26
3.2.4. Katyon ayarlı Mueller-Hinton broth (CAMHB).....	26
3.2.5. Oksasilin tuz agar	27
3.2.6. Kromojenik besiyeri.....	27
3.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri.....	27
3.3.1. Disk difüzyon testi	27
3.3.2. Mikrodilüsyon testi	28
3.3.3. Oksasilin tuz agar tarama testi	30
3.3.4. Kromojenik besiyeri testi	31
3.3.5. PBP2a lateks aglütinasyon testi	31
3.3.6. Moleküler yöntem	33
4. BULGULAR.....	38
5. TARTIŞMA	61
6. KAYNAKLAR	70
7. ÖZGEÇMİŞ	76

TABLÖLAR

Tablo 2.1. Bugüne kadar tanımlanmış stafilokok tür ve alt türleri.	4
Tablo 2.1'in devamı.....	5
Tablo 2.2. Stafilokokların tanımlanmasında kullanılan testler	16
Tablo 2.3. Mikrokok ve stafilokokların ayırımında kullanılan testler.	17
Tablo 3.1. CLSI, EUCAST ve BSAC'a göre stafiloklarda OX ve FOX değerlendirme kriterleri.....	30
Tablo 3.2. <i>mecA</i> geni için karışım oranları.....	34
Tablo 3.3. <i>mecA</i> _{LGA251} geni için karışım oranları.	35
Tablo 4.1. Stafilokok izolatlarının kliniklere göre dağılımı.....	38
Tablo 4.2. <i>S. aureus</i> için oksasilin disk difüzyon sonuçları ve istatistik değerleri.	41
Tablo 4.3. KNS'ler için oksasilin disk difüzyon sonuçları ve istatistik değerleri.	43
Tablo 4.4. <i>S. aureus</i> için sefoksitin disk difüzyon sonuçları ve istatistik değerleri.....	45
Tablo 4.5. KNS'ler için sefoksitin disk difüzyon sonuçları ve istatistik değerleri.....	47
Tablo 4.6. <i>S. aureus</i> için oksasilin MİK sonuçları ve istatistik değerleri.	49
Tablo 4.7. KNS'ler için oksasilin MİK sonuçları ve istatistik değerleri.	51
Tablo 4.8. <i>S. aureus</i> için sefoksitin MİK sonuçları ve istatistik değerleri.	53
Tablo 4.9. KNS'ler için sefoksitin MİK sonuçları ve istatistik değerleri.....	55
Tablo 4.10. <i>S. aureus</i> için tuz agar ve lateks aglütinasyon sonuçları ve istatistik değerleri.....	57
Tablo 4.11. KNS'ler için tuz agar ve lateks aglütinasyon sonuçları ve istatistik değerleri.....	58
Tablo 4.12. <i>S. aureus</i> için kromojenik agar testi sonuçları ve istatistik değerleri.	59
Tablo 4.13. Yöntemlere ve kılavuzlara göre testlerin duyarlılık ve özgüllükleri.....	60

GRAFİK ve ŞEKİLLER

Grafik 4.1. <i>S.aureus</i> izolatlarının klinik örneklere göre dağılımı.	39
Grafik 4.2. KNS izolatlarının klinik örneklere göre dağılımı.	39
Grafik 4.3. <i>S. aureus</i> için oksasilin disk difüzyon testi ROC eğrisi.	44
Grafik 4.4. KNS'lerde oksasilin disk difüzyon testi ROC eğrisi.....	46
Grafik 4.5. <i>S. aureus</i> için sefoksitin disk difüzyon testi ROC eğrisi.	48
Grafik 4.6. KNS'ler için sefoksitin disk difüzyon testi ROC eğrisi.	50
Grafik 4.7. <i>S. aureus</i> için oksasilin MİK testi ROC eğrisi.....	52
Grafik 4.8. KNS'ler için oksasilin MİK testi ROC eğrisi.....	54
Grafik 4.9. <i>S. aureus</i> için sefoksitin MİK testi ROC eğrisi.	56
Grafik 4.10. KNS'ler için sefoksitin MİK testi ROC eğrisi.	58
Şekil 4.1. PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.....	40

KISALTMALAR

BSAC:	British Society for Antimicrobial Chemotherapy
BORSA:	Borderline Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
CAMBH:	Kasyon ayarlı Mueller-Hinton Broth
cAMP:	Cyclic Adenosine Monophosphate
CFU:	Colony Forming Unit
CLSI:	Clinical and Laboratory Standards Institute
CRF:	Coagulase Reacting Factor
DD:	Disk Difüzyon
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
DNase:	Deoksiribonükleaz
EUCAST:	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FOX:	Sefoksitin
Gr:	Gram
IL:	İnterlökin
KNS:	Koagülaz Negatif Stafilocok
MİK:	Mikrodilüsyon
MHA:	Mueller-Hinton Agar
ml:	Mililitre
MODSA:	Modified Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MRS:	Metisilin Dirençli Stafilocok
MRKNS:	Metisilin Dirençli Koagülaz Negatif Stafilocok
MRSA:	Metisilin Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
OX:	Oksasilin
PBP:	Penisilin Bağlayan Protein
PCR:	Polimeraz Chain Reaction
RNA:	Ribonükleik Asit
TBE:	Tris/Borate/EDTA
TSST:	Toksik Şok Sendrom Toksin

1. GİRİŞ

Stafilokoklar, *Staphylococcaceae* ailesinde yer alan, gram pozitif, yuvarlak, hareketsiz, sporsuz mikroorganizmalar olup, deri ve mukozalarda kolonize olabilen, değişik türleri ile farklı hastalıklar yapabilen önemli bir bakteri cinsidir. Sebep olduğu enfeksiyonlar nedeniyle *Staphylococcus aureus* en önemli türdür. *S. aureus* burun delikleri, aksilla, vajen, farenks veya zedelenmiş cilt yüzeylerinde kolonize olan bir bakteridir. Enfeksiyonlar, cilt veya mukozal bariyerde bir bozulma olduğunda ve mikroorganizmanın bitişik dokulara veya kan akımına karışması ile meydana gelir. *S. aureus* dışındaki türler koagülaz negatif stafilokok (KNS) olarak adlandırılır. Geçmişte KNS'lerin insan vücudunun dış ortamla temasta olan yüzeylerinde, özellikle deride, normal flora elemanı olarak bulunduğu düşünülürken, günümüzde *S. aureus* kadar önemli bir patojen olduğu anlaşılmıştır. Başta *Staphylococcus epidermidis* olmak üzere KNS'ler son yıllarda hastane enfeksiyonlarının önemli etkenlerindendir. Bu durumun nedeni normal flora bakterileri olmaları ve invaziv girişimler sonucu kolayca alınabilmeleridir. KNS'lerin etken olduğu enfeksiyonların çoğu kateter veya protez ile ilişkilidir. KNS'ler, immün yetmezlik, nötropeni, malignite, prematüre doğum, hastanede uzun süre yatma, bir cerrahi girişim veya prostetik amaçlı ameliyatlardan sonra gelişen enfeksiyonların birçoğunda etken olarak karşımıza çıkmaktadırlar (1).

Penisilinaza dayanıklı semisentetik penisilin olan metisilin 1960 yılında kullanıma girmesi ile birlikte bir yıl içinde metisiline dirençli stafilokok suşları saptanmaya başlanmıştır (2). Stafilokoklarda metisilin direnci; *mecA* geni tarafından kodlanan yeni bir penisilin bağlayıcı protein (PBP) olan PBP2a yapımı sonucu ortaya çıkmaktadır. Yapılan son çalışmalarda *mecA* gen homologu olan *mecA*_{LGA251}'in de metisilin direncinden sorumlu olduğu bildirilmiştir (3). Metisiline dirençli suşlar tüm beta laktam antibiyotiklere ve beta laktam/beta laktamaz inhibitör kombinasyonlarına direnç gösterirler. Metisiline dirençli stafilokokların genellikle eritromisin, klindamisin, kloramfenikol, tetrasiklin, trimetoprim sulfametoksazol, kinolonlar ve aminoglikozidlere de direnç gösterdiği bildirilmektedir (4). Uygun antibiyotik seçimi

açısından metisilin direncinin doğru bir şekilde belirlenmesi gerekmektedir (5). Direncin saptanmasında en uygun yöntem *mecA* geninin ya da PBP2a proteininin varlığının tespit edilmesidir. Ancak bu yöntemlerin her laboratuvarında uygulanamaması nedeniyle disk difüzyon, agar tarama ve agar dilüsyon yöntemleri gibi testler kullanılmaktadır. Önceki yıllarda, oksasilinin metisilin direncinin belirlenmesinde diğer penisilinaza dirençli penisilinlere göre daha stabil bir molekül olması ve özgüllüğü yüksek sonuç vermesi nedeniyle *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) tarafından fenotipik testlerde önerilmekteydi. Oksasilin kullanılarak yapılan duyarlılık testlerinde, direncin heterojen olması nedeniyle, dirençli ve duyarlı sonuçların ayrımında zorluklarla karşılaşmaktadır (6). Bir sefamisin türevi olan sefoksitin *mecA* genini diğer penisilinlere göre daha iyi eksprese ettirdiği gösterilmiştir. Birçok araştırmacı, sefoksitin disk difüzyon testinin oksasilin disk difüzyon testine göre daha faydalı olduğunu, *mecA* gen varlığı ile uyumun daha iyi olduğunu bildirmiştir (5). Bu nedenle 2008 CLSI ve sonraki kılavuzlarda sefoksitin disk difüzyon testi tarama testi olarak önerilmemektedir (7).

Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen stafilokoklarda metisilin direncinin farklı yöntemlerle belirlenmesi ve bu yöntemlerin duyarlılık ve özgülüklerinin karşılaştırması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Stafilocokların Tarihçesi

Stafilocokları ilk olarak 1878'de Robert Koch tanımlamış, 1880'de Pasteur kültürde üretmiştir. 1881 yılında Alexander Ogston insan apse materyalinden izole ettiği stafilocokların fareler ve kobaylar için patojen olduğunu gösterirken, üreme esnasında karakteristik kümeler oluşturmaları nedeniyle bu mikroorganizmalara "Staphylococcus" adını vermiştir. Rosenbach 1884'de bu mikroorganizmaları hasta örneklerinden saf olarak elde etmiş ve ürettikleri sarı-turuncu pigmentten dolayı *S. aureus* adını vermiştir. Sonraki dönemlerde stafilocoklar birçok alt türe ayrılmış, *S. aureus* dışında kalan türler koagülaz negatif stafilocok (KNS) olarak adlandırılmıştır (8, 9).

Stafilocoklara karşı ilk olarak sülfonamidler kullanılmaktaydı. 1940 yılında Florey ve Chain tarafından penisilinin üretilmesiyle stafilocok tedavisinde önemli bir başarı elde edilmiştir. Ancak kısa bir süre sonra penisiline direnç gelişmiştir. 1959'da ilk semisentetik penisilinaza dirençli antibiyotik olan metisilin kullanıma girmiştir. İki yıl sonra metisiline dirençli suşlar bildirilmiştir (10). Antimikrobiyallere karşı tedavi seçeneğinin sınırlanmasından dolayı 1960'lı yıllardan sonra stafilocoklar tüm dünyada önemli bir nozokomiyal etken haline gelmiştir (11).

2.2. Sınıflandırma

Stafilocoklar Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'nin 1986 yılındaki baskısında mikrokoklar ile birlikte *Micrococaceae* ailesinde yer almaktaydı. Sonraki yıllarda yapılan DNA-ribozomal RNA hibridizasyonları, 16S rRNA sekans analizleri gibi genetik çalışmalar ve kemotaksonomik analizler aslında bu mikroorganizmaların birbirlerinden farklı olduklarını göstermiştir (1). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology'nin yeni baskısında stafilocoklar Firmicutes şubesi, Bacilli sınıfında, Bacillales takımındaki *Staphylococcaceae* ailesi içinde Genus I olarak sınıflandırılmıştır (12).

Tablo 2.1. Bugüne kadar tanımlanmış stafilokok tür ve alt türleri.

Tür	Alt tür	Referans
<i>S. arlettae</i>		Schleifer et al. 1984
<i>S. aureus</i>	<i>anaerobius</i>	De la Fuente et al. 1985
<i>S. aureus</i>	<i>aureus</i>	Rosenbach 1884
<i>S. auricularis</i>		Kloos and Schleifer 1983
<i>S. capitis</i>	<i>capitis</i>	Kloos and Schleifer 1975
<i>S. capitis</i>	<i>ureolyticus</i>	Bannerman and Kloos 1991
<i>S. caprae</i>		Devriese et al. 1983
<i>S. carnosus</i>	<i>carnosus</i>	Schleifer and Fischer 1982
<i>S. carnosus</i>	<i>utilis</i>	Probst et al. 1998
<i>S. chromogenes</i>		(Devriese et al. 1978), Hajek et al. 1986
<i>S. cohnii</i>	<i>cohnii</i>	Schleifer and Kloos 1975
<i>S. cohnii</i>	<i>urealyticum</i>	Kloos and Wolfshohl 1991
<i>S. condimenti</i>		Probst et al. 1998
<i>S. delphini</i>		Varaldo et al. 1988
<i>S. epidermidis</i>		Winslow and Winslow 1908; Evans 1916
<i>S. equorum</i>	<i>equorum</i>	Schleifer et al. 1984
<i>S. equorum</i>	<i>linens</i>	Place et al. 2003
<i>S. felis</i>		Igimi et al. 1989
<i>S. fleurettii</i>		Vernozy-Rozand et al. 2000
<i>S. gallinarum</i>		Devriese et al. 1978
<i>S. haemolyticus</i>		Schleifer and Kloos 1975
<i>S. hominis</i>	<i>hominis</i>	Kloos and Schleifer 1975
<i>S. hominis</i>	<i>novobiosepticus</i>	Kloos et al. 1998
<i>S. hyicus</i>		(Sompolinski 1953), Devriese et al. 1978
<i>S. hyicus</i>	<i>chromogenes</i>	Devriese et al. 1978
<i>S. intermedius</i>		Hajek 1976
<i>S. kloosii</i>		Schleifer et al. 1984
<i>S. lentus</i>		Kloos et al. 1976, Schleifer et al. 1983
<i>S. lugdunensis</i>		Freney et al. 1988
<i>S. lutrae</i>		Foster et al. 1997
<i>S. muscae</i>		Hajek et al. 1992
<i>S. pasteurii</i>		Chesneau et al. 1993
<i>S. pisci fermentans</i>		Tanasupawat et al. 1992
<i>S. saccharolyticus</i>		Kilpper-Balz and Schleifer 1981
<i>S. saprophyticus</i>	<i>bovis</i>	Hajek et al. 1996
<i>S. saprophyticus</i>	<i>saprophyticus</i>	Shaw et al. 1951

Tablo 2.1'in devamı.

<i>S. schleiferi</i>	<i>coagulans</i>	Igimi et al. 1990
<i>S. schleiferi</i>	<i>schleiferi</i>	Freney et al. 1988
<i>S. sciuri</i>	<i>carnaticus</i>	Kloos et al. 1997
<i>S. sciuri</i>	<i>lentus</i>	Kloos et al. 1976
<i>S. sciuri</i>	<i>rodentium</i>	Kloos et al. 1997
<i>S. sciuri</i>	<i>sciuri</i>	Kloos et al. 1976
<i>S. simulans</i>		Kloos and Schleifer 1975
<i>S. succinus</i>	<i>casei</i>	Place et al. 2003
<i>S. succinus</i>	<i>succinus</i>	Lambert et al. 1998
<i>S. vitulinus</i>		Webster et al. 1994
<i>S. warneri</i>		Kloos and Schleifer 1975
<i>S. xylosum</i>		Schleifer and Kloos 1975

Günümüze kadar *Staphylococcus* genusunda 35 tür ve 17 alt tür saptanmıştır (Tablo 2.1). Bu türler içinde patojenitesi en yüksek olan *S. aureus*'tur. KNS 'ler içerisinde klinik örneklerden en sık izole edilen tür *S. epidermidis*'tir (1).

2.3. Morfoloji ve Boyanma Özellikleri

Stafilokoklar; 0,5-1,7 µm çapında, hareketsiz, sporsuz, gram pozitif boyanan koklardır. Stafilokoklar tekli hücreler, çiftler, tetradlar veya kısa zincirler halinde bulunabilir, fakat genel olarak düzensiz kümeler halinde bulunurlar (2).

2.4. Üreme ve Kültür Özellikleri

Fakültatif anaerob olan bu bakteriler (*S. saccharolyticus* ve *S. aureus subsp. anaerobius* hariç) çoğunlukla aerob üremeyi tercih ederler. Basit besiyerlerinde dahil birçok besiyerinde üreyebilen stafilokok türlerinin çoğunluğu 30-37°C'de 18-24 saat içinde 1-3 mm çapında koloni oluştururlar. Optimal 37°C'de ve pH 7,4'te üremelerine karşın 18-40°C gibi geniş bir sıcaklık aralığında ve pH 4,2-9,3 arası üreyebilirler. % 10 ve daha az sodyum klorür (NaCl) içeren ortamlarda iyi, % 15 NaCl'li ortamda zayıf ürerler. *S. aureus* suşlarında sarı pigment ve beta hemoliz görülür. *S. aureus* kültürde S tipi, yuvarlak, hafif kabarık, parlak ve ıslak koloniler oluşturur. KNS'ler ise S tipi, hafif konveks kabarık ve genellikle pigmentsiz koloniler oluşturur (13).

2.5. Biyokimyasal Özellikleri

S. aureus suşları koagülaz pozitifdir. Koagülaz pozitif olan diğer stafilocoklar; *S. intermedius*, *S. lugdunensis*, *S. hyicus*, *S. delphini*, *S. lutrae* ve *S. schleiferi* subsp.'dir. Genellikle katalaz pozitif (*S. saccharolyticus* ve *S. aureus* subsp. *anaerobius* hariç), oksidaz negatif (*S. sciuri*, *S. lentus* ve *S. vitulinus* hariç) mikroorganizmalardır. Stafilocoklar başta glukoz olmak üzere maltoz, laktoz, fruktoz gibi karbonhidratların çoğunu asit oluşturarak parçalar fakat gaz oluşturmazlar. Mannitolu ise sadece *S. aureus* fermente eder. Nitratı nitrite indirgerler (1, 13).

2.6. Virulans ve Patojeniteleri

2.6.1. Kapsül

Stafilocoklar genellikle kapsülsüz olmakla birlikte, hücre duvarlarının en dış tabakasında polisakkarit bir kapsül bulundurabilmektedirler. Bu yapı polimorfonükleer hücreler tarafından organizmanın fagositozunu önlemek, aynı zamanda prostetik yüzeylere ve konak hücrelere tutunmasını sağlamaktan sorumludur. Bugüne kadar tanımlanan 11 kapsüler serotip bulunmaktadır. Enfeksiyonların çoğundan serotip 5 ve 7 sorumludur (1, 13).

2.6.2. Genom

Stafilocok genomu; profajlar, plazmidler ve transpozonları içeren yaklaşık 2800 baz çiftinden oluşmaktadır. Antimikrobiyal direnç ve bakteri virülansından sorumlu olan bu genler kromozom veya ekstrakromozomal yapılar üzerinde bulunabilir (14).

2.6.3. Hücre duvarı

2.6.3.1. Peptidoglikan tabaka;

Peptidoglikan tabakası hücre duvarına sertlik vermekte ve hücre duvarı kuru ağırlığının % 50'sini oluşturmaktadır (1, 14). Bu tabaka N-asetil glikozamin ve N-asetil muramik asitin β -1,4 bağı ile bağlanmasıyla oluşmaktadır. Peptidoglikan zincirleri N-asetil muramik aside bağlanan tetrapeptid zincirleri ve pentaglisin köprüleri tarafından çapraz bağlanmaktadır (15). Çok sayıdaki çapraz bağ içeriği, bu

bakterilerin hücre duvarlarının çok sağlam bir yapıya sahip olmasını sağlayarak konak dokularda bu bakterilerin canlılıklarını sürdürebilmelerini sağlar (16). *S. aureus*' da çapraz bağ oranı yüksektir ve bu özellik bakterilerin vücudun önemli savunma sistemlerinden olan lizozime karşı dirençli olmasına neden olur (15). Peptidoglikan; endojen pirojenlerin üretimini, kompleman aktivasyonunu, monositlerden interlökin-1 üretimini ve lökositlerin kemotaksisini uyaran endotoksin benzeri aktiviteye sahiptir (17).

2.6.3.2. Teikoik asit;

Sadece gram pozitif bakterilerde bulunan teikoik asit, hücre duvarı kuru ağırlığının % 30-50'sini oluşturmaktadır. Teikoik asit, mukozalarda bulunan özgül reseptörleri ile birleşerek stafilokokların konak hücreye yapışmasını sağlar. Ribitol teikoik asit ve gliserol teikoik asit olmak üzere iki tiptir. Ribitol teikoik asit hücre duvarından uzanırken, gliserol teikoik asit hücre membranından uzanmaktadır. Teikoik asitler hücre duvarı stabilizasyonunda, hücre membranı ile hücre duvarı bütünlüğünün sağlanmasında, hücre fonksiyonları için gerekli küçük iyonların bağlanmasında, peptidoglikan sentezinde ve çoğalma sırasında septum oluşumunda görev alır. Teikoik asitler zayıf immunojen olmalarına rağmen peptidoglikana bağlandıklarında özgül antikor cevabı oluştururlar. Bu antikor cevabının takip edilmesi, sistemik stafilokok enfeksiyonlarında tanısal olarak kullanılabilir, ancak diğer tanısal testlere göre daha az duyarlı bir yöntemdir (1, 13, 17).

2.6.3.3. Yüzey proteinleri;

Protein A, elastin, kollajen, fibronektin bağlayan proteinler ve clumping faktör; kimyasal yapıları ve hücre duvarı yerleşimleri birbirlerine benzerlik gösteren stafilokoksik yüzey proteinleridir. Yüzey proteinlerinin en önemli görevi stafilokokların konak dokulara kolonizasyonunu sağlamaktır. Protein A bu proteinlerin prototipi olarak kabul edilmektedir. Üreme sırasında ortama salınan serbest, hücreye bağlı ve hücre dışına salgılanan olmak üzere 3 tiptir. Protein A'nın en önemli özelliği, IgG3 dışındaki tüm IgG ve IgA2 ile bazı IgM'lerin Fc reseptörleri ile reaksiyona girebilmesidir (1, 9, 18). Bu nedenle bakteriyi komplemanın, antikorların ve fagositik hücrelerin zararlı etkilerine karşı korur (13). Ayrıca protein A bazı enfeksiyon hastalıklarının tanısında in vitro deneylerde kullanılmaktadır. Bu

testlere koaglütinasyon adı verilir ve sadece antijen aramak amacıyla kullanılan bir tanı yöntemidir (17).

2.6.4. Toksinler

2.6.4.1. Sitolitik toksinler;

Stafilokoklar, konak hücre morfolojisini ve/veya fonksiyonunu etkileyen çok sayıda ekstraselüler protein yapısında toksin üretebilir. Bu toksinler sayesinde bakteriler yoğun inflamatuvar yanıt olan dokularda bile üremelerine devam edebilmektedirler. Lökositin ve hemolizinler en iyi tanımlanan sitolitik toksinlerdir (1, 9, 16).

Alfa hemolizin: Eritrosit, polimorfonükleer lökosit, trombosit ve fibroblastları içeren birçok hücre üzerinde sitolitik etkiye sahip olan en önemli hemolizindir (17). Bakteriyel kromozomlar veya plazmidler tarafından kodlanmaktadır. En güçlü membran hasar proteinidir. Hücre membranına bağlanarak membran üzerinde litik etki oluşturur. İnsan makrofajları ve plateletleri üzerinde litik etki oluştururken, monositler zarar görmezler. Hemolitik, dermonekrotik ve letal etkileri bulunmaktadır (13, 16).

Beta hemolizin: Farklı hücreler üzerine etkisi olan bir sfingomyelinazdır. Dermonekrotik etkisi bulunmamaktadır. En iyi koyun eritrositlerine etki etmekle beraber insan eritrositleri üzerinde orta dereceli toksisiteye sahiptir. Bu toksinin en önemli özelliği sıcak-soğuk lizis yapabilmesidir. Yani düşük ısılarda lizis özelliği daha da artmaktadır. Isıya dayanıksız bir toksindir (13). Bu toksinin insan enfeksiyonlarındaki rolü henüz tam olarak açıklanamamıştır. Ancak alfa hemolizinle birlikte stafilokok enfeksiyonlarının tipik abse formasyonu ve doku hasarından sorumlu olabileceğine inanılmaktadır (17, 19).

Gama hemolizin ve Panton-Valentine lökositin: Gama hemolizin proteinleri hemolizin γ A (HlgA), hemolizin γ B (HlgB), ve hemolizin γ C (HlgC), olmak üzere üç tiptir. Panton-Valentine lökositin proteinleri ise LukS-P-V ve LukF-P-V olmak üzere iki tiptir. HlgA, HlgC ve LukS-P-V proteinlerine, çözücü içinde yavaş ayrıştıklarından S (“slow-eluting protein”) proteinleri, HlgB ve LukF-P-V proteinlerine ise çözücü içinde hızlı ayrıştıklarından dolayı F (“fast-eluting protein”) proteinleri adı verilmiştir. Bu üç S proteininden her biri, iki F proteininden biri ile

bağlanarak ikili kompleksler oluşturur. S ve F proteinlerinden hiçbirisi tek başına hemolitik veya lökositidal aktivite gösteremez. Nötrofil ve makrofajlar üzerine litik etkisi vardır ancak hemolitik aktivitesi yoktur (1, 17).

Delta toksin: Eritrosit, lokosit, makrofaj, lenfosit ve trombositleri hasara uğratan bir proteindir. Geniş biyolojik aktiviteye sahip olan bu toksin, hücre membran bütünlüğünü bozarak adenilat siklazı aktive eder ve cAMP salınımına neden olur. Bu enzimatik aktivite, Stafilokoksik Toksik Şok Sendromu ve stafilokokkal besin zehirlenmesinde rol oynar. Antijenik özellik göstermez (1, 2, 9, 17).

2.6.4.2. Enterotoksinler

Isıya dayanıklı (100°C'de 30 dakika), mide ve jejunum enzimlerine karşı dirençli, polipeptit yapısında maddelerdir. Farklı antijen yapısına sahip 8 çeşit stafilokok enterotoksini (A, B, C1, C2, C3, D, E ve F) saptanmıştır. Besin zehirlenmelerinde karşımıza çıkan en yaygın toksin enterotoksin A'dır. Enterotoksin B ise hastane enfeksiyonlarında çok karşılaşılan bir toksindir. Enterotoksin B ve nadiren enterotoksin C menstruasyon dışı toksik şok sendromu olgularının yaklaşık yarısından sorumludur. Bu toksinler süperantijen olup, sitokin salınımı ve T hücrelerinin nonspesifik aktivasyonunu uyarabilirler (2, 17).

2.6.4.3. Eksfoliyatif toksin (Eksfoliyatin)

Eksfoliyatif toksin A ve B olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Eksfoliyatif toksin A ısıya dirençli olup kromozomal kökenli bir proteindir. Eksfoliyatif toksin B ise ısıya duyarlı plazmid aracılı bir proteindir. Bu iki protein biyokimyasal ve antijenik yapıları bakımından farklı olmasına rağmen benzer biyolojik aktiviteye sahiptirler (1,13). Bu toksinlerin benzer aktiviteleri, süperantijen özelliğinde olmaları ve proteolitik aktiviteye sahip olmalarıdır (19). Stafilokokkal Haşlanmış Deri Sendromu'na neden olan bu toksinler, epidermisdeki stratum granulosum tabakasını oluşturan hücrelerin interselüler bağlarının kopmasına ve stratum granulosumun ayrılmasına neden olurlar (20).

2.6.4.4. Toksik şok sendrom toksin-1 (TSST-1)

TSST-1 toksik şok sendromuna neden olan ve bir çok *S. aureus* tarafından oluşturulan toksindir. Süperantijen yapısında olan bu toksin ısıya ve proteolitik enzimlere dirençlidir. Toksik şok sendromu ateş, diyare, deride yaygın kırmızı döküntüler, mental konfüzyon, ciddi hipotansiyon, böbrek yetmezliği ile karakterize klinik bir tablodur (1, 9). TSST-1 düşük konsantrasyonlarda endotelial hücrelerden sızıntıya neden olurken, yüksek konsantrasyonlarda hücrelere sitotoksik etki göstermektedir (21). Son zamanlarda koagülaz negatif stafilokokların da TSST-1 üretebildikleri ve bu organizmalar tarafından oluşturulan toksik şok sendromu vakaları bildirilmiştir (22).

2.6.5. Enzimler

2.6.5.1. Katalaz;

Tüm stafilokok türleri (*S. saccharolyticus* ve *S. aureus subsp. anaerobius* hariç) tarafından üretilen toksik hidrojen peroksidi toksik olmayan oksijen ve suya ayıran bir enzimdir. Bu enzim sayesinde bakteriler fagositoz sonrasında da yaşamını sürdürebilir (23).

2.6.5.2. Koagülaz;

S. aureus tarafından oluşturulan bir enzimdir. Bağlı ve serbest olmak üzere iki çeşit koagülaz enzimi bulunmaktadır. Bağlı koagülaz hücre duvarında bulunur ve doğrudan fibrinojene bağlanarak fibrine dönüştürür. Sonuç olarak kümeleşmeye neden olur. Serbest koagülaz ise plazmada “coagulase-reacting factor (CRF)” ile birleşerek bir trombin benzeri faktör (staphylothrombin) oluşturur. Bu faktör fibrinojeni fibrine dönüştürerek kümeleşmeye neden olur. Bu şekilde bakterinin etrafı fibrinle çevrilir ve bakteri fagositoza karşı dirençli hale gelir (1, 19).

2.6.5.3. Lipaz;

Lipaz enzimi *S. aureus*'ların tümü ve KNS'lerin % 30'u tarafından üretilmektedir. Bu enzim lipidleri parçalar ve bakterilerin vücudun lipidçe zengin bölgelerinde yaşamını sürdürmesini ve yayılmasını sağlar. Ayrıca yüzeyel dokuları

invaze ederek fronköl ve karbonköl gibi enfeksiyonlarının gelişimine neden olmaktadır (19, 23).

2.6.5.4. Hyalüronidaz;

S. aureus'ların % 90'ından fazlası tarafından üretilen antijenik özelliğe sahip bir enzimdir. Bağ dokunun yapısında bulunan hyalüronik asidi parçalar ve bakterinin dokuda yayılmasını kolaylaştırır (1).

2.6.5.5. Fibrinolizin (Stafilokinaz);

Plazmada bulunan plazminojeni aktive eder ve plazmine çevirir. Plazmin fibrinolitik etki göstererek fibrini parçalar ve bakterinin yayılmasını kolaylaştırır (17).

2.6.5.6. Deoksiribonükleaz (DNase);

Deoksiribonükleaz DNA'yı hidrolize eden bir fosfodiesterazdır. *S. aureus* izolatlarının % 90-96'sında bulunur ve ısıya dirençlidir. Patojenitedeki rolü henüz bilinmemektedir (1).

2.6.5.7. Penisilinaz (Beta-laktamaz);

Beta-laktamaz enzimi, penisilin grubu antibiyotiklerdeki beta-laktam halkasının hidroksil grubunu parçalayarak etkisiz hale getirir. Sonuç olarak bakteriler hücre duvarı sentezini inhibe eden beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı dirençli hale gelir. Bu enzimleri kodlayan direnç genleri plazmidler ve transpozonlar aracılığıyla diğer suşlara aktarılır (23, 24).

2.6.5.8. Slime faktör;

Bazı KNS'ler tarafından sentezlenen, % 40'ı karbonhidrat, % 27'si protein yapısında, kuvvetli antijenik özelliğe sahip bir maddedir. Bu madde stafilokokların katater ve diğer sentetik maddelere kolayca yapışmasına ve kolonize olmalarına neden olur. Hücrel immun yanıtı baskılar, opsonizasyonu, nötrofil kemotaksisini ve nötrofil fagositozunu inhibe eder (1, 20).

2.7. Epidemiyoloji

Stafilokoklar sistemik ve lokal birçok enfeksiyona neden olan ve son yıllarda bazı antimikrobiyal ajanlara direnç geliştirmesi nedeniyle önem kazanan mikroorganizmalardır (25). Sıklıkla deri ve deri ile ilişkili bezlerde, bazen de orofarinks, gastrointestinal ve ürogenital mukozada kolonize olurlar (23). Yenidoğanlarda *S. aureus* suşları göbek çevresi, perianal bölge, deri ve bazen de gastrointestinal sistemde kolonize olur. İleriki dönemlerde ise *S. aureus*'un en önemli kolonizasyon bölgesi ön nazofarinkstir. Sağlıklı erişkinlerde kolonizasyon % 10-20 oranında kalıcı olmakla birlikte, % 30–50 arasında değişmektedir (26). KNS'ler mukozalar üzerinde, nemli bölgelerde ve özellikle deride, normal flora elemanı olarak bulunurlar. Aksilla, burun delikleri, perine gibi nemli bölgelerde 10^3 - 10^6 CFU/cm² (colony forming unit/cm²), kuru yüzeylerde ise 10 - 10^3 CFU/cm² gibi miktarlarda bulunurlar (27). Tip 1 diyabetli hastalar, intravenöz uyuşturucu kullananlar, hemodiyaliz ve cerrahi operasyon geçirmiş hastalar, atopik dermatitliler, kazanılmış immun yetmezlikli hastalar ve IL-2 tedavisi gören hastalarda taşıyıcılık oranı genel popülasyona göre daha fazladır (28). Stafilokoklar yüksek ısı, dezenfektanlar ve antiseptik solüsyonlara duyarlıdır fakat kuru yüzeylerde uzun süre canlı kalabilirler. Stafilokoklar direkt temasla veya kontamine araç ve gereçlerle yayılırlar (17). Etken oldukları hastane enfeksiyonlarında en önemli kaynak, hastalar veya hastane personelinin burun taşıyıcılığıdır (29). Toplumda kontrol, kronik veya tekrarlayan taşıyıcılara yöneliktir. Korunmanın temelinde hijyen koşullarına uyulma, deri temizliğine dikkat edilme ve gıda işlemleriyle ilgilenenlerin temizlik kurallarına uyma prensipleri bulunmaktadır (30).

2.8. Stafilokokların Neden Olduğu Enfeksiyonlar

2.8.1. *Staphylococcus aureus* enfeksiyonları:

S. aureus gerek toksinleri aracılığı ile gerekse invazyon ve sistemik yayılım ile çeşitli enfeksiyonlara neden olur (16).

2.8.1.1. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları

S. aureus impetigo, follikülit, fronkül, karbonkül, mastit, sellülit, yara enfeksiyonları ve hidradenitis süpurativa gibi klinik tablolara yol açabilir. Deri

enfeksiyonları hızla yayılarak sellülit, lenfanjit, lenfadenit ve nekrotizan fasiite neden olabilir (31).

2.8.1.2. Dolaşım sistemi enfeksiyonları

Klinik tablolar bakteriyemi, endokardit ve perikardit şeklinde seyreder (20).

2.8.1.3. Solunum sistemi enfeksiyonları

Toplumdan kazanılmış *S. aureus* pnömonileri genellikle influenza epidemilerinden sonra görülür. Hastane kökenli *S. aureus* pnömonileri ise genellikle entübasyon sonrası veya aspirasyona bağlı olarak görülür (20).

2.8.1.4. Kas ve iskelet sistemi enfeksiyonları

Klinik tablolar osteomyelit, septik artrit, septik bursit ve piyomyozit şeklinde görülür (26).

2.8.1.5. Santral sinir sistemi enfeksiyonları

Tanısal girişimler veya cerrahi sonrası doğrudan yayılımla ya da nadiren bakteriyemi ve endokardite sekonder hematojen yolla gelişirler (20, 26).

2.8.1.6. Üriner sistem enfeksiyonları

Hematojen yolla veya katater kullananlarda asendan yolla gelişebilir (20, 26).

2.8.1.7. Toksinlere bağlı olarak gelişen enfeksiyonlar

Haşlanmış deri sendromu: Eksfoliyatif toksin tarafından oluşturulur. Yenidoğanlarda yaygın epitelyum deskuamasyonu vardır. Deri döküntüleri lökosit ve mikroorganizma içermez (20, 26).

Toksik Şok Sendromu: *S. aureus*'un salgıladığı enterotoksin ile kontamine gıda tüketiminden kaynaklanır. Kusma, ishal ve karın ağrısıyla karakterizedir (20, 26).

Besin Zehirlenmesi: TSST-1 'in neden olduğu septik şok benzeri bir klinik tablodur (20, 26).

2.8.2. Koagülaz negatif stafilokok enfeksiyonları

Geçmişte KNS'lerin insan vücudunun dış ortamla temasta olan yüzeylerinde, özellikle deride, normal flora elemanı olarak bulunduğu düşünülürken, günümüzde *S. aureus* kadar önemli bir patojen olduğu anlaşılmıştır. Başta *S. epidermidis* olmak üzere KNS'ler son yıllarda hastane enfeksiyonlarının önemli etkenlerindendir. Bu durumun nedeni normal flora bakterileri olmaları ve invaziv girişimler sonucu kolayca alınabilmeleridir. İnsanlarda en fazla patojen olanlar *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus*'tur (28, 32).

Yatan hastaların çoğuna yattıkları süre boyunca damar içi araç uygulanır. KNS'ler; damar içi kataterlerin sık kullanıldığı birimlerde nozokomiyal bakteriyemiye en sık neden olan bakterilerdir (33). İntravenöz katater enfeksiyonlarında, çoğunlukla *S. epidermidis* etken olarak gösterilmektedir (34).

Koagülaz negatif stafilokokların etken olduğu doğal kapak endokarditi nadir görülür ve tüm endokardit olgularının % 5-8'ini kapsar. Endokardit oluşumu, geçici bakteriyemiler sırasında KNS'lerin hasar görmüş kalp kapaklarına ve endokarda tutunmaları ile gerçekleşmektedir. Prostetik kapak endokarditlerinde ise KNS'ler sıklıkla etken olarak karşımıza çıkmaktadır (35).

Katater ve şant enfeksiyonlarının % 50'den fazlasından KNS'ler sorumludur. En sık gözlenen etken *S. epidermidis*'dir. *S. epidermidis*'in özellikle katater, şant, plastik protez gibi yabancı cisimlerin bulunduğu ortamlara afiniteleri büyüktür (36). *S. aureus* ile kıyaslandığı zaman KNS'ler nadiren osteomyelit etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Fakat iki durumda osteomyelit etkeni olarak öne çıkarlar. İlki eklem protezi takılması sonrası gelişen protez enfeksiyonu ve ikincisi açık kalp cerrahisi olmuş hastalarda gelişen sternal osteomyelitlerdir (1).

Staphylococcus saprophyticus; genç kadınlardaki idrar yolu enfeksiyonlarına neden olan bir KNS'dir. Bunun dışında nadir olarak *S. epidermidis* de idrar yolu enfeksiyonlarına neden olmaktadır (35).

2.9. Tanı

2.9.1. Koloni morfolojisi:

S. aureus kolonileri, kanlı agarda 24 saat inkübasyon sonunda genellikle sarı-turuncu, düzgün kenarlı, yuvarlak, kremi ve hafif konveks koloniler oluşturlar. Bazı *S. aureus* kolonileri kanlı agarda beta-hemoliz yapabilir. KNS kolonileri ise hafif konveks kabarık, S tipi, parlak ve genellikle pigmentsizdir (1,19).

2.9.2. Gram boyama:

Temiz bir lam üzerine bir damla serum fizyolojik damlatılır ve stafilokok kolonileri homojen bir şekilde karıştırılır. Havada kurutulur ve ardından 3 kez alevden geçirilir. Gram boyamaya tabi tutulur; kristal viyole (1 dakika), lügol eriyiği (1 dakika), % 96'lık etil alkol ile yıkama (10 saniye) ve son olarak sulu fuksinde (30 saniye) bekletilir. İmmersiyon yağı ile 100X'te yapılan incelemede gram pozitif üzüm salkımına benzeyen kok şeklindeki mikroorganizmalar stafilokok olarak değerlendirilir (1,19).

2.9.3. Katalaz testi:

H₂O₂ 'yi su ve oksijene ayrıştıran katalaz enziminin gösterilmesi için yapılır. Gram pozitif olan stafilokok ve mikrokokların, streptokok üyelerinden ayrımını sağlar (1,19).

2.9.4. Koagülaz testi:

S. aureus'u diğer stafilokoklardan ayırt etmede en yaygın kullanılan testtir. Tüp koagülaz ve lam koagülaz testi olmak üzere iki şekilde yapılabilir. Her iki test için EDTA'lı tavşan plazması önerilmektedir; ancak insan plazması da kullanılabilir. Koagülaz pozitif olan örnekler *S. aureus* olarak değerlendirilirken, negatif örnekler KNS olarak adlandırılır (1,19).

a. Tüp koagülaz: Stafilokokların salgıladıkları serbest koagülaz araştırılır. Bu madde plazmada bulunan "coagulase reacting factor" (CRF) ile ilişki kurar ve fibrinojeni fibrine dönüştürerek pıhtılaşmaya yol açar. Tavşan veya insan plazması kullanılabilir. Kültür ve plazma karışımı hazırlanır ve tüp 37°C de inkübasyona

bırakılır. Pıhtılaşma olup olmadığı 1, 3, 6 ve 24. saatlerde gözlemlenir. Pıhtının oluşması pozitif sonuç olarak değerlendirilir (1, 19).

b. Lam koagülaz: Bu test ile bağlı koagülaz (clumping factor) araştırılır. Besiyerinden öze ile alınan stafilokok kolonileri lam üzerinde bir damla distile su ile homojenize edilir ve üzerine bir damla plazma damlatılıp bir müddet karıştırılır. Gözle görülen kümeleşmeler pozitif olarak değerlendirilir (1, 19).

Stafilokokların tanımlanmasında kullanılan diğer yöntem ve kriterler Tablo 2.2'deki gibidir.

Tablo 2.2. Stafilokokların tanımlanmasında kullanılan testler (1)

	<i>S. aureus</i>	KNS
Tüp koagülaz	+	-
Lam koagülaz	+	-/+
DNase	+	(-)
Hemolizinler	+	-/+
Katalaz	+	+
Oksidaz	-	-
Alkalen fosfataz	+	-/+
Prolidoniz arilamidaz	-	-/+
Ornitin dekarboksilaz	-	-/+
Üreaz	d	-/+
Beta galaktosidaz	-	-/+
Asetoin üretimi	+	+/d
Novobiyosin direnci	-	(-)
Polimiksin B direnci	+	+/-
Mannitolden asit oluşumu	+	-/d

+: pozitif, -: negatif, d: değişken, (-): büyük çoğunluğu negatif

2.9.5. *Micrococcus* türlerinin *Staphylococcus* türlerinden ayrılması

Katalaz pozitif, Gram pozitif kok grubundan olan mikrokok ve stafilokokları ayırmak için aşağıdaki testler uygulanabilir.

Modifiye oksidaz testi; Dimetil Sülfoksit içinde tetrametil-p fenilendiamin dihidroklorid eriyiği emdirilmiş filtre kağıtları kullanılır. Besiyerinden alınan koloni diskin üzerine sürüldüğünde 30 saniye içinde mavi-mor renk oluşumu testin pozitif olduğunu gösterir. Oksidaz negatif suşlar stafilokok olarak kabul edilir.

Basitrasin duyarlılık testi; Stafilocoklar disk difüzyon yönteminde basitrasine (0,04 U) dirençlidirler. Mikrocoklar duyarlıdır ve ≥ 10 mm zon oluştururlar (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. Mikrocok ve Stafilocokların ayırımında kullanılan testler (1)

	Mikrocoklar	Stafilocoklar
Lizostaşın	R	S
Furazolidon (100 µg) disk	R	S
Basitrasin (0.04 U) disk	S	R
Eritromisin (0.4 µg/mL) varlığında gliserolden asit oluşturma	-	+
Anaeorobik şartlarda glukozdan asit oluşturma	-	+
Modifiye oksidaz testi	+	-

R: Dirençli, S: Duyarlı, +: Pozitif, -: Negatif

2.10. Tedavi

Stafilocoklarda antibiyotiklere karşı gelişen hızlı dirençten dolayı, uygun antibiyotiğın seçimi için antibiyotik duyarlılık testleri yapılmalıdır. Direnç gelişimi daha çok *S. aureus* suşlarında görölmektedir. *S. aureus*'un neden olduğu bakteriyemi, pnömoni, endokardit ve osteomiyelit gibi ağır seyirli enfeksiyonlarda yüksek dozlarda ve uzun süreli antibiyotik uygulanması gerekmekte ve buna bağlı olarak direnç gelişmektedir (9, 37). Metisiline dirençli stafilocoklara karşı en etkili antibiyotik vankomisindir (38).

2.10.1. Stafilocok enfeksiyonlarında kullanılan başlıca antibiyotikler

Penisilinaza dirençli penisilinler (Antistafilocokal penisilinler):

Metisilin, nafsilin ve izoksazolil penisilinler (kloksasilin, dikloksasilin, flukloksasilin ve oksasilin) bu grupta bulunmaktadır. Bu antibiyotikler beta laktamazların hidrolizine karşı dirençlidirler. Etkinlikleri stafilocok enfeksiyonları ile sınırlı olduğundan dolayı bu antibiyotiklere "antistafilocokal penisilinler" de denilmektedir. Stafilocoklarda metisilin direnci, beta laktamlara genel direnci ifade etmektedir. Bu nedenle metisiline dirençli stafilocokların etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde beta laktam antibiyotikler önerilmemektedir (39).

Beta laktamaz inhibitörlü kombine penisilinler:

Klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam ile ampisilin, amoksisilin, tikarsilin, piperasilin gibi penisilin türevlerinin kombinasyonundan oluşan ve beta-laktamaz salgılayan bakterileri etkileyen antibiyotiklerdir (39).

Sefalosporinler:

Etki mekanizmalarını bakteri hücre duvarı sentezinde rol oynayan PBP'lere bağlanarak inhibisyon yoluyla gösterirler. Sefalosporin direnci sıklıkla PBP'lerde değişiklik sonucu gelişir. Yapılarına ve antimikrobiyal etkinliklerine göre dört kuşak altında toplanırlar. Birinci kuşak sefalosporinler, metisiline duyarlı stafilokoklara (MSS) en etkili gruptur. Ancak hiç bir sefalosporin kuşağının MRSA üzerine etkinliği yoktur (40,41).

Karbapenemler:

Karbapenemlerin iki üyesi; imipenem ve meropenemdir. Beta-laktam antibiyotikler içinde en geniş spektruma sahiptirler. Karbapenemlerin gram pozitif aerob bakterilere etkileri oldukça fazladır. MSSA suşlarına etki gösterirken, MRSA suşlarına etkisizdirler (39, 42).

Aminoglikozidler:

Aminoglikozidler, gram pozitif kokların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde beta laktam antibiyotikler ve vankomisin gibi diğer bazı antibiyotiklerle sinerjik etkilerinden yararlanmak amacıyla kombine tedavide kullanılırlar. Stafilokoklara en etkili aminoglikozidler; amikasin ve netilmisindir (43).

Makrolidler:

Makrolidler bakterilerde protein sentezini geri dönüşümlü olarak inhibe ederek bakteriyostatik etki gösterirler. Metisiline dirençli *S. aureus* suşları genellikle eritromisine dirençlidir. Stafilokoklarda eritromisin etkinliğinin en az iki katı oranında klaritromisin ve azitromisin etkinliği söz konusudur (44).

Trimetoprim-sülfametoksazol:

Sülfonamidler, paraaminobenzoik asit analogları olup bu metabolik yolda dihidropteroat sentaz enzimini, trimetoprim ise dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe ederek bakterilerde tetrahidrofolik asit sentezini engeller. Yaygın ve uygunsuz kullanımı sonucu son yıllarda bu kombinasyona karşı birçok bakteride direnç gelişmiştir (43).

Kinolonlar:

Kinolonlar nalidiksik asit türevleridirler. DNA sentezini inhibe ederek etki gösterirler. Hedefleri DNA-giraz ve topoizomera IV enzimleridir. Kinolonlar DNA-enzim kompleksine bağlanarak süpersarmal oluşumunu engelleyerek hücre ölümüne neden olurlar. Siprofloksasin ve ofloksasinin klinik kullanıma girdiği ilk yıllarda *S. aureus*'a karşı çok iyi etkinlik gözlenmiş ancak kısa sürede direnç gelişmiştir. Levofloksasin gram pozitif ve atipik etkenlere karşı etkinliği artırılmış bir antibiyotiktir ve metisilin dirençli kökenlere de etkili olabilir (45).

Linkozamidler:

Linkozamid iki üyeden oluşmaktadır, linkomisin ve klindamisin. Ribozomun 50S subunitine bağlanarak protein sentezini inhibe ederler. Antibakteriyel spektrumları gram pozitif mikroorganizmalar ve anaerob mikroorganizmalarla sınırlıdır. Klindamisin genellikle metisiline duyarlı *S. aureus*'a karşı etkili ancak metisiline dirençli suşlara karşı etkili değildir (45).

Kloramfenikol:

Ribozomun 50S subunitine bağlanarak protein sentezini inhibe ederler. Direnç mekanizması plazmid kontrolünde sentezlenen ve hücre içi bir enzim olan kloramfenikol asetil transferaz enzim aktivitesidir (45).

Tetrasiklin:

Tetrasiklinler, bakteri ribozomlarında protein sentezini inhibe ederek bakteriyostatik etki gösterirler. Vücuttaki bakteri hücrelerini seçici olarak etkilerler. Bunun nedeni aktif transport mekanizmasının insan hücrelerinde bulunmamasıdır. Protein sentezini inhibe ederek etki gösteren antibiyotikler arasında en az seçicilik gösteren ilaçlardır. Stafilokoklar tet (K), tet (L), tet (M) olmak üzere üç direnç genine sahiptir (46).

Rifampisin:

DNA'ya bağımlı RNA polimeraz aktivitesini engelleyen, bakterisidal bir ilaçtır. Yüksek intraselüler düzeylere ulaşır ve biyofilme penetre olabilirler. RNA polimeraz enzimini kodlayan rpoB gen bölgesinde oluşan mutasyonlar rifampisin direncine yol açar (45).

Fusidik Asit:

Bakterinin protein sentezini ribozomlara bağlanmadan inhibe eden bir antibiyotiktir. Etki mekanizmasının özgüllüğü nedeniyle beta laktam antibiyotiklerle arasında çapraz direnç olmadığı bildirilmektedir. Fusidik asit çeşitli dokulara iyi yayılması, toksisitesinin ve alerjik reaksiyonlarının az olması nedeniyle hem sistemik hem de topikal metisilin dirençli stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde önerilen bir ilaçtır (47).

Streptograminler (Kinopristin/Dalfopristin):

Streptograminler bakterilerde ribozomların 50S subunitine birbirlerine yakın yerlerden ve geri dönüşümsüz olarak bağlanarak protein sentezini inhibe ederler. Kinopristin/dalfopristin; iki farklı streptogramin bileşiğinin sinerjik etki gösteren semisentetik bir kombinasyonudur. Tek başına sınırlı bir antibakteriyel etkiye sahip bu bileşikler birlikte sinerjistik etki oluşturmaları nedeniyle iyi bir antibakteriyel etkinlik gösterirler. Dar spektrumlu bir antibiyotik kombinasyonudur. Metisiline duyarlı ve dirençli stafilokok suşlarına etkilidirler (48).

Oksazolidinonlar (Linezolid-Eperozolid):

Etki mekanizması kendine özgü olup bakteriyel ribozomda 50S subunitinin 23S kısmına bağlanır. 70S başlatıcı kompleksin oluşumunu inhibe eder ve protein sentezini engellerler. Bu özgüllük nedeniyle diğer antibiyotiklerle çapraz direnç göstermezler. Metisiline duyarlı ve dirençli stafilokok suşlarına etkilidirler (49).

Mupirosin:

Primer ve sekonder deri enfeksiyonlarında etken olan stafilokoklara mükemmel in-vitro etkinlik gösterir. İzolösil-tRNA sentetazı inhibe ederek protein sentezini engeller. Metisiline dirençli stafilokokların büyük bir kısmı mupirosine duyarlı olmakla birlikte çoklu antibiyotik dirençli *S. aureus* suşları daha az duyarlıdır (50).

Glikopeptitler:

Bu grup antibiyotikler (vankomisin, teikoplanin, ristosetin, avoparsin) gram-pozitif bakterilerin hücre duvarını oluşturan peptidlerin terminal D-Ala-D-Ala dizisine bağlanarak transglikozilasyon reaksiyonunu ve peptidoglikan oluşumunu inhibe ederler. Çoğalmakta olan bakteriler üzerinde bakterisidal etki gösterirler.

Glikopeptidler metisiline duyarlı ve dirençli stafilokok suşlarına in vitro olarak çok etkilidir (45, 51).

2.10.2. Stafilokoklarda penisilin direnci

Penisilin G, 1940'lı yıllarda stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde başarı ile kullanılmış fakat kısa bir süre sonra penisilin G'ye dirençli suşlar izole edilmeye başlanmıştır (52). Stafilokoklardaki bu direncin nedeni penisilini parçalayan enzim (penisilinaz) üretimidir. Penisilinaz, ekstrakromozomal bir DNA parçası ya da plazmid tarafından kodlanan ve penisilin varlığında üretilen, yani indüklenebilen bir enzimdir. Penisilinaz veya daha geniş anlamda beta-laktamaz adı verilen bu enzim penisilini ve benzer antibiyotikleri, bakteriye zarar vermesine fırsat bırakmadan kimyasal olarak inaktive etmektedir. Stafilokoklarda tanımlanan beta-laktamaz; *blaZ* geni tarafından kodlanmaktadır. Bu gen bölgesinin ekspresyonu *blaR1*, *blaR2* (regulator) ve *blaI* (inhibitor) gibi düzenleyici genler ile sağlanmaktadır. İnhibisyondan sorumlu *blaI* geni ortamda beta laktam antibiyotik yokluğunda *blaZ* ve *blaR* gen bölgelerinin çalışmasını baskılar ve düşük seviyede beta-laktamaz üretimine sebep olur. Ortamda beta-laktam antibiyotik varlığında ise *blaR1* tarafından *blaZ* geni uyarılarak yüksek miktarda beta-laktamaz üretimi sağlanır (53).

2.10.3. Stafilokoklarda metisilin direnci

İlk olarak 1960 yılında metisilin, daha sonra da stafilokoklar tarafından üretilen penisilini parçalayan enzimlere (penisilinaz) dayanıklı penisilin türleri geliştirilmiştir. Ancak iki yıl gibi kısa bir süre sonra stafilokoklarda metisilin direnci saptanmıştır (52).

Antibiyotik direnci olmayan bir stafilokokta; PBP1, PBP2, PBP3 ve PBP4 olarak adlandırılan başlıca dört farklı PBP bulunmaktadır. Metisiline dirençli suşlarda ise penisilin direncinden sorumlu olan ve beta laktamlara düşük afinite gösteren, PBP2' ya da PBP2a olarak adlandırılan farklı bir PBP bulunmaktadır (54). PBP2a, *mecA* geni tarafından kodlanmaktadır. Bu gen indüklenebilir özellikte ve transdüksiyon ile dirençli suşlardan duyarlı suşlara aktarılabilir.

Son zamanlarda *mecA* gen homoloğu olan *mecA*_{LGA251}'in de metisilin direncinden sorumlu olduğu bildirilmiştir. Nükleotid dizilerine göre kıyaslandığında *mecA* ve *mecA*_{LGA251} % 70 oranında benzerlik göstermektedir. *mecA*_{LGA251} ilk olarak

sığırlardan elde edilen *S. aureus* suşlarında saptanmış ve yalnızca hayvanlarda bulunduğu kabul edilmiştir. Ancak yapılan son çalışmalarda *mecA*_{LGA251}'in insanlarda da metisilin direncinden sorumlu olduğu bildirilmiştir (55).

2.10.4. Stafilokoklarda metisilin direnç mekanizmaları

Stafilokoklardaki metisilin direnci üç farklı mekanizma ile gerçekleşmektedir.

2.10.4.1. Kromozomal (intrinsik) metisilin direnci;

En sık karşılaşılan direnç mekanizmasıdır. Metisilin direncinden sorumlu *mecA* genini taşıyan plazmid ve transpozonların yer aldığı gen kaseti, bakteri kromozomuna entegre olmaktadır. *mecA* geninin etkisi ile dirençli stafilokoklarda PBP2' ya da PBP2a denilen yeni bir PBP sentezlenmektedir. PBP2a beta-laktam antibiyotiklere karşı PBP'den daha düşük afinite göstermektedir. Buna bağlı olarak beta-laktam antibiyotikler PBP2a'ya bağlanmamaktadır. Sonuç olarak bakteri hücre duvarı için gerekli olan peptidoglikan sentezi devam etmektedir. Stafilokoklarda PBP2a sentezinin düzenlenmesinde *mecR1* ve *mecI* adı verilen iki düzenleyici gen önemli rol oynamaktadır. Bu genler *mecA* gen transkripsiyonunu düzenlemektedir. *mecR1* membrana bağlı bir sinyal taşıyıcı protein olan MecR1'i kodlarken *mecI* transkripsiyonel düzenleyici bir protein olan MecI'yı kodlar. MecR1 ve MecI proteinleri, beta-laktamaz üretiminin düzenleyici proteinleri olan BlaR1 ve BlaI proteinleri ile büyük oranda benzerlik gösterirler. BlaR1 ve BlaI proteinleri plazmid ilişkili, beta-laktamaz üretiminden sorumlu bir gen olan *blaZ* gen sisteminin düzenleyici proteinleri olup *blaR1* ve *blaI* genleri tarafından kodlanmaktadır. BlaR1 ve BlaI proteinlerini kodlayan genlerin düzenlenmesi *mecA* sistemi ile yüksek oranda dizi benzerliği gösterir. Bu durum *mecA* sisteminin düzenleyici genlerinin *blaZ* gen sisteminden geliştiğini düşündürmektedir. Operatör bölgelerin benzerliği dolayısıyla BlaI proteini, PBP2a üretimini etkileyebilmektedir (26). Bu nedenle *blaZ* geni, BlaR1 ve BlaI proteinleri kontrolünde PBP2a üretimini indükleyebilmektedir. Bu durum bir çok klinik MRSA suşunda görülmektedir (56). Beta-laktamaz üretimi indüklenebilir özellikte olabilmekte iken, PBP2a sentezi normal regülatör genlerin varlığında indüklenebilir değildir; ancak bazı suşlarda yüksek metisilin konsantrasyonlarında PBP2a sentezi bir miktar indüklenebilmektedir (26). Bunun nedeni MecI proteininin *mecA* geni üzerine olan baskılayıcı etkisinin, BlaI proteinin

blaZ geni üzerine olan baskılayıcı etkisinden daha güçlü olmasıdır. Bunun bir sonucu olarak; *mecA* geni taşıyor olsa da *mecI* ve *mecR1* regülatör bölgeleri sağlam olan suşlar, *mecI*'nın *mecA* üzerindeki baskılayıcı gen işlevini etkili olarak yapabilmesinden dolayı fenotipik olarak metisiline duyarlıdır. Bu MRSA izolatları pre-MRSA olarak adlandırılırlar (57). Kromozomal metisilin direnci fenotipik olarak üç şekilde ortaya çıkmaktadır;

Homojen direnç; koloniyi oluşturan bakteriler *mecA* genini taşırlar ve hepsinde bu gen eksprese olmuştur ve yüksek düzeyde dirence neden olmaktadır. Homojen direnç; ortamın pH'sı, ısısı, tuz konsantrasyonu, inkübasyon süresi gibi çevresel faktörlerden etkilenmez (58).

Heterojen direnç; *mecA* geni taşıyıp metisiline dirençli olduğu halde fenotipik olarak metisiline duyarlı görünen bakterilerin neden olduğu direnç türüdür. Stafilokoklarda metisilin heterojen direnci, homojen dirençten daha sık görülmekte ve saptanması daha güç olmaktadır. Bu direncin nedeninin *mecA* dışındaki düzenleyici genetik elemanların mutasyonu olabileceği düşünülmektedir. Hem genotipik özellikler hem de çevre şartları ile çok değişken olarak ortaya çıkan heterojen direnç nedeniyle dirençli bakteri fenotipik olarak duyarlı bulunabilmekte ve tedavinin başarısızlıkla sonuçlanmasına neden olabilmektedir (59).

Eagle-tip direnç; suşlar düşük metisilin konsantrasyonlarında metisiline duyarlı iken, yüksek konsantrasyonlarda dirençlidirler. Bu tip direncin, sağlam *mecA* regülatör genlerinin yüksek metisilin konsantrasyonlarında PBP2a sentezini indüklemeleri sonucu olduğu düşünülmektedir (58).

2.10.4.2. Aşırı miktarda beta-laktamaz salgılanması;

Beta-laktamaz salgılanması esas olarak penisiline karşı dirence neden olmaktadır. Metisilin bu enzimlere dayanıklıdır. Ancak enzimler aşırı miktarlarda salgılandıkları zaman metisilini de kısmen parçalayarak metisilin direncine neden olmaktadır (60). Bu direncin görüldüğü suşlar BORSA (Borderline resistant *S. aureus*) olarak adlandırılmaktadırlar (61).

2.10.4.3. PBP'lerdeki yapısal değişiklikler;

Bu tür direnç orta düzeyde metisilin direncine neden olmaktadır. Bu suşlar beta-laktamaz üretemezler ve *mecA* geni taşımazlar ancak metisiline dirençlidirler.

Bu direnç türünün mekanizmasının, PBP'lerin yapısındaki mutasyonel değişikliklerle ilgili olduğu düşünölmektedir. Son yıllarda beta-laktamaz negatif olup, *mecA* geni taşımadıkları halde, metisiline dirençli kökenler saptanmıştır. Çok az sayıdaki bu izolatlarda, mevcut PBP'lerin beta-laktam antibiyotiklere düşük afinite gösterdikleri görölmüştür. Bunun sonucu olarak bu tip dirençli suşlara modified resistant *S. aureus* (MODSA) adı verilmektedir (62).

3. MATERYAL ve METOT

Çalışmamızda Ocak 2010-Kasım 2013 tarihleri arasında Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilmiş çeşitli klinik örneklerden izole edilen 84 *S. aureus* ve 82 KNS izolatu olmak üzere toplam 166 izolat incelendi. İzolatların tanımlanması Vitek 2 (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemi ve konvansiyonel yöntemlerle yapıldı. İzolatların metisilin direnci disk difüzyon, mikrodilüsyon, PBP2a lateks aglütinasyon, kromojenik besiyeri, oksasilin tuz agar tarama testi ve polimerase chain reaction (PCR) yöntemleriyle belirlendi.

Çalışmamızda kullandığımız izolatlarda, aynı hastadan elde edilen yalnızca bir izolat kullanıldı. Disk difüzyon ve MİK sonuçları *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) ve *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* (BSAC) kriterleri göz önünde bulundurularak değerlendirildi.

3.1. Mikrobiyolojik Kültür ve İdentifikasyon İşlemleri

Laboratuvara gönderilen örnekler kanlı agara ekilerek 35±2°C'de 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. Yapılan kültürlerde üreyen stafilocok şüpheli kolonilerden öncelikle Gram boyası yapıldı. Gram pozitif kok olarak tespit edilen izolatlar lama yayılarak üzerlerine % 3'lük H₂O₂ damlatıldı. Gaz kabarcığı oluşturan, katalaz pozitif bakteriler stafilocok olarak kabul edildi. *S. aureus*'u diğer stafilocoklardan ayırmak için tüp koagülaz testi uygulandı. Stafilocok olduğuna karar verilen Gram pozitif, katalaz pozitif kolonilerden alınıp tavşan plazmasına (REMEL; UK) eklenerek etüvde 37 °C'de 4 saat inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon sonunda pıhtı oluşturan bakteriler *S. aureus* olarak kabul edildi. Pıhtı oluşturmayan bakteriler oda sıcaklığında 24 saat bekletilerek pıhtı oluşumu tekrar kontrol edildi. Pıhtı oluşturmayan bakteriler KNS olarak kabul edildi.

3.2. Kullanılan Besiyerleri

3.2.1. Kanlı agar

Dehidre kanlı agar (Himedia; India) besiyerinden 40 g/L konsantrasyonda olacak şekilde distile suya eklendi. Otoklavda 100 °C'de 10 dakika çözdürme ve 121°C'de 15 dakika sterilizasyon işlemine tabi tutuldu. Sterilizasyon işleminden sonra besiyeri 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra 56 ml/L olacak şekilde defibrine koyun kanı ilave edilerek karıştırıldı. Son karışımdaki koyun kanı oranı % 5 olarak elde edildi. Sonrasında her bir petriye 20 ml besiyeri döküldü. Hazırlanan besiyerleri soğuduktan sonra +4°C'de buzdolabında saklandı.

3.2.2. Mueller- Hinton agar (MHA)

Dehidre Mueller-Hinton agar (Himedia; India) besiyerinden 32 g/L konsantrasyonda olacak şekilde distile suya eklendi. Otoklavda 100°C'de 10 dakika çözdürme ve 121°C'de 15 dakika sterilizasyon işlemine tabi tutuldu. Sterilizasyon işleminden sonra 45-50°C'ye kadar soğutulan besiyeri, 90 mm çaplı tek kullanımlık petri kutularına 4 mm kalınlıkta olacak şekilde döküldü. Hazırlanan besiyeri soğuduktan sonra +4°C'de buzdolabında saklandı.

3.2.3. Triptik soy broth

Dehidre besiyerinden (GBL ROSEMEDIA; Spain) 30 g/L konsantrasyonda olacak şekilde distile su içine eklendi. Otoklavda 100°C'de 10 dakika çözdürme işlemine tabi tutuldu. Çözdürme işleminden sonra 4 ml'lik miktarlarda cam tüplere aktarıldı. Kapakları sıkıştırılmadan otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilizasyon işlemine tabi tutuldu. Hazırlanan besiyeri soğuduktan sonra +4°C'de buzdolabında saklandı.

3.2.4. Katyon ayarlı Mueller-Hinton broth (CAMHB)

Dehidre katyon ayarlı Mueller-Hinton broth (Himedia; India) besiyerinden 30 g/L distile su içine eklendi. Otoklavda 100°C'de 10 dakika çözdürme işlemine tabi tutuldu. Çözdürme işleminden sonra 4 ml'lik miktarlarda tüplere aktarıldı. Oksasilinin MİK değerini tespit için % 4 sodyum klorür (NaCl) içeren CAMHB hazırlanarak tüplere aktarıldı. Kapakları tamamen sıkıştırılmadan otoklavda

121°C'de 15 dakika sterilizasyon işlemine tabi tutuldu. Hazırlanan besiyeri oda sıcaklığına geldikten sonra taze olarak kullanıldı.

3.2.5. Oksasilin tuz agar

NaCl'den 40g/L ve dehidre MHA (Himedia; India) besiyerinden 32 g/L distile su içine ilave edildi. Otoklavda 100°C'de 10 dakika çözdürme ve 121°C'de 15 dakika sterilizasyon işlemine tabi tutuldu. Sterilizasyon işleminden sonra 45-50°C'ye kadar soğutulan besiyerine 6 µg/ml oksasilin (Sigma-Aldrich; China) eklendi ve 90 mm çaplı tek kullanımlık petri kutularına 4 mm kalınlıkta olacak şekilde döküldü. Hazırlanan besiyeri soğuduktan sonra +4°C'de buzdolabında saklandı.

3.2.6. Kromojenik besiyeri

Stafilokoklarda *mecA* gen varlığının belirlenmesi amacıyla BBL™ CHROMagar™ MRSA II (BD Diagnostics, US) besiyeri kullanıldı.

Mikrodilüsyon yöntemi için oksasilin (OX) ve sefoksitin (FOX) stok solüsyonu hazırlanışı : Oksasilinden (Sigma-Aldrich; China) 25 gr ve sefoksitinden (Sigma-Aldrich; China) 25 gr ayrı kaplarda 4,875 ml distile su ile karıştırılarak 5120 µg/ml stok solüsyonları hazırlandı. Sefoksitin için 0,5 ml stok solüsyonu ile 19,5 ml CAMBH karıştırılıp son konsantrasyonu 64 µg/ml olan solüsyon elde edildi. Oksasilin için aynı işlem % 4 NaCl içeren CAMHB kullanılarak yapıldı.

3.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

3.3.1. Disk difüzyon testi

S. aureus ve KNS izolatlarının oksasilin ve sefoksitin duyarlılığının disk difüzyon ile belirlenmesi CLSI önerilerine göre yapıldı.

- Buzdolabında +4°C'de saklanan diskler kullanımdan önce 10-15 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- % 5 koyun kanlı agara pasajlanmış bakteri kolonilerinden alınarak buyyon içinde 0,5 McFarland bulanıklığında bir süspansiyon hazırlandı.
- Bu süspansiyondan steril eküvyon ile MHA plağına ekim yapıldı.
- Ortalama 3-5 dakika beklendikten sonra 1 µg oksasilin (Himedia, India) ve 30 µg sefoksitin (Himedia, India) içeren diskler MHA plağına yerleştirildi.

- Plaklar, diskler yerleştirildikten sonra 15 dakika içinde etüve kondu.
- 35±2°C’de 24 saatlik inkübasyondan sonra inhibisyon zon çapları CLSI, EUCAST ve BSAC'a göre değerlendirildi (Tablo 3.1).
- Kontrol suşu olarak metisiline duyarlı *S. aureus* ATCC 25923 ve metisiline dirençli *S. aureus* ATCC 43300 kullanıldı.

CLSI; Disk difüzyon testlerinin değerlendirilmesinde *S. aureus* için oksasilin dirençli ve duyarlı zon çapları sırasıyla ≤ 10 mm ve ≥ 13 mm; sefoksitin için zon çapları ≤ 21 mm ve ≥ 22 mm olarak kabul edildi. KNS’ler için oksasilin dirençli ve duyarlı zon çapları sırası ile ≤ 17 mm ve ≥ 18 mm; sefoksitin için ≤ 24 mm ve ≥ 25 mm olarak kabul edildi (63,64).

Stafilokoklar için oksasilin duyarlılık zon çapları 2007 CLSI’ya göre değerlendirildi. Sefoksitin duyarlılık zon çapları 2013 CLSI’ya göre değerlendirildi.

EUCAST; Disk difüzyon testlerinin değerlendirilmesinde *S. aureus* için sefoksitin dirençli ve duyarlı zon çapları sırası ile ≤ 21 mm ve ≥ 22 mm, koagölaz negatif stafilokoklar için sefoksitin dirençli ve duyarlı zon çapları sırası ile ≤ 24 mm ve ≥ 25 mm olarak kabul edildi. *S. aureus* ve KNS için oksasilin zon çapları EUCAST kılavuzunda yer almadığından dolayı değerlendirme yapılamadı (65).

BSAC; Disk difüzyon testlerinin değerlendirilmesinde *S. aureus* ve KNS için oksasilin dirençli ve duyarlı zon çapları sırasıyla ≤ 14 mm ve ≥ 15 mm olarak kabul edildi. BSAC kılavuzunda 10 µg’lık sefoksitin disk kullanımı önerildiğinden dolayı sefoksitin zon çapları değerlendirmeye alınmadı (66).

3.3.2. Mikrodilüsyon testi

Mikrodilüsyon testi CLSI önerileri doğrultusunda yapıldı.

- Katyon ayarlı Mueller-Hinton broth’dan (CAMHB), U tabanlı 96 kuyucuklu mikroploğın tüm kuyucuklarına 100 µl konuldu (oksasilin MİK’i için % 2 NaCl eklenmiş CAMHB kullanıldı).
- Oksasilin ve sefoksitin aktif maddesi üretici firmanın önerileri doğrultusunda süspanse edildikten sonra, konsantrasyonu 64 µg/mL olacak şekilde CAMHB içinde solüsyonu hazırlandı.
- CAMHB konmuş mikroploğın 1’den 12’ye kadar olan yatay kuyucuklarının ilk kuyucuğuna konsantrasyonu 64 µg/mL olan antibiyotik

süspansiyonundan 100 µl konuldu ve 11. kuyucuğa kadar (11. kuyucuk hariç) seri dilüsyon yapıldı (32-0,062 µg/ml).

- Kanlı agar besiyerinde bir gece bekletilmiş kolonilerden CAMHB içine 0,5 McFarland (1×10^8 CFU/mL) yoğunlukta bakteri süspansiyonu elde edildi.
- Bu süspansiyon 1:10 sulandırıldıktan sonra 15 dakika içinde 11. kuyucuk hariç tüm kuyucuklara 5 µl eklendi ve kuyucuklardaki bakterinin son konsantrasyonu 5×10^5 CFU/mL olarak ayarlandı.
- Mikroplağın 11. kuyucuğuna sadece besiyeri konularak “sterilite kuyucuğu” oluşturuldu.
- Mikroplakların 12. kuyucuğuna ise antibiyotik konulmayıp, sadece besiyeri ve bakteri süspansiyonu konularak çalışmanın “üreme kontrol kuyucuğu” oluşturuldu.
- Üzeri parafilm ile kapatılan mikroplaklar $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de, 16-20 saat aerob koşullarda inkübe edildi ve üremenin olmadığı en düşük antimikrobiyal ilaç konsantrasyonu minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) olarak tespit edildi.
- Bulunan MİK değerleri CLSI, EUCAST ve BSAC'a göre değerlendirildi (Tablo 3.1).
- Kontrol suşu olarak metisiline duyarlı *S. aureus* ATCC 25923 ve metisiline dirençli *S. aureus* ATCC 43300 kullanıldı.

CLSI: *S. aureus* için oksasiline duyarlı ve dirençli MİK değerleri sırası ile ≤ 2 µg/ml ve ≥ 4 µg/ml, KNS'ler için $\leq 0,25$ µg/ml ve $\geq 0,5$ µg/ml olarak kabul edildi. *S. aureus* için sefoksitin duyarlı ve dirençli MİK değerleri sırası ile ≤ 4 µg/ml ve ≥ 8 µg/ml olarak kabul edildi. KNS'lerde sefoksitin için CLSI'da MİK yorumlama kriterleri bulunmamaktadır (64).

EUCAST: *S. aureus* için oksasiline duyarlı ve dirençli MİK değerleri sırası ile ≤ 2 µg/ml ve > 2 µg/ml, KNS'ler için $\leq 0,25$ µg/ml ve $\geq 0,5$ µg/ml olarak kabul edildi. *S. aureus* için sefoksitin duyarlı ve dirençli MİK değerleri sırası ile ≤ 4 µg/ml ve > 4 µg/ml olarak kabul edildi. KNS'lerde sefoksitin için EUCAST'da MİK yorumlama kriterleri bulunmamaktadır (65).

BSAC: *S. aureus* ve KNS için oksasilin duyarlı ve dirençli MİK değerleri sırası ile ≤ 2 µg/ml ve > 2 µg/ml olarak kabul edildi. *S. aureus* ve KNS için sefoksitin duyarlı ve dirençli MİK değerleri sırası ile ≤ 4 µg/ml ve > 4 µg/ml olarak kabul edildi (66).

Tablo 3.1. CLSI, EUCAST ve BSAC’a göre stafiloclarda OX ve FOX değerlendirme kriterleri (63, 64, 65, 66).

		<i>S. aureus</i>			KNS	
		S	I	R	S	R
CLSI	OX DD	≥ 13	11-12	≤ 10	≥ 18	≤ 17
	FOX DD	≥ 22		≤ 21	≥ 25	≤ 24
	OX MİK	≤ 2		≥ 4	$\leq 0,25$	$\geq 0,5$
	FOX MİK	≤ 4		≥ 8		
EUCAST	OX DD					
	FOX DD	≥ 22		≤ 21	≥ 25	≤ 24
	OX MİK	$2 \leq$		> 2	$0,25 \leq$	$> 0,25$
	FOX MİK	$4 \leq$		> 4		
BSAC	OX DD	≥ 15		≤ 14	≥ 15	≤ 14
	FOX DD					
	OX MİK	$2 \leq$		> 2	$2 \leq$	> 2
	FOX MİK	$4 \leq$		> 4	$4 \leq$	> 4

DD: Disk Difüzyon, MİK: Mikrodilüsyon, S: Duyarlı, I: Orta duyarlı, R: Dirençli, OX: Oksasilin, FOX: Sefoksitin

3.3.3. Oksasilin tuz agar tarama testi

Oksasilin tuz agar tarama testi CLSI önerilerine göre yapıldı.

- 6 µg/ml oksasilin ve % 4 NaCl içeren MHA hazırlandı.
- % 5 koyun kanlı agara pasajlanmış bakteri kolonilerinden alınarak buyyon içinde 0,5 McFarland bulanıklığında bir süspansiyon hazırlandı.
- Bu süspansiyondan steril eküvyon ile MHA plağına ekim yapıldı.
- Besiyerleri 35°C’de 24 saatlik inkübasyona tabi tutuldu.
- Kontrol suşu olarak metisiline duyarlı *S. aureus* ATCC 25923 ve metisiline dirençli *S. aureus* ATCC 43300 kullanıldı.
- Tek bir koloni üremesi halinde bile oksasiline dirençli kabul edildi.

3.3.4. Kromojenik besiyeri testi

BBL™ CHROMagar™ MRSA II (BD Diagnostics, US) besiyeri kullanıldı. Testin kullanımında üretici firmanın önerileri takip edildi.

- Buzdolabında +4°C’de saklanan besiyerleri kullanımdan önce 10-15 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
- Kanlı agar besiyerinde 35±2°C’de bir gece bekletilmiş bakteri kolonileriden kromojenik besiyerine tek koloni ekimleri yapıldı.
- Plaklar, ışığa fazla maruz bırakılmadan etüve kaldırıldı.
- 35±2°C’de 24 saatlik inkübasyondan sonra üreme varlığı ve renk oluşumları değerlendirildi.
- KNS’lerin kromojenik agara yapılan ekimlerinde çok sayıda farklı renk oluşumu gözleendiği için metisilin direnci açısından değerlendirmeye alınmadı.
- Kontrol suşu olarak metisiline duyarlı *S. aureus* ATCC 25923 ve metisiline dirençli *S. aureus* ATCC 43300 kullanıldı.

3.3.5. PBP2a lateks aglütinasyon testi

Bu test, metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) ve metisilin dirençli koagülaz negatif stafilokok (MRKNS)’ları tanımlamada kullanılan, stafilokok izolatlarında PBP2a’yı saptayan hızlı bir aglütinasyon testidir.

Lateks aglütinasyon testi Diagnostic Reagents (Oxoid; PBP2' Test Kit; UK) ticari kitleri ile yapıldı. Testin uygulanmasında üretici firmanın talimatları takip edildi. Kontrol suşu olarak metisiline duyarlı *S. aureus* ATCC 25923 ve metisiline dirençli *S. aureus* ATCC 43300 kullanıldı.

İnokulumun hazırlanması

Stafilokok izolatları kanlı agar besiyerine tek koloni ekimi yapıldı. Plaklar etüvde 35±2°C’de bir gecelik inkübasyona bırakıldı.

PBP2a ekstraksiyon prosedürü

- Mikrosantrifüj tüpüne 4 damla reagent-1 eklendi.

- Tüp içerisine 5 µl öze kullanılarak özenin iç çapını dolduracak kadar bakteri kolonisi ($1,5 \times 10^8$ hücre) alınıp süspanse edildi.
- Tüpte kümelenme olduğunda karışım vortekslendi.
- 95°C’de 3 dakika ısı bloğunda bekletildi.
- Oda sıcaklığına geldikten sonra bir damla reagent-2 eklendi ve iyice karıştırıldı.
- 4500 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi ve test için süpernatant kısmı kullanıldı.

Lateks aglütinasyon prosedürü

- Hazır lateks kartları kontrol ve test reagenti ile test etmek için işaretlendi.
- Lateks reagentleri birkaç kez çevrilerek karıştırıldı.
- İşaretli halkalara test lateksin veya kontrol lateksin 1 damlası eklendi.
- Halkalara 50 µl süpernatant konuldu ve karıştırma çubuğu ile karıştırıldı.
- 3 dakika içinde aglütinasyon oluşumunun gözlenmesi için ışık altında incelendi.
- Test bitiminde kartlar dezenfektan içine atıldı.

Lateks aglütinasyon testinin okuma ve yorumlanması

Aglütinasyon reaksiyonu 3 dakika içinde test lateksle görülüp, kontrol lateksle görülmediğinde PBP2a pozitif, her iki lateks reagenti ile de aglütinasyon oluşmadığında PBP2a negatif olarak değerlendirildi. Ayrıca kontrol lateks reagenti ile aglütinasyon görüldüğünde test belirsiz olarak yorumlandı.

3.3.6. Moleküler yöntem

PCR yöntemiyle *mecA* geninin saptanması:

mecA ve *mecA*_{LGA251} genini saptamak için In-House PCR yöntemi kullanıldı.

DNA ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu Genomic DNA Extraction Kit (RBC Real Genomics; US) ile firma önerileri doğrultusunda yapıldı.

- Stafilokok izolatları MHA besiyerine tek koloni ekimi yapıldıktan sonra plaklar etüvde 35±2°C’de bir gecelik inkübasyona bırakıldı.
- Ependorf tüpüne 3 McFarland'a ayarlanan bakteri solüsyonundan 1000 µl eklendi.
- 13000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı.
- 200 µl Lizozim Buffer eklenip vortekslendi ve oda sıcaklığında 10 dakika beklendi (2-3 dakikada bir ters-düz edildi).
- 200 µl GB Buffer eklendi ve 5 saniye vortekslendi.
- 70°C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı (2-3 dakikada bir ters-düz edildi).
- Bu aşamada Elution Buffer solüsyonu ısı bloğunda 70°C'ye koyuldu (her bir örnek için 200 µl).
- 200 µl Etanol eklendi ve 10 saniye vortekslendi (çökelme olan örneklerle pipetaj yapıldı).
- 2 ml'lik collection tüplere kolonları yerleştirildi ve bütün karışımı buraya döküldü.
- Kapakları kapatılıp 13000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
- Collection tüpleri atılıp filtreli tüp yeni collection tüpüne koyuldu.
- 400 µl W1 Buffer eklendi ve 13000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi.
- Collection tüpleri atılıp filtreli tüp yeni collection tüpüne koyuldu.
- 600 µl Wash Buffer (etanol eklenmiş) eklendi ve 13000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi.
- Collection tüpleri atılıp filtreli tüp yeni collection tüpüne koyuldu.
- 14000 rpm'de (full speed) 3 dakika santrifüj edildi.

- Collection tüpleri atılıp filtreli tüp 1,5 ml'lik ependorf tüpüne koyuldu
- 100 µl Elution Buffer eklendi (önceden ısıtılmış).
- Elution Buffer'in absorbe olması için 2 dakika beklendi.
- 13000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi.
- Filtreli tüp atıldı ve ependorfun kapağı kapatıldı.

DNA amplifikasyonu

Reaksiyon karışımının hazırlanması:

mecA amplifikasyon işlemi için aşağıda yer alan primer dizileri (İontec; TR) kullanıldı ve 533 bp DNA fragmentinin izlenmesi amaçlandı.

mecA Fw 5'-AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC-3'

mecA Rv 5'-AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-3'

mecA geninin saptanmasında bir test için gerekli olan reaksiyon karışımı bileşenleri ve miktarları aşağıdaki tabloya göre hazırlandı (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. *mecA* geni için karışım oranları.

10X Probe PCR Mix (Termo Scientific; US)	12,5 µl
<i>mecA</i> -F-Hung (5µM) (İontec; TR)	3 µl
<i>mecA</i> -R-Hung (5µM) (İontec; TR)	3 µl
dH ₂ O	3,5 µl
Örnek DNA	3 µl
Toplam Hacim	25,0 µl

*mecA*_{LGA251} amplifikasyonu için aşağıda yer alan primer dizileri (İontec; TR) kullanıldı ve 631 bp DNA fragmentinin izlenmesi amaçlandı.

<i>mecA</i> _{LGA251} Fw	5'-TCACCAGGTTCAAC[Y]CAAAA-3'
<i>mecA</i> _{LGA251} Rv	5'-CCTGAATC[W]GCTAATAATATTTC-3'

*mecA*_{LGA251} geninin saptanmasında bir test için gerekli olan reaksiyon karışımı bileşenleri ve miktarları aşağıdaki tabloya göre hazırlandı (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. *mecA*_{LGA251} geni için karışım oranları.

10X Probe PCR Mix (Termo Scientific; US)	12,5 µl
<i>mecA</i> _{LGA251} -F (5µM) (İontec ; TR)	3 µl
<i>mecA</i> _{LGA251} -R (5µM) (İontec; TR)	3 µl
dH ₂ O	3,5 µl
Örnek DNA	3 µl
Toplam Hacim	25,0 µl

Aplifikasyon işlemi için tabloda verilen miktarlar dikkate alınarak mikrosantrifüj tüplerinde karışımlar hazırlandı ve termal protokole tabi tutuldu.

Termal Protokol

0,2 ml mikrosantrifüj tüpünde 25 µl olarak hazırlanan reaksiyon karışımı termal döngü cihazında (CORBETT; Australia) amplifikasyon döngüsüne tabi tutuldu.

İlk denaturasyon 95°C 15:00 dakika

Primer bağlanma ve sentez

95 °C 00:45 dakika

48 °C 00:45 dakika

72 °C 00:45 dakika

} 5 kez tekrar edildi

Primer bağlanma ve sentez

95 °C 00:45 dakika

48 °C 00:45 dakika

72 °C 00:45 dakika

72 °C 10:00 dakika

} 35 kez tekrar edildi

Sonsuz inkübasyon 22 °C

Bakteri DNA'sının gösterilmesi:

Agaroz Jelin Hazırlanması

- Konsantrasyonu % 1,5 agaroz jel için 1 gr agaroz (Vivantis; US) ve 70 ml 0.5X Tris/Borate/EDTA (TBE) (Vivantis; US) solüsyonu karıştırıldı.
- 100-150°C'de, partiküller eriyip solüsyon homojen hale gelinceye kadar karıştırıldı.
- 4 µl Etidyum Bromür eklendi ve el yakmayacak sıcaklığa gelinceye kadar bekletildi.
- Taraklar ve tabak temizlendi ve jel dökme aparatı hazırlandı.
- Hava kabarcığı oluşturmamaya dikkat edilerek jel karışımı sabit hızda, ara vermeksizin, aparatın içine döküldü.

- Aparat kısırdatılmadan 10 dakika boyunca jelin tamamen donması beklendi.
- Taraklar çıkarıldı, jel, tabağıyla birlikte elektroforez tankına yerleştirildi.
- Jelin kurumaması için üzerini kaplayacak kadar 0.5X TBE konuldu.

Agaroz Jel Yürütme ve Görüntüleme Talimatı

- Parafilmin üzerine 1 µl Fermentas boya (Thermo Scientific; 6X DNA Loading US) koyuldu.
- Üzerine 5 µl PCR ürünü ya da 1 µl Fermentas marker (Thermo Scientific; Gene Ruler DNA Ladder Mix; US) koyuldu.
- Mikropipet toplam hacme ayarlandı.
- Örnekler mikropipetle bir iki defa karıştırıldıktan sonra jele yüklendi.
- Örnekler 140 voltta 20 dakika yürütüldü.
- Elektroforezden sonra jel UV transillüminatörde değerlendirildi.
- Elde edilen 533 bp'lik DNA fragmentleri *mecA* geni, 631 bp'lik DNA fragmenti *mecA*_{LGA251} geni pozitif olarak değerlendirildi.

İstatistiksel değerlendirme

İstatistiksel değerlendirme SPSS Versiyon 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) yazılımı kullanılarak yapıldı. Çalışma verilerinden eşik değerler elde etmek ve kullanılan yöntemlerin güvenilirliklerini belirlemek amacıyla receiver operating characteristic (ROC) eğri analizi yapıldı.

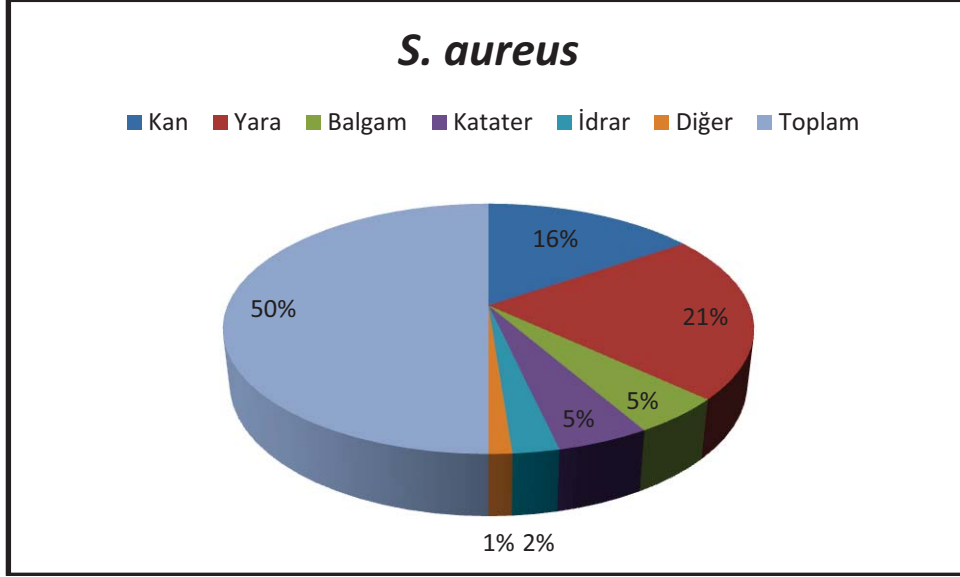
4. BULGULAR

Çeşitli klinik örneklerden izole edilen 84'ü *S. aureus*, 82'si KNS olmak üzere toplam 166 izolat çalışmaya alındı. Stafilocok örneklerinin kliniklere göre dağılımı Tablo 4.1'deki gibidir.

Tablo 4.1. Stafilocok izolatlarının kliniklere göre dağılımı.

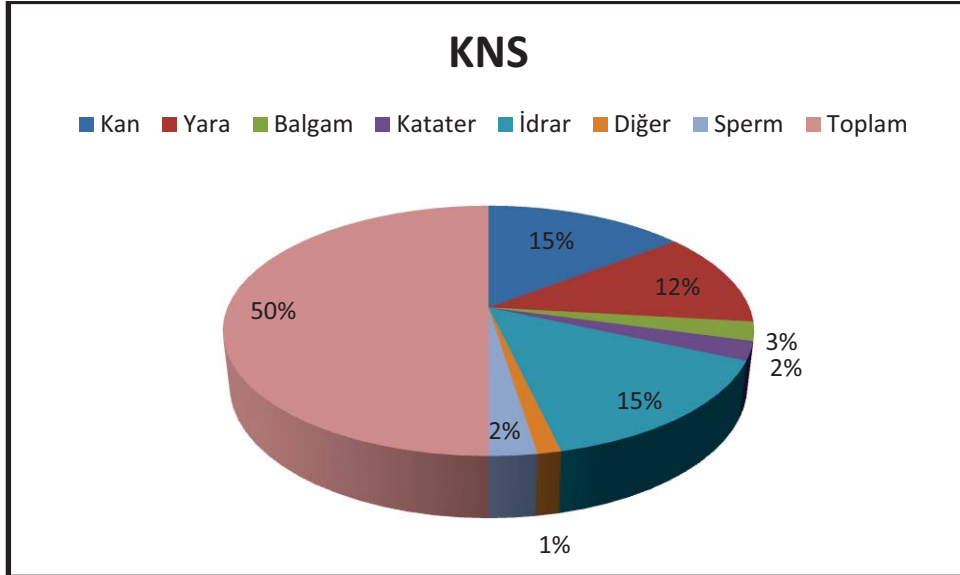
Klinik	Sayı
Kalp damar cerrahi	5
Çocuk cerrahi	2
Nöroloji	6
Kardiyoloji	5
Acil	20
Ortopedi	9
Nöroşirürji	3
Enfeksiyon hastalıkları	20
Kadın hastalıkları	7
Anestezi	20
Beyin ve sinir cerrahi	3
Cildiye	13
İç hastalıkları	17
Kulak burun boğaz	2
Genel cerrahi	7
Acil çocuk	3
Üroloji	11
Göz	1
Romatoloji	2
Tıbbi onkoloji	1
Çocuk sağlığı	6
Fizik tedavi rehabilitasyon	2
Plastik cerrahi	1
Toplam	166

S. aureus izolatlarının 26'sı kan kültüründen, 4'ü idrardan, 36'sı yaradan, 8'i balgamdan, 8'i kataterden ve 2'si diğer klinik örneklerden elde edildi (Grafik 4.1).



Grafik 4.1. *S. aureus* izolatlarının klinik örneklerle göre dağılımı.

Koagülaz negatif stafilokok izolatlarının 24'ü kan kültüründen, 24'ü idrardan, 20'si yaradan, 4'ü balgamdan, 4'ü kataterden, 4'ü sperm kültüründen ve 2'si diğer klinik örneklerden elde edildi (Grafik 4.2).



Grafik 4.2. KNS izolatlarının klinik örneklerle göre dağılımı.

PCR sonuçları:

Çalışmaya alınan 84 *S. aureus* izolatının 31 (% 36,9)'i *mecA* pozitif, 53 (% 63,1)'ü *mecA* negatif; 82 KNS izolatının 47 (% 57,3)'si *mecA* pozitif, 35 (% 42,7)'i *mecA* negatif olarak saptandı. Çalışmaya alınan 166 izolatın hiç birinde *mecA*_{LGA251} geni saptanmadı. PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü Şekil 4.1'deki gibidir.



Şekil 4.1. PCR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.

1-DNA ladder, 2-Pozitif kontrol, 3-Negatif kontrol, 4,5-*mecA* pozitif bulunan örnekler, 6-*mecA* negatif bulunan örnek, 7- *mecA* pozitif bulunan örnek.

Disk difüzyon test sonuçları:

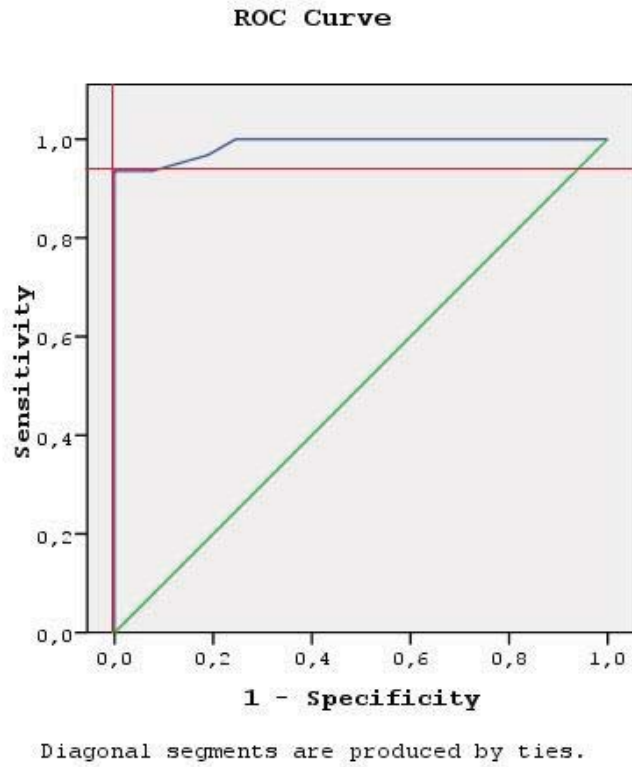
S. aureus için oksasilin disk difüzyon testinde CLSI'ya göre 55 (% 65,5) duyarlı, 29 (% 34,5) dirençli izolat; BSAC'a göre 53 (% 63,1) duyarlı, 31 (% 36,9) dirençli izolat saptandı. Yapılan istatistiksel analizlerde CLSI kılavuzuna göre oksasilin disk difüzyon testinin duyarlılığı % 93,5, özgüllüğü % 100,0, pozitif prediktif değer % 100,0, negatif prediktif değer % 96,4 ve test geçerliliği % 97,6 olarak saptandı. BSAC kılavuzuna göre oksasilin disk difüzyonun duyarlılığı % 93,5, özgüllüğü % 96,2, pozitif prediktif değer % 93,5, negatif prediktif değer % 96,2 ve test geçerliliği % 95,2 olarak saptandı (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. *S. aureus* için oksasilin disk difüzyon sonuçları ve istatistik değerleri.

<i>S. aureus</i>		ROC Disk OX			Disk CLSI OX			Disk BSAC OX		
	PCR	S	R	Top.	S	R	Top.	S	R	Top.
	(-)	53	0	53	53	0	53	51	2	53
	(+)	2	29	31	2	29	31	2	29	31
	Top.	55	29	84	55	29	84	53	31	84
	Duyarlılık sınır değeri	11,5			13			15		
	Duyarlılık	93,5			93,5			93,5		
	Özgüllük	100,0			100,0			96,2		
	PPD	100,0			100,0			93,5		
	NPD	96,4			96,4			96,2		
	Test Geçerliliği	97,6			97,6			95,2		

(-): *mecA* negatif, (+): *mecA* pozitif, S: Duyarlı, R: Dirençli, PPD: Pozitif prediktif değer, NPD: Negatif prediktif değer.

mecA varlığı referans alındığında yapılan ROC analizine göre *S. aureus* için oksasilin duyarlılık sınır değeri bizim çalışmamız için 11,5 mm olarak hesaplandı. Bu değer göz önünde bulundurulduğunda oksasilin disk difüzyon testinin duyarlılığı % 93,5, özgüllüğü %100,0 (AUC: 0,989 $p<0,001$ LB: 0,971 UB: 1,006), pozitif prediktif değer % 100,0, negatif prediktif değer % 96,4 ve test geçerliliği % 97,6 olarak saptandı (Grafik 4.3).



Grafik 4.3. *S. aureus* için oksasilin disk difüzyon testi ROC eğrisi.

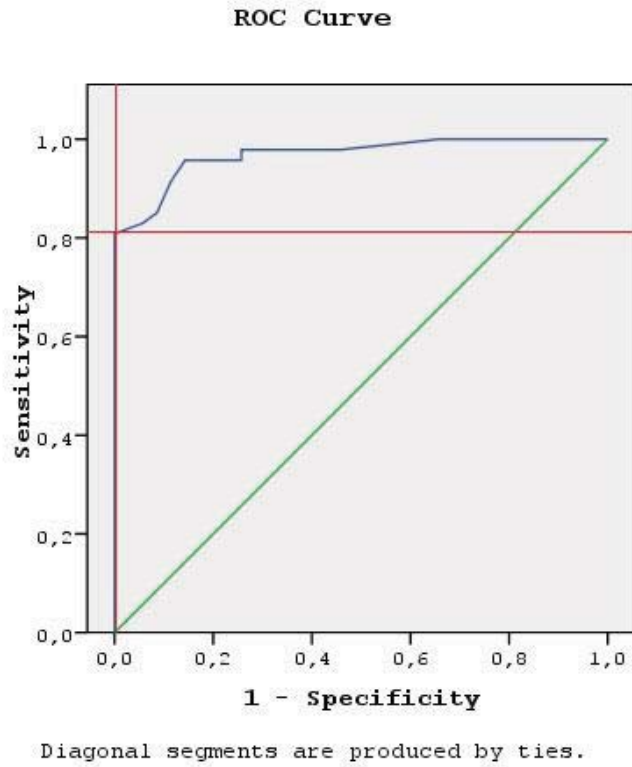
Koagülaz negatif stafilokoklar için oksasilin disk difüzyon testinde CLSI'ya göre 28 (% 34,1) duyarlı, 54 (% 65,9) dirençli izolat; BSAC'a göre 35 (% 42,7) duyarlı, 47 (% 57,3) dirençli izolat saptandı. Yapılan istatistiksel analizlerde CLSI kılavuzuna göre oksasilin disk difüzyon testinin duyarlılığı % 95,7, özgüllüğü % 74,3, pozitif prediktif değer % 83,3, negatif prediktif değer % 92,9 ve test geçerliliği % 86,6 olarak saptandı. BSAC kılavuzuna göre oksasilin disk difüzyon testinin duyarlılığı % 91,5, özgüllüğü % 88,6, pozitif prediktif değer % 91,5, negatif prediktif değer % 88,6 ve test geçerliliği % 90,2 olarak saptandı (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. KNS'ler için oksasilin disk difüzyon sonuçları ve istatistik değerleri.

KNS		ROC Disk OX			Disk CLSI OX			Disk BSAC OX		
	PCR	S	R	Top.	S	R	Top.	S	R	Top.
	(-)	30	5	35	26	9	35	31	4	35
	(+)	2	45	47	2	45	47	4	43	47
	Top.	32	50	82	28	54	82	35	47	82
	Duyarlılık sınır değeri	15,5			18			15		
	Duyarlılık	95,7			95,7			91,5		
	Özgüllük	85,7			74,3			88,6		
	PPD	90,0			83,3			91,5		
	NPD	93,8			92,9			88,6		
	Test Geçerliliği	91,5			86,6			90,2		

(-): *mecA* negatif, (+): *mecA* pozitif, S: Duyarlı, R: Dirençli, PPD:Pozitif prediktif değer, NPD: Negatif prediktif değer.

mecA varlığı referans alındığında yapılan ROC analizine göre KNS'ler için oksasilin duyarlılık sınır değeri bizim çalışmamız için 15,5 mm olarak hesaplandı. Bu değer göz önünde bulundurulduğunda oksasilin disk difüzyon testinin duyarlılığı % 95,7, özgüllüğü % 85,7 (AUC: 0,969 $p < 0,001$ LB: 0,937 UB: 1,001), pozitif prediktif değer % 90,0, negatif prediktif değer % 93,8 ve test geçerliliği ise % 91,5 olarak saptandı (Grafik 4.4).



Grafik 4.4. KNS'ler için oksasilin disk difüzyon testi ROC eğrisi.

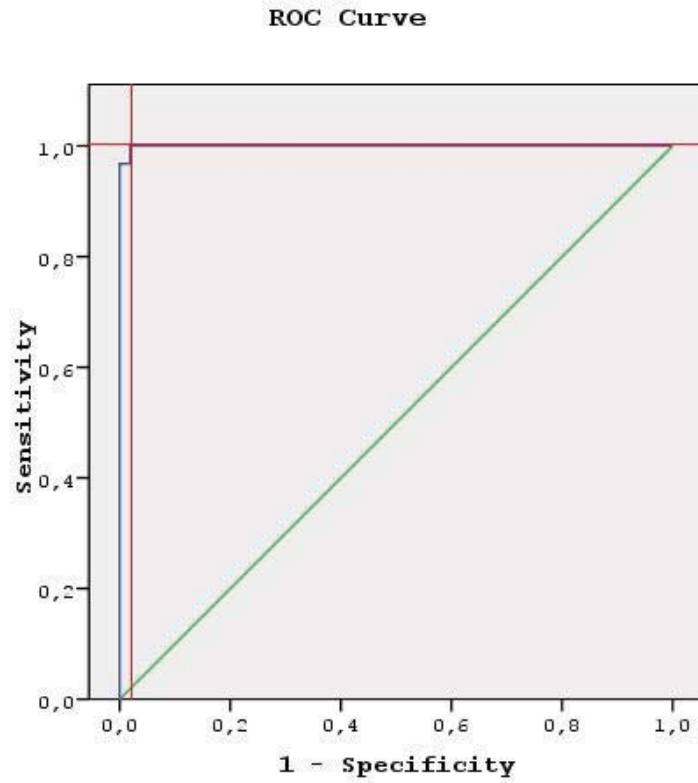
S. aureus için sefoksitin disk difüzyon testinde CLSI ve EUCAST'a göre 52 (% 61,9) duyarlı, 32 (% 38,1) dirençli izolat saptandı. Yapılan istatistiksel analizlerde CLSI kılavuzuna göre sefoksitin disk difüzyon testinin duyarlılığı % 100,0, özgüllüğü % 98,1, pozitif prediktif değer % 96,9, negatif prediktif değer % 100,0 ve test geçerliliği % 98,8 olarak saptandı. EUCAST kılavuzuna göre oksasilin disk difüzyonun duyarlılığı % 100,0, özgüllüğü % 98,1, pozitif prediktif değer % 96,9, negatif prediktif değer % 100,0 ve test geçerliliği % 98,8 olarak saptandı (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. *S. aureus* için sefoksitin disk difüzyon sonuçları ve istatistik değerleri.

<i>S. aureus</i>		ROC Disk FOX			Disk CLSI FOX			Disk EUCAST FOX		
	PCR	S	R	Top.	S	R	Top.	S	R	Top.
	(-)	52	1	53	52	1	53	52	1	53
	(+)	0	31	31	0	31	31	0	31	31
	Top.	52	32	84	52	32	84	52	32	84
	Duyarlılık sınır değeri	18			22			22		
	Duyarlılık	100,0			100,0			100,0		
	Özgüllük	98,1			98,1			98,1		
	PPD	96,9			96,9			96,9		
	NPD	100,0			100,0			100,0		
	Test Geçerliliği	98,8			98,8			98,8		

(-): *mecA* negatif, (+): *mecA* pozitif, S: Duyarlı, R: Dirençli, PPD:Pozitif prediktif değer, NPD: Negatif prediktif değer.

mecA varlığı referans alındığında yapılan ROC analizine göre *S. aureus* için sefoksitin duyarlılık sınır değeri bizim çalışmamız için 18 mm olarak hesaplandı. Bu değer göz önünde bulundurulduğunda sefoksitin disk difüzyon testinin duyarlılığı % 100,0, özgüllüğü % 98,1 (AUC: 0,999 $p < 0,001$ LB: 0,997 UB: 1,001) pozitif prediktif değer % 96,9, negatif prediktif değer % 100,0 ve test geçerliliği ise % 98,8 olarak saptandı (Grafik 4.5).



Grafik 4.5. *S. aureus* için sefoksitin disk difüzyon testi ROC eğrisi.

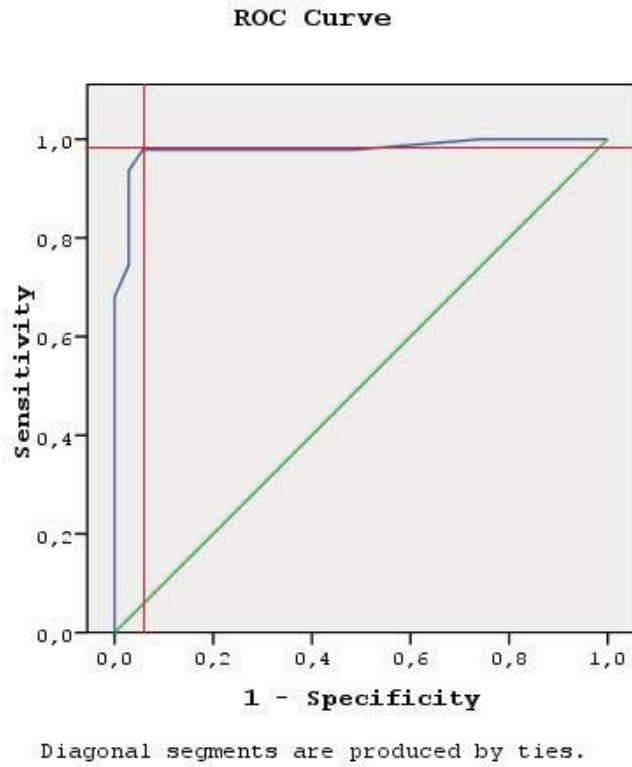
Koagülaz negatif stafilokoklar için sefoksitin disk difüzyon testinde CLSI ve EUCAST'a göre 34 (% 41,5) duyarlı, 48 (% 58,5) dirençli izolat saptandı. Yapılan istatistiksel analizlerde CLSI kılavuzuna göre sefoksitin disk difüzyon testinin duyarlılığı % 99,9, özgüllüğü % 94,3, pozitif prediktif değer % 95,8, negatif prediktif değer % 97,1 ve test geçerliliği % 96,3 olarak saptandı. EUCAST kılavuzuna göre oksasilin disk difüzyonun duyarlılığı % 97,9, özgüllüğü % 94,3, pozitif prediktif değer % 95,8, negatif prediktif değer % 97,1 ve test geçerliliği % 96,3 olarak saptandı (Tablo 4.5).

Tablo 4.5. KNS'ler için sefoksitin disk difüzyon sonuçları ve istatistik değerleri.

KNS		ROC Disk FOX			Disk CLSI FOX			Disk EUCAST FOX		
	PCR	S	R	Top.	S	R	Top.	S	R	Top.
	(-)	33	2	35	33	2	35	33	2	35
	(+)	1	46	47	1	46	47	1	46	47
	Top.	34	48	82	34	48	82	34	48	82
	Duyarlılık sınır değeri	23,5			25			25		
	Duyarlılık	97,9			97,9			97,9		
	Özgüllük	94,3			94,3			94,3		
	PPD	95,8			95,8			95,8		
	NPD	97,1			97,1			97,1		
	Test Geçerliliği	96,3			96,3			96,3		

(-): *mecA* negatif, (+): *mecA* pozitif, S: Duyarlı, R: Dirençli, PPD:Pozitif prediktif değer, NPD: Negatif prediktif değer.

mecA varlığı referans alındığında yapılan ROC analizine göre KNS'ler için sefoksitin duyarlılık sınır değeri bizim çalışmamız için 23,5 mm olarak hesaplandı. Bu değer göz önünde bulundurulduğunda sefoksitin disk difüzyon testinin duyarlılığı % 97,9, özgüllüğü % 94,3 (AUC: 0,979 $p < 0,001$ LB: 0,948 UB: 1,009) pozitif prediktif değer % 95,8, negatif prediktif değer % 97,1 ve test geçerliliği ise % 96,3 olarak saptandı (Grafik 4.6).



Grafik 4.6. KNS'ler için sefoksitin disk difüzyon testi ROC eğrisi.

Mikrodilüsyon Sonuçları:

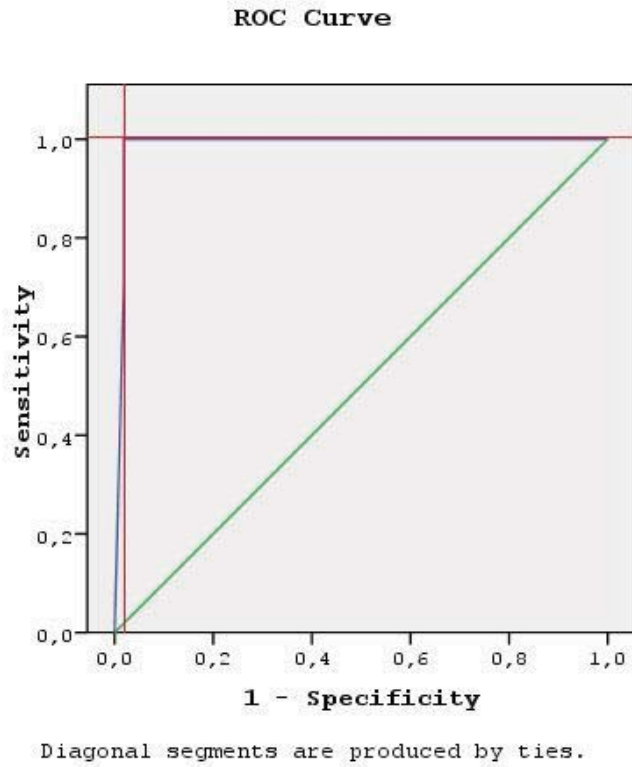
S. aureus için oksasiline MİK testinde CLSI, EUCAST ve BSAC'a göre 51 (% 60,7) duyarlı, 33 (% 39,3) dirençli izolat saptandı. Yapılan istatistiksel analizlerde CLSI, BSAC ve EUCAST kılavuzlarına göre oksasiline MİK testinin duyarlılığı % 100,0, özgüllüğü % 96,2, pozitif prediktif değer % 93,9, negatif prediktif değer % 100,0 ve test geçerliliği % 97,6 olarak saptandı (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. *S. aureus* için oksasiline MİK sonuçları ve istatistik değerleri.

<i>S. aureus</i>		ROC MİK OX			MİK CLSI OX			MİK EUCAST OX			MİK BSAC OX		
	PCR	S	R	Top.	S	R	Top.	S	R	Top.	S	R	Top.
	(-)	52	1	53	51	2	53	51	2	53	51	2	53
	(+)	0	31	31	0	31	31	0	31	31	0	31	31
	Top.	52	32	84	51	33	84	51	33	84	51	33	84
	Duyarlılık sınır değeri	6			2			2			2		
	Duyarlılık	100,0			100,0			100,0			100,0		
	Özgüllük	98,1			96,2			96,2			96,2		
	PPD	96,9			93,9			93,9			93,9		
	NPD	100,0			100,0			100,0			100,0		
	Test Geçerliliği	98,8			97,6			97,6			97,6		

(-): *mecA* negatif, (+): *mecA* pozitif, S: Duyarlı, R: Dirençli, PPD: Pozitif prediktif değer, NPD: Negatif prediktif değer.

mecA varlığı referans alındığında yapılan ROC analizine göre *S. aureus* için oksasilin MİK duyarlılık sınır değeri bizim çalışmamız için 6 mg/L olarak hesaplandı. Bu değer göz önünde bulundurulduğunda oksasilin MİK testinin duyarlılığı % 100,0, özgüllüğü % 98,1 (AUC: 0,988 $p < 0,001$ LB: 0,963 UB: 1,013) pozitif prediktif değer % 96,9, negatif prediktif değer % 100,0 ve test geçerliliği ise % 98,8 olarak saptandı (Grafik 4.7).



Grafik 4.7. *S. aureus* için oksasilin MİK testi ROC eğrisi.

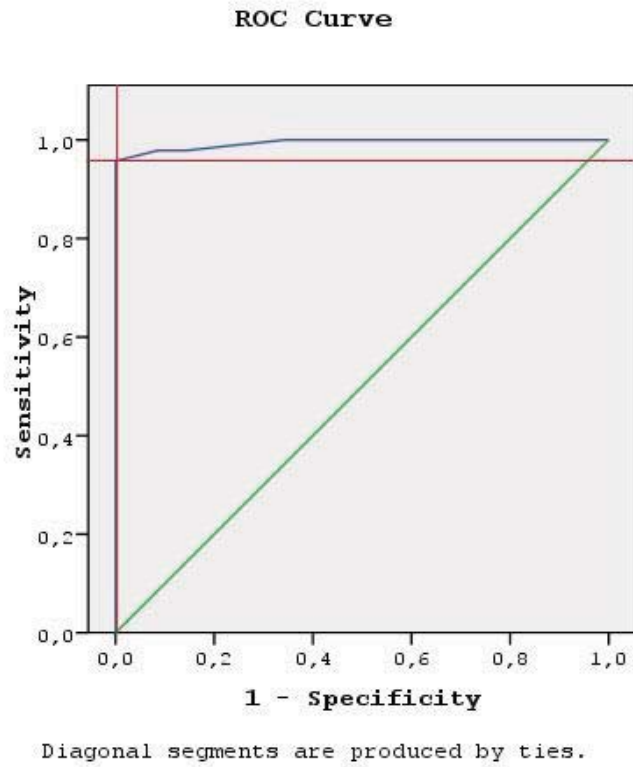
Koagülaz negatif stafilokoklar için oksasilin MİK testinde CLSI ve EUCAST'a göre 23 (% 28,0) duyarlı, 59 (% 72,0) dirençli izolat; BSAC'a göre 37 (% 45,1) duyarlı, 45 (% 54,9) dirençli izolat saptandı. Yapılan istatistiksel analizlerde CLSI ve EUCAST kılavuzlarına göre oksasilin MİK testinin duyarlılığı % 100,0, özgüllüğü % 65,7, pozitif prediktif değer % 79,7, negatif prediktif değer % 100,0 ve test geçerliliği % 85,4 olarak saptandı. BSAC kılavuzuna göre oksasilin MİK testinin duyarlılığı % 95,7, özgüllüğü %100,0, pozitif prediktif değer % 100,0, negatif prediktif değer % 94,6 ve test geçerliliği % 97,6 olarak saptandı (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. KNS'ler için oksasilin MİK sonuçları ve istatistik değerleri.

KNS		ROC MİK OX			MİK CLSI OX			MİK EUCAST OX			MİK BSAC OX		
	PCR	S	R	Top.	S	R	Top.	S	R	Top.	S	R	Top.
	(-)	35	0	35	23	12	35	23	12	35	35	0	35
	(+)	2	45	47	0	47	47	0	47	47	2	45	47
	Top.	37	45	82	23	59	82	23	59	82	37	45	82
	Duyarlılık sınır değeri	3			0,25			0,25			2		
	Duyarlılık	95,7			100,0			100,0			95,7		
	Özgüllük	100,0			65,7			65,7			100,0		
	PPD	100,0			79,7			79,7			100,0		
	NPD	94,6			100,0			100,0			94,6		
	Test Geçerliliği	97,6			85,4			85,4			97,6		

(-): *mecA* negatif, (+): *mecA* pozitif, S: Duyarlı, R: Dirençli, PPD:Pozitif prediktif değer, NPD: Negatif prediktif değer.

mecA varlığı referans alındığında yapılan ROC analizine göre KNS'ler için oksasilin MİK duyarlılık sınır değeri bizim çalışmamız için 3 mg/L olarak hesaplandı. Bu değer göz önünde bulundurulduğunda oksasilin MİK testinin duyarlılığı % 95,7, özgüllüğü %100,0 (AUC: 0,994 $p<0,001$ LB: 0,982 UB: 1,005) pozitif prediktif değer % 100,0, negatif prediktif değer % 94,6 ve test geçerliliği ise % 97,6 olarak saptandı (Grafik 4.8).



Grafik 4.8. KNS'ler için oksasilin MİK testi ROC eğrisi.

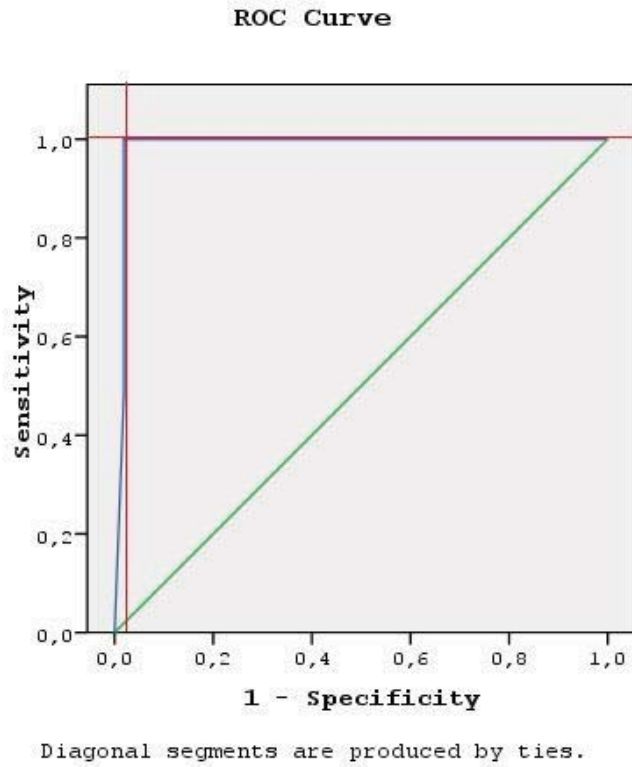
S. aureus için sefoksitin MİK testinde CLSI, EUCAST ve BSAC'a göre 52 (% 61,9) duyarlı, 32 (% 38,1) dirençli izolat saptandı. Yapılan istatistiksel analizlerde CLSI, EUCAST ve BSAC kılavuzlarına göre sefoksitin MİK testinin duyarlılığı % 100,0, özgüllüğü % 98,1, pozitif prediktif değer % 96,9, negatif prediktif değer % 100,0 ve test geçerliliği % 98,8 olarak saptandı (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. *S. aureus* için sefoksitin MİK sonuçları ve istatistik değerleri.

<i>S. aureus</i>		ROC MİK FOX			MİK CLSI FOX			MİK EUCAST FOX			MİK BSAC FOX		
	PCR	S	R	Top.	S	R	Top.	S	R	Top.	S	R	Top.
	(-)	52	1	53	52	1	53	52	1	53	52	1	53
	(+)	0	31	31	0	31	31	0	31	31	0	31	31
	Top.	52	32	84	52	32	84	52	32	84	52	32	84
	Duyarlılık sınır değeri	6			4			4			4		
	Duyarlılık	100,0			100,0			100,0			100,0		
	Özgüllük	98,1			98,1			98,1			98,1		
	PPD	96,9			96,9			96,9			96,9		
	NPD	100,0			100,0			100,0			100,0		
	Test Geçerliliği	98,8			98,8			98,8			98,8		

(-): *mecA* negatif, (+): *mecA* pozitif, S: Duyarlı, R: Dirençli, PPD: Pozitif prediktif değer, NPD: Negatif prediktif değer.

mecA varlığı referans alındığında yapılan ROC analizine göre *S. aureus* için sefoksitin MİK duyarlılık sınır değeri bizim çalışmamız için 6 mg/L olarak hesaplandı. Bu değer göz önünde bulundurulduğunda sefoksitin MİK testinin duyarlılığı % 100,0, özgüllüğü % 98,1 (AUC: 0,986 $p < 0,001$ LB: 0,957 UB: 1,014) pozitif prediktif değer % 96,9, negatif prediktif değer % 100,0 ve test geçerliliği ise % 98,8 olarak saptandı (Grafik 4.9).



Grafik 4.9. *S. aureus* için sefoksitin MİK testi ROC eğrisi.

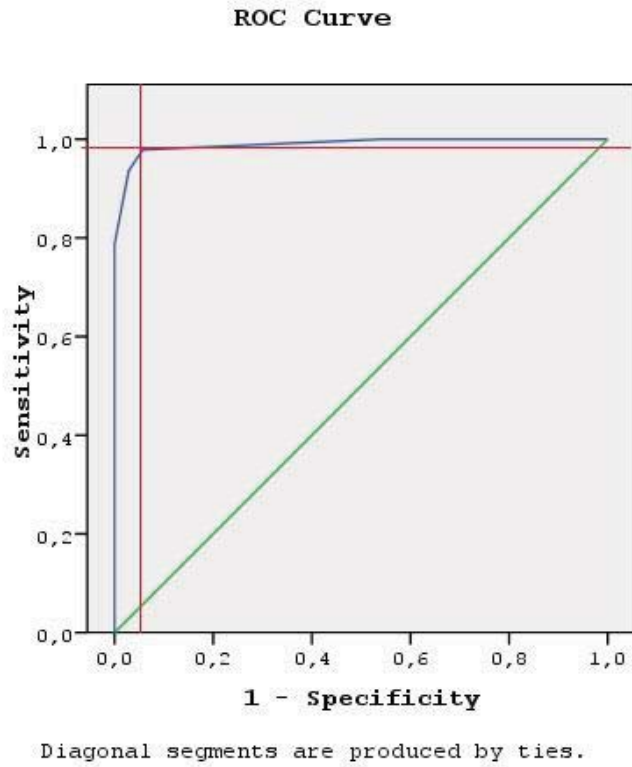
Koagülaz negatif stafilokoklar için sefoksitin MİK BSAC'a göre 34 (% 41,5) duyarlı, 48 (% 58,5) dirençli izolat saptandı. Yapılan istatistiksel analizlerde BSAC kılavuzuna göre sefoksitin MİK testinin duyarlılığı % 97,9, özgüllüğü % 94,3, pozitif prediktif değer % 95,8, negatif prediktif değer % 97,1 ve test geçerliliği % 96,3 olarak saptandı (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. KNS'ler için sefoksitin MİK sonuçları ve istatistik değerleri.

KNS		ROC MİK FOX			MİK BSAC FOX		
	PCR	S	R	Top.	S	R	Top.
	(-)	33	2	35	33	2	35
	(+)	1	46	47	1	46	47
	Top.	34	48	82	34	48	82
	Duyarlılık sınır değeri	6			4		
	Duyarlılık	97,9			97,9		
	Özgüllük	94,3			94,3		
	PPD	95,8			95,8		
	NPD	97,1			97,1		
	Test Geçerliliği	96,3			96,3		

(-): *mecA* negatif, (+): *mecA* pozitif, S: Duyarlı, R: Dirençli, PPD:Pozitif yorumlama gücü, NPD: Negatif yorumlama gücü.

mecA varlığı referans alındığında yapılan ROC analizine göre KNS'ler için sefoksitin MİK duyarlılık sınır değeri bizim çalışmamız için 6 mg/L olarak hesaplandı. Bu değer göz önünde bulundurulduğunda sefoksitin MİK testinin duyarlılığı % 97,9, özgüllüğü % 94,3 (AUC: 0,990 $p < 0,001$ LB: 0,973 UB: 1,006) pozitif prediktif değer % 95,8, negatif prediktif değer % 97,1 ve test geçerliliği % 96,3 olarak saptandı (Grafik 4.10).



Grafik 4.10. KNS'ler için sefoksitin MİK testi ROC eğrisi.

Tuz agar tarama ve PBP2a lateks aglütinasyon test sonuçları:

S. aureus için tuz agar tarama testinde CLSI'ya göre 51 (% 60,7) duyarlı, 33 (% 39,3) dirençli izolat saptandı. Lateks aglütinasyon testinde 54 (% 64,3) duyarlı, 30 (% 35,7) dirençli izolat saptandı. CLSI kılavuzuna göre *S. aureus* için tuz agar testinin duyarlılığı % 100,0, özgüllüğü % 96,2, pozitif prediktif değer % 93,9, negatif prediktif değer % 100,0 ve test geçerliliği % 97,6 olarak saptandı. PBP2a latex aglütinasyon testinin duyarlılığı % 96,8, özgüllüğü % 100,0, pozitif prediktif değer % 100,0, negatif prediktif değer % 98,1 ve test geçerliliği % 98,8 olarak saptandı (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. *S. aureus* için tuz agar ve PBP2a lateks aglütinasyon sonuçları ve istatistik değerleri.

<i>S. aureus</i>		Tuz agar			PBP2a lateks aglütinasyon		
	PCR	S	R	Top.	S	R	Top.
	(-)	51	2	53	53	0	53
	(+)	0	31	31	1	30	31
	Top.	51	33	84	54	30	84
	Duyarlılık	100,0			96,8		
	Özgüllük	96,2			100,0		
	PPD	93,9			100,0		
	NPD	100,0			98,1		
	Test Geçerliliği	97,6			98,8		

(-): *mecA* negatif, (+): *mecA* pozitif, S: Duyarlı, R: Dirençli, PPD: Pozitif prediktif değer, NPD: Negatif prediktif değer.

Koagülaz negatif stafilokoklar için tuz agar tarama testinde CLSI'ya göre 37 (% 45,1) duyarlı, 45 (% 54,9) dirençli izolat saptandı. PBP2a lateks aglütinasyon testinde 50 (% 70,0) duyarlı, 32 (% 39,0) dirençli izolat saptandı. CLSI kılavuzuna göre KNS'ler için tuz agar testinin duyarlılığı % 93,6, özgüllüğü % 97,1, pozitif prediktif değer % 97,8, negatif prediktif değer % 91,9 ve test geçerliliği % 95,1 olarak saptandı. PBP2a lateks aglütinasyon testinin duyarlılığı % 68,1, özgüllüğü % 100,0, pozitif prediktif değer % 100,0, negatif prediktif değer % 70,0 ve test geçerliliği % 81,7 olarak saptandı (Tablo 4.11).

Tablo 4.11. KNS'ler için tuz agar ve PBP2a lateks aglütinasyon sonuçları ve istatistik değerleri.

KNS		Tuz agar			PBP2a lateks aglütinasyon		
	PCR	S	R	Top.	S	R	Top.
	(-)	34	1	35	35	0	35
	(+)	3	44	47	15	32	47
	Top.	37	45	82	50	32	82
	Duyarlılık	93,6			68,1		
	Özgüllük	97,1			100,0		
	PPD	97,8			100,0		
	NPD	91,9			70,0		
	Test Geçerliliği	95,1			81,7		

(-): *mecA* negatif, (+): *mecA* pozitif, S: Duyarlı, R: Dirençli, PPD: Pozitif prediktif değer, NPD: Negatif prediktif değer.

Kromojenik agar test sonuçları:

Kromojenik agar testinde 84 *S. aureus* izolatlarının 31 (% 36,9)'i dirençli, 53 (% 63,1)'ü duyarlı olarak saptandı. *S. aureus* için kromojenik agar testinin duyarlılığı % 93,5, özgüllüğü % 96,2, pozitif prediktif değer % 93,5, negatif prediktif değer % 98,1 ve test geçerliliği % 95,2 olarak saptandı (Tablo 4.12).

Tablo 4.12. *S. aureus* için kromojenik agar testi sonuçları ve istatistik değerleri.

<i>S. aureus</i>		Kromojenik agar		
	PCR	S	R	Top.
	(-)	51	2	53
	(+)	2	29	31
	Top.	53	31	84
	Duyarlılık	93,5		
	Özgüllük	96,2		
	PPD	93,5		
	NPD	98,1		
	Test Geçerliliği	95,2		

(-): *mecA* negatif, (+): *mecA* pozitif, PPD: Pozitif prediktif değer, NPD: Negatif prediktif değer.

CLSI kriterlerine göre metisilin direncini saptamada duyarlılığı en yüksek olan yöntem *S. aureus*'larda FOX disk difüzyon ve FOX MİK, KNS'lerde ise FOX disk difüzyon yöntemi olarak saptandı. EUCAST kriterlerine göre *S. aureus*'larda FOX disk difüzyon ve FOX MİK, KNS'lerde FOX disk difüzyon yöntemi olarak saptandı. BSAC kriterlerine göre *S. aureus*'larda FOX MİK, KNS'lerde ise OX MİK ve FOX MİK benzer olarak tespit edildi. Oksasilin tuz agar, PBP2a lateks aglütinasyon, kromojenik agar yöntemleri kıyaslandığında *S. aureus*'larda oksasilin tuz agar ve PBP2a lateks aglütinasyon yöntemleri ile benzer sonuçlar elde edilmiş olup FOX disk difüzyon yöntemine yakın olarak bulunmuştur. KNS'lerde bu üç yöntem kıyaslandığında kromojenik agar yönteminin kullanılamayacağı, diğer iki yöntemin de sonuçlarının FOX disk difüzyon yönteminden daha düşük sonuçlar elde edildiği görülmüştür. CLSI kriterleri ve EUCAST kriterleri göz önünde bulundurulduğunda FOX disk difüzyon yönteminin tüm stafilokoklarda metisilin direncini belirlemede en uygun yöntem olduğu anlaşılmıştır. Yöntemlere ve kılavuzlara göre testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü Tablo 4.13'te verilmiştir.

Tablo 4.13. Yöntemlere ve kılavuzlara göre testlerin duyarlılık ve özgüllükleri.

Bakteri	Kılavuz	Yöntem		Duyarlılık	Özgüllük
S. aureus	CLSI	DD	OX	93,5	100,0
			FOX	100,0	98,1
		MİK	OX	100,0	96,2
			FOX	100,0	98,1
	EUCAST	DD	OX	-	-
			FOX	100,0	98,1
		MİK	OX	100,0	96,2
			FOX	100,0	98,1
	BSAC	DD	OX	93,5	96,2
			FOX	-	-
		MİK	OX	100,0	96,2
			FOX	100,0	98,1
		Tuz agar		100,0	96,2
		PBP2a lateks		96,8	100,0
		Kromojenik agar		93,5	96,2
KNS	CLSI	DD	OX	95,7	74,3
			FOX	97,9	94,3
		MİK	OX	100,0	65,7
			FOX	-	-
	EUCAST	DD	OX	-	-
			FOX	97,9	94,3
		MİK	OX	100,0	65,7
			FOX	-	-
	BSAC	DD	OX	91,5	88,6
			FOX	-	-
		MİK	OX	95,7	100,0
			FOX	97,9	94,3
		Tuz agar		93,6	97,1
		PBP2a lateks		68,1	100,0
		Kromojenik agar		-	-

DD: Disk difüzyon, MİK: Mikrodilüsyon, OX: Oksasilin, FOX: Sefoksitin

5. TARTIŞMA

Stafilokoklar hem toplum hem de hastane kaynaklı enfeksiyonlarda uzun yıllardan beri önemini kaybetmeyen mikroorganizmalardan biridir. Stafilokok enfeksiyonları sürekli artmakta ve aynı zamanda bu bakterilerdeki çoklu ilaç direnci nedeniyle oluşturdukları hastalıkların tedavisi giderek güçleşmektedir. Penisilin kullanıma girmesiyle stafilokoklara bağlı invaziv enfeksiyonların mortalite oranlarında önemli bir düşüş saptanmıştır. Ancak hızlı bir şekilde, önce benzilpenisilinlere sonra da yarı sentetik penisilinlere direnç gelişmiştir. Bunu takiben metisilin dirençli stafilokok suşları ortaya çıkmış ve ciddi bir klinik problem oluşturmuşlardır. Metisilin dirençli suşlar *mecA* geni tarafından kodlanan, beta-laktam antibiyotiklere düşük afiniteli bir PBP olan PBP2a üretmeleri nedeniyle metisiline ve diğer beta-laktam antibiyotiklere direnç geliştirmiştir. Günümüzde MRS tüm dünyada yaygın olarak görülmekte olup, prevalansı ülkeler arasında farklılıklar göstermektedir (67).

Metisilin dirençli stafilokoklara rastlanma oranı hastanede yatan hastalarda, toplumdaki hastalara kıyasla daha yüksektir (68). Özellikle invaziv işlemler başta olmak üzere, hastanede uzun süreli yatış, ileri yaş, altta yatan ciddi hastalıklar ve önceden antibiyotik kullanımı, bu mikroorganizmalara bağlı gelişen enfeksiyonlar açısından en önemli risk faktörleridir. Risk faktörleri arasında özellikle yoğun bakım üniteleri, cerrahi birimler, diyaliz üniteleri ve AIDS hastalarının tedavi edildiği üniteler bulunmaktadır (17).

Metisiline dirençli stafilokoklara bağlı olarak gelişen enfeksiyonlarda erken tanı ve doğru tedavi büyük önem taşımaktadır. Stafilokoklarda özellikle yüksek düzey heterojen direnç nedeniyle, dirençli suşlar sıklıkla gözden kaçabilir. Fenotipik yöntemlerle metisilin direncinin saptanması, uygulanan test yönteminin koşullarından etkilenmektedir. İnokulum miktarı, inkübasyon ısısı ve süresi, ortamın pH'sı ve NaCl konsantrasyonu gibi faktörler direncin belirlenmesinde rol oynar. Bu nedenle direnç tespitinde *mecA* gen bölgesi varlığının gösterilmesi, en uygun yöntem olarak kabul edilmektedir. *mecA* gen bölgesi PCR veya DNA prob yöntemleri ile

saptanabilmektedir. En önemli avantajları hızlı ve doğru sonuç alınması olan bu yöntemlerin, dezavantajları test maliyetinin yüksek olması ve eğitimli personel gerektirmesidir (69).

MRSA ve MRKNS suşlarının hastane enfeksiyonlarında büyük pay sahibi oldukları bilinmektedir. Metisilin direncinin varlığı bu suşların tedavisinde önemli sorunlara yol açmakta ve tedavi maliyetlerini arttırmaktadır (70). Metisilin direncinde ülkeler ve bölgeler arasında farklılıklar görülebildiği gibi aynı hastanenin farklı birimlerinde bile farklı direnç oranları saptanabilir. Ülkemizde ve yurt dışında stafilokoklarda metisilin direnci ile ilgili yapılmış birçok çalışma mevcuttur. Metisilin direncini saptamada PCR ile *mecA* varlığının gösterilmesi altın standart olarak kabul edilmektedir (71).

Yurt dışında PCR referans kabul edilerek yapılan çalışmalarda metisilin direnç oranları % 0,1 ile % 80,0 arasında bildirilmektedir (72). Vannuffel ve ark. (73) 165 stafilokok izolatı kullanarak yaptıkları çalışmada *S. aureus* için direnç oranını % 41,3 bulurken, KNS'lerde daha yüksek olarak % 47,1 bulmuşlardır. Diğer bir çalışmada Mathews ve ark. 610 *S. aureus* izolatında direnç oranını % 34,1 olarak bildirmişlerdir (74). Swenson ve ark. (75) stafilokoklarda metisilin direncini araştırmış ve direnç oranını % 65,1 olarak bulmuşlardır. Ülkemizden yapılan çalışmalarda metisilin dirençli *S. aureus* için direnç oranları % 23,0-71,0 arasında, metisilin dirençli koagülaz negatif stafilokoklarda ise % 70,0'lere kadar varan oranlarda bildirilmektedir (68). Ankara'da yapılan bir çalışmada *S. aureus* izolatlarında direnç oranı % 54,3 olarak bildirilmiştir (76). Başka bir çalışmada *S. aureus* izolatlarında metisilin direnç oranı % 49,0, KNS'lerde ise % 47,0 olarak belirtilmiştir (77). Çalışmamızda metisilin direnç oranı *S. aureus* izolatlarında % 36,9, KNS izolatlarında % 57,3 olmak üzere, tüm stafilokok izolatları için % 47,0 oranında saptanmış, ülkemiz ve dünya verileri ile benzer olduğu görülmüştür.

Metisilin direncinin belirlenmesinde disk difüzyon testi en sık kullanılan laboratuvar testlerinden biridir (78). Swenson ve ark. (79) *S. aureus* için oksasilin disk difüzyon ile duyarlılığı % 98,0 ve özgüllüğü % 99,0; Sevgican ve ark. (77) duyarlılığı % 98,9, özgüllüğü % 100,0 olarak bildirmişlerdir. Velasco ve ark. (80) duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerlerini sırasıyla % 94,1 % 100,0, % 94,4 ve %100,0; Zhu ve ark. (81) duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerlerini sırasıyla

% 97,5, % 98,3, % 95,1 ve % 99,1 olarak belirtmişlerdir. Çalışmamızda *S. aureus* için oksasilin disk difüzyon ile duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerlerini sırasıyla % 93,5, % 100,0, % 96,4 ve % 100,0 olarak saptanmış olup yapılan diğer çalışmalarla benzer sonuçlar bulunduğu gözlenmiştir.

Swenson ve ark. (79) KNS'ler için oksasilin disk difüzyon ile duyarlılığı % 99,0, özgüllüğü % 89,0; Sevgican ve ark. (77) duyarlılığı % 100,0, özgüllüğü % 50,0 olarak belirtmişlerdir. Özel ve ark. (82) KNS'ler için duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerlerini sırasıyla % 95,4, % 92,8, % 94,0, ve % 94,5; Zhu ve ark. (81) duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerlerini sırasıyla % 83,4, % 76,3, % 46,8 ve % 94,9 olarak belirtmişlerdir. Çalışmamızda *S. aureus* için oksasilin disk difüzyon ile duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerleri sırasıyla % 74,3, % 95,7, % 92,9 ve % 83,3 olarak saptanmış olup oksasilin disk difüzyon testinin duyarlılığı yapılan diğer çalışmalara göre daha düşük bulunmuştur. Düşük duyarlılığın sebebi, oksasilin kullanılarak yapılan duyarlılık testlerinde, direncin heterojen olması nedeniyle, dirençli ve duyarlı sonuçların ayrımında zorluklarla karşılaşılmasıdır (6). Bu nedenle oksasilin disk difüzyon testi 2008 CLSI ve sonraki kılavuzlarda tarama testi olarak önerilmemektedir (7).

Sefoksitin disk difüzyon testi ile yapılan bir çalışmada (80) *S. aureus* için duyarlılık ve özgüllük değerleri % 100,0 ve % 94,0 olarak bulunmuştur. Özel ve ark. (82) duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerlerini sırasıyla % 94,3, % 100,0, % 100,0 ve % 96,0; Zhu ve ark. (81) ise % 96,6, % 94,9, % 93,3 ve % 97,5 olarak belirtmiştir. Başka bir çalışmada Telli ve ark. (5) KNS'ler için duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerlerini sırasıyla % 98,3, % 99,1, % 99,4 ve % 97,5 olarak bildirmişlerdir. Diğer çalışmalarda sefoksitin disk difüzyon testi duyarlılık ve özgüllüğün ikisi de % 100,0 olarak belirtilmiştir (77, 79). Çalışmamızda *S. aureus* için sefoksitin disk difüzyon ile duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerleri sırasıyla % 100,0, % 98,1, % 100,0 ve % 96,9 olarak saptanmış olup literatürle benzer olduğu gözlenmiştir.

Swenson ve ark. (79) 115 izolat kullandıkları çalışmada KNS'ler için sefoksitin disk difüzyon ile duyarlılığı % 90,0, özgüllüğü % 96,0 olarak bulmuşlardır. Özel ve ark. (82) duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerlerini sırasıyla % 90,9, % 98,2, % 98,3 ve % 90,1; Zhu ve ark. (81) ise % 90,5, % 78,9,

% 61,2 ve % 91,9 olarak belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada duyarlılık ve özgüllük % 100,0 olarak belirtilmiştir (77). Çalışmamızda KNS'ler için sefoksitin disk difüzyon ile duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerleri sırasıyla % 97,9, % 94,3, % 97,1 ve % 95,8 olarak saptanmış olup yurt dışındaki ve ülkemizdeki çalışmalarla benzer olduğu gözlenmiştir.

Oksasilin MİK testi ile 610 *S. aureus* izolatı kullanılarak yapılan bir çalışmada duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerleri sırasıyla % 100,0, % 90,0, % 100,0 ve % 94,6 olarak belirtilmiştir (74). Tiwari ve ark. (83) 237 izolat kullandıkları çalışmada duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerlerini sırasıyla % 89,4, % 87,2, % 61,9 ve % 97,2 olarak belirtmişlerdir. Ögünç ve ark. (84) duyarlılığı % 95,5, özgüllüğü % 99,1; Cekovska ve ark. (85) duyarlılığı % 100,0, özgüllüğü % 86,2 olarak belirtmişlerdir. Çalışmamızda *S. aureus* için oksasilin MİK ile duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerleri sırasıyla % 100,0, % 96,2, % 100,0 ve % 93,9 olarak saptanmış olup yapılan çalışmalarla uyumlu olduğu gözlenmiştir.

Swenson ve ark. (79) KNS'ler için oksasilin MİK ile duyarlılığı % 97,0, özgüllüğü % 82,0 olarak belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada duyarlılık % 94,6, özgüllük % 96,5 olarak belirtilmiştir (86). Çalışmamızda KNS'ler için oksasilin MİK ile duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerleri sırasıyla % 100,0, % 65,7, % 100,0 ve % 79,7 olarak saptanmış olup duyarlılığı yapılan çalışmalardan daha yüksek, özgüllüğü ise daha düşük bulunmuştur. CLSI'da yer alan oksasilin MİK değerlerine göre bazı KNS'ler dirençli olarak saptanabilmektedir. Çünkü oksasilin MİK değeri 0,5 ile 2 mg/L arasında bulunan *non-Staphylococcus epidermidis* suşları *mecA* pozitif olmayabilir. Ciddi stafilokok enfeksiyonlarında MİK değeri 0,5 ile 2 mg/L arasında bulunan *S. epidermidis* dışındaki KNS'ler *mecA*, PBP2a veya sefoksitin disk difüzyon testi ile doğrulanmalıdır (64).

Swenson ve ark. (79) 2009 yılında yaptıkları çalışmada *S. aureus* için sefoksitin MİK ile duyarlılığı % 99,7, özgüllüğü % 100,0 olarak belirtmişlerdir. Çalışmamızda *S. aureus* için sefoksitin MİK ile duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerleri sırasıyla % 100,0, % 98,1, %100,0 ve % 96,9 olarak saptanmış olup literatürle uyumlu bulunmuştur.

Vural ve ark. (87) 117 izolat ile yaptıkları çalışmada *S. aureus* için oksasilin agar tarama testi duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerlerininin tümünü % 100,0

olarak belirtmişlerdir. Başka bir çalışmada duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerleri sırasıyla % 98,8, % 98,3 % 98,8 ve % 98,3 olarak bulunmuş ve inokülasyon yöntemlerinde bazı farklılıklar ile direnç belirleme oranının artacağı belirtilmiştir (5). Tiwari ve ark. (83) duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerlerini sırasıyla % 87,9, % 94,9, % 60,7 ve % 98,9 olarak belirtmişlerdir. Çalışmamızda *S. aureus* için oksasilin tuz agar tarama testinin duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerleri sırasıyla % 100,0, % 96,2, % 100,0 ve % 93,9 olarak saptanmış olup literatürle benzer olduğu gözlenmiştir.

York ve ark. (88) 142 KNS izolatu kullanarak yaptıkları çalışmada oksasilin tuz agar tarama testinin duyarlılık, özgüllük değerlerini % 70,0 ve % 100,0 olarak bildirmişlerdir. Oksasilin agar tarama yönteminin heterojen suşlar ile yapılan çalışmalarda duyarlılığının düştüğü bildirilmiştir (6). Çalışmamızda KNS'ler için oksasilin tuz agar tarama testinin duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerleri sırasıyla % 93,6, % 97,1, % 91,9 ve % 97,8 olarak saptanmış olup duyarlılığı yapılan çalışmalara göre daha yüksek bulunmuştur.

PBP2a lateks aglütinasyon testi kolay uygulanabilen, hızlı ve çok sayıda örneğin aynı anda çalışılabileceği bir testtir (5). Vural ve ark. (87) *S. aureus* için PBP2a lateks aglütinasyon testinin duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerlerini sırasıyla % 100,0, % 97,0 % 100,0 ve % 96,0 olarak belirtmiş ve PBP2a dışındaki bugün için bilemediğimiz PBP'lerin aşırı üretiminin PBP2a lateks aglütinasyon testinin daha fazla pozitif sonuç vermesine neden olabileceğini vurgulamışlardır. Yapılan diğer çalışmalarda Atay ve Gülay (89) duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerlerini sırasıyla % 100,0, % 88,0, % 100,0 ve % 93,8; Sakoulas ve ark. (90) duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerlerini sırasıyla % 100,0, % 99,0, % 100,0 ve % 99,5 olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda *S. aureus* için PBP2a lateks aglütinasyon testinin duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerleri sırasıyla % 96,8, % 100,0, % 98,1 ve % 100,0 olarak saptanmış olup özgüllük, NPD ve PPD oranları literatürle uyumluyken, duyarlılık oranı daha düşük bulunmuştur.

Swenson ve ark. (79) yaptıkları çalışmada KNS'ler için PBP2a lateks aglütinasyon testi ile duyarlılığı % 100,0, özgüllüğü % 94,0 olarak belirtmişlerdir. Bowers ve ark. (91) 165 izolat kullanarak yaptıkları çalışmada duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerlerini sırasıyla % 64,4, % 100,0, % 60,9 ve % 100,0 olarak

bulmuş ve KNS'ler için bu testin uygun olmadığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda KNS'ler için PBP2a lateks aglütinasyon testinin duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerleri sırasıyla % 68,1, % 100,0, % 70,0 ve % 100,0 olarak saptanmış olup yapılan çalışmalarla benzerlik gözlenmiştir.

Kromojenik besiyeri kullanılarak 98 *S. aureus* izolatu ile yapılan bir çalışmada 24 saatlik inkübasyon sonrasında testin duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerleri sırasıyla % 96,7, % 81,6, % 89,2 ve % 93,9 olarak belirtilmiştir (92). Perry ve ark. (93) 175 *S. aureus* izolatu kullanarak yaptıkları çalışmada duyarlılığı % 72,0, özgüllüğü % 92,1 olarak belirtmişlerdir. Cesur ve ark. (94) duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerlerini sırasıyla % 95,5, % 37,6, % 96,1 ve % 35,7 olarak bulmuş ve özgüllüğün düşük olması nedeniyle yalancı pozitiflik olasılığına karşı pozitif çıkan suşların diğer yöntemlerle doğrulanması gerektiği kanısına varmışlardır. Çalışmamızda *S. aureus* için kromojenik besiyeri testinin duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerleri sırasıyla % 93,5, % 96,2, % 98,1 ve % 93,5 olarak saptanmış olup özgüllüğü literatüre göre daha yüksek bulunmuştur.

Oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon, mikrodilüsyon ve lateks aglütinasyon testlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada metisilin direncini belirlemede *S. aureus* ve KNS'ler için en uygun yöntemin sefoksitin disk difüzyon testi olduğu vurgulanmıştır (79). Cekovska ve ark. (85) *S. aureus* için oksalin disk difüzyon, mikrodilüsyon ve oksasilin agar tarama testlerini karşılaştırmış, heterojen dirençten dolayı test sonuçlarının değişkenlik gösterdiğini ve bu testlerin başka bir konvansiyonel yöntemle birlikte kullanılması gerektiğini belirtmişlerdir. *S. aureus* için kromojenik besiyeri testinin performansının değerlendirildiği bir çalışmada duyarlılığı yüksek bulunmuş ve bu besiyerinin kullanımı ile ek test maliyetlerinin azalması, konvansiyonel yöntemlere göre daha kısa sürede sonuç alınabilmesi, değerlendirilmenin kolaylığı, duyarlılığının yüksek olması ve özellikle taramada direkt inokülasyon yapılabilmesi nedeniyle metisilin direncini belirlemede tercih edilebileceği savunulmuştur (95). *S. aureus* için yapılan diğer bir çalışmada oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon, oksasilin agar tarama ve lateks aglütinasyon testleri kıyaslanmış ve sefoksitin disk difüzyon yönteminin rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında tercih edilebilecek bir yöntem olduğu belirtilmiştir (5). Sevgican ve ark. oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon ve E-test yöntemlerini kullanmış,

sefoksitin disk difüzyon testinin, hem duyarlılık hem özgüllük açısından daha iyi olduğu ve metisilin direncini belirlemede oksasilin disk difüzyon ve E-test yöntemlerine alternatif olarak ve/veya birlikte kullanılabileceğini vurgulamışlardır (77). CLSI kriterlerine göre, çalışmamızda *S. aureus* suşlarında *mecA* gen varlığı referans olarak kabul edildiğinde; sefoksitin disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllükleri aynı olup diğer yöntemlerde daha yüksek bulunmuştur. KNS suşlarında da *mecA* gen varlığı referans olarak kabul edildiğinde sefoksitin disk difüzyon testinin duyarlılık ve özgüllüğü daha uyumlu bulunmuştur. Sefoksitin disk difüzyon sonuçlarının metisilin direncini göstermedeki üstünlüğü bizim çalışmamızda da gözlenmiştir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda metisilin direncinden sorumlu *mecA* gen homoloğu olan *mecA*_{LGA251} geni bildirilmiştir (3). Bu genin ilk olarak hayvanlarda enfeksiyona neden olduğu; fakat son zamanlarda insan enfeksiyonlarına da sebep olduğu bildirilmiştir (55). Yurt dışında yapılan çalışmalarda *mecA* negatif olduğu halde fenotipik testlerde dirençli olan suşlarda, dirençten sorumlu genin *mecA*_{LGA251} olduğu düşünülmektedir (96). Ülkemizde bu genin prevalansı ile ilgili bir bildiri henüz bulunmamaktadır. Çalışmamızda 166 stafilokok suşunun hiç birinde *mecA*_{LGA251} geni saptanmamıştır.

Ülkemizde metisilin direncinin belirlenmesinde CLSI kriterleri kullanılmaktadır. Çalışmamızda bulduğumuz sonuçlar EUCAST ve BSAC kriterlerine göre de değerlendirmeye alınmıştır. EUCAST kılavuzuna göre sefoksitin disk difüzyon testinin duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerleri *S. aureus* için sırasıyla % 100,0, % 98,1, % 100,0 ve % 96,9, KNS'ler için sırasıyla % 97,9 , % 94,3, % 97,1 ve % 95,8; oksasilin MİK testinin duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerleri *S. aureus* için sırasıyla % 100,0, % 96,2, % 100,0 ve % 93,9, KNS'ler için sırasıyla % 100,0, %, 65,7, % 100,0 ve % 79,7; sefoksitin MİK testinin duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerleri *S. aureus* için sırasıyla % 100,0, % 98,1, % 100,0 ve % 96,9 olarak saptanmıştır. Çalışmamızda bulunan değerler, CLSI, EUCAST ve BSAC kriterlerine göre değerlendirilip elde edilen sonuçlar referans yöntemle kıyaslandığında CLSI ve EUCAST duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD açısından birbiriyle uyumlu bulunmuştur.

Çalışmamızda BSAC kılavuzuna göre oksasilin disk difüzyon testinin duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerleri *S. aureus* için sırasıyla % 93,5, % 96,2, % 96,2 ve % 93,5; KNS'ler için sırasıyla % 91,5, % 88,6, % 88,6 ve % 91,5 olarak saptanmış olup bulunan değerler referans yöntemle karşılaştırıldığında *S. aureus* için özgüllük, NPD ve PPD değerleri daha düşük saptanırken, duyarlılıkları eşit çıkmıştır. KNS'ler için özgüllük ve PPD değerleri daha yüksek saptanırken, duyarlılık ve NPD değerleri daha düşük bulunmuştur. Oksasilin MİK testinin duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerleri *S. aureus* için sırasıyla % 100,0, % 96,2, % 100,0 ve % 93,9 ; KNS'ler için sırasıyla % 95,7, % 100,0, % 94,6 ve % 100,0 olarak saptanmış olup bulunan değerler referans yöntemle karşılaştırıldığında *S. aureus* için tüm değerler uyumlu çıkarken; KNS'ler için duyarlılık ve NPD değerleri daha düşük, özgüllük ve PPD değerleri daha yüksek çıkmıştır. Sefoksitin MİK testinin duyarlılık, özgüllük, NPD ve PPD değerleri *S. aureus* için sırasıyla % 100,0, % 98,1, % 100,0 ve % 96,9; KNS'ler için sırasıyla % 97,9, % 94,3, % 97,1 ve % 95,8 olarak saptanmış olup bulunan değerler referans yöntemle karşılaştırıldığında *S. aureus* ve KNS'ler için tüm değerler uyumlu bulunmuştur.

Çalışmamızda *mecA* varlığı referans alınarak yapılan ROC analizlerinde çalışmamız için duyarlılık sınır değerleri belirlenmiştir. ROC analizine göre *S. aureus* için oksasilin disk difüzyon testi duyarlılık sınır değeri 11,5 mm olarak hesaplanmış olup diğer kılavuzlarla kıyaslandığında CLSI ile uyumlu, BSAC ile kıyaslandığında ise özgüllük, NPD ve PPD değerleri daha yüksek bulunmuştur. KNS'ler için oksasilin disk difüzyon testi duyarlılık sınır değeri 15,5 mm olarak hesaplanmış olup CLSI ile kıyaslandığında duyarlılığı uyumlu, özgüllük, NPD ve PPD değerleri daha yüksek, BSAC ile kıyaslandığında duyarlılık ve NPD değerleri daha yüksek, özgüllük ve PPD değerleri daha düşük bulunmuştur. *S. aureus* için sefoksitin disk difüzyon testi duyarlılık sınır değeri 18 mm; KNS'ler için 23,5 mm olarak hesaplanmış ve diğer kılavuzlarla karşılaştırıldığında sonuçlar uyumlu bulunmuştur. *S. aureus* için oksasilin MİK testi duyarlılık sınır değeri 6 mg/L olarak hesaplanmış olup diğer kılavuzlarla karşılaştırıldığında duyarlılık ve NPD değerleri uyumlu çıkarken, özgüllük ve PPD değerleri daha yüksek çıkmıştır. KNS'ler için oksasilin MİK testi duyarlılık sınır değeri 3mg/L olarak hesaplanmış olup CLSI ve EUCAST ile karşılaştırıldığında özgüllük ve PPD değerleri daha

yüksek, duyarlılık ve NPD değerleri daha düşük bulunmuştur. BSAC ile kıyaslandığında tüm değerler uyumlu bulunmuştur. *S. aureus* ve KNS'ler için sefoksitin MİK testi duyarlılık sınır değeri 6 mg/L olarak hesaplanmış ve diğer kılavuzlarla karşılaştırıldığında sonuçlar uyumlu bulunmuştur.

Sonuç olarak;

Metisiline dirençli stafilokok izolatlarının tespitinde *mecA* ve *mecA_{LGA251}* genlerinin moleküler yöntemlerle gösterilmesi altın standart olmasına rağmen, gelişmekte olan ülkelerde ve ülkemizde birçok rutin laboratuvarında bu yöntemlerin ekonomik ve donanım yönünden uygulanmasının zor olması nedeniyle, sefoksitin disk difüzyon yönteminin metisilin direncini belirlemede kolay uygulanabilir, düşük maliyetli ve güvenilir bir yöntem olarak kullanılabileceği kanaatine varılmıştır. Ayrıca stafilokoklarda metisilin direncini belirlemek için ülkemizde kullanılmakta olan CLSI kriterleri ile birlikte EUCAST kriterlerinin de kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

1. **Alen S, Koneman E, Janda W, et al.** The gram-positive cocci: Part 1: Staphylococci and related organism. Eds. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th Ed, Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins, **2006**; 539-576.
2. **Bilgehan H.** Gram Olumlu Koklar. Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. Fakülteler Kitabevi, İzmir, **2000**; 239-268.
3. **Stegger M, Andersen PS, Pichon KA, et al.** Rapid detection, differentiation and typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecA_{LGA251}*. *Clin Microbiol Infect*, **2012**; 18 (4): 395-400.
4. **Arıdoğan A, Atasever L, Bal Ç.** Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotiklere dirençleri. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, **2004**;34:20-23.
5. **Telli M, Sümerkan B, Eşel D.** *Staphylococcus aureus*'ta Metisilin Direncinin Belirlenmesinde Sefoksitin Disk, Oksasilin Disk, Oksasilin Agar Tarama ve PBP2a Lateks Testlerinin Karşılaştırılması. *İnfeksiyon Dergisi*, **2006**; 20 (2): 93-96.
6. **Felten A, Grandy B, Lagrange PH, et al.** Evaluation of three techniques for detection of low level methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test. *J Clin Microbiol*, **2002**; 40:2766-2771.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighteenth informational supplement. M100-S18, Wayne, PA, US, January, **2008**; S:44-51.
8. **Bulger RJ, Sherris JC.** Decreased incidence of antibiotic resistance among *Staphylococcus aureus*. *Ann Intern Med*, **1968**; 69: 1099–1108.
9. **Cengiz AT.** *Staphylococcus*. Ustacelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabından. Güneş Kitabevi, Ankara; **1999**: 339-346.
10. **Shopsin B, Kreiswirth BN.** Molecular epidemiology of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis*, **2001**; 7:323-326.
11. **Hasbek M, Hakgündener YK, Bakıcı MZ.** Stafilokoklarda Metisilin Direncinin Farklı Yöntemlerle Belirlenmesi ve Çoğul Antibiyotik Direnci. *C Ü Tıp Fakültesi Dergisi*, **2002**; 24 (4): 179 –184.
12. **Garrity G, Holt JG.** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology:an overview of the road map to the manual. New York: Bergey's Manual Trust, **2000**.
13. **Moreillon P, Que Y, Glauser MP.** *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock) In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, **2005**; 2321-2351
14. **Lowy FD.** *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J M*, **1998**; 339(5): 520–31.
15. **Wilkinson BJ.** Biology, The Staphylococci in Human Disease. New York, **1997**; 1-38.
16. **Joklik WK, Willet HP, Amos DB, Wilfet C.** Zinsser Microbiology. Twentieth Edition, Appleton and Lange, **1992**; 401-416.
17. **Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS et al.** *Staphylococcus* and related organisms. Medical Microbiology 4th ed. St. Louis Mosby **1993**; 202-216.

18. **Levinson W, Jawetz E.** Medical Microbiology and Immunology, 6th. ed. Singapore: Lange Medical Books/McGraw-Hill, **2000**; 85-95.
19. **Tünger A.** Staphylococcus aureus: Mikrobiyoloji, Patogenez ve Epidemiyoloji. Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Gram-Pozitif Bakteri Enfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara; **2004**:9-68.
20. **Aygen B.** Stafilocok infeksiyonlarında Klinik ve Tanı, 8. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Kongre Kitabı, Antalya, **1997**; 331-338,
21. **Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM.** Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev*, **2000**; 13(1): 16-34.
22. **Crass BA, Bergdoll MS,** Involvement of coagulase negative staphylococci in toxic shock syndrome. *J Clin Microbiol*, **1986**;23:43-45.
23. **Bannerman TL.** *Staphylococcus*, *Micrococcus* and other catalase positive cocci that grow aerobically. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Phaller MA, Tenover FC (Eds). In: Manual of clinical microbiology, 8th ed. Washington DC: ASM Press, **2003**: 384-404.
24. **Bouvet A, Fournier JM, Audurier A, Branger C, Orsoni A, Girerd C.** Epidemiological markers for epidemic strain and isolates in an outbreak of nosocomial oxacillin-resistant *S. aureus*. *J Clin Microbiol*, **1990**; 28(6):1338.
25. **Kireçli E, Aktaş AE.** Stafilocok Suşlarının Gaz Kromatografi Metoduyla Tanımlanması ve Anntibiyotik Duyarlılıkları. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, **2005**; 11(1);29-32.
26. **Ulusoy S, Usluer G, Ünal S.** *Staphylococcus aureus*: Mikrobiyoloji, Patogenez ve Epidemiyoloji. İçinde: Gram Pozitif Bakteri Enfeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp: **2004**:9-71.
27. **Kocazeybek B, Çakan H, Ayyıldız A, Küçükateş E, Gülsoy Ö, Ordu A.** Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesinden İzole Edilen Koagülaz Negatif Stafilocoklarda Slime Faktörü Oluşturma ve Bunun Kemoterapötüklere Dirençle İlişkisinin Araştırılması. *ANKEM Derg*, **2011**; 15 (4): 683-689.
28. **Dündar V.** Metisiline Dirençli Stafilocok Enfeksiyonları. *Klinik Derg*, **2000**;13(özel sayı): 26-27.
29. **Hızal S, Şanlı C, Katgusuz S, Tunç A,** Kırıkkale Üniversitesinde Hastane Personeli İle Hasta Ziyaretçilerinde Nazal Staphylococcus Aureus Taşıyıcılığı. *Van Tıp Dergisi*, **2005**; 12 (2):140-144.
30. **Souvenir D, Donald E, Anderson JR, et al.** Blood cultures positive for coagulase-negative staphylococci: antiseptic, Pseudobacteremia, and therapy of patients. *J Clin Microbiol*, **1998**; 36(7): 1923-6.
31. **Dündar V, Dündar DÖ.** Stafilocok Enfeksiyonları. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Ed. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, **2008**; 2065-2077.
32. **Aygen B, Sehmen E, Sümerkan B., Doğanay M.** Koagülaz Negatif Stafilocoklarda Slime Yapımı ve Aderans. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, **1996**; 26: 67-70.
33. **Marshall SA, Wilke WW, Pfaller MA, Jones RN.** *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from blood stream infection: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility, and molecular (*mecA*) characterization of oxacillin resistance in the SCOPE program. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **1998**; 30(3): 205-14.
34. **Mermel LA, Farr BM, Sheretz RJ, et al.** Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections. *Clin Infect Dis*, **2001**; 32(9): 1249-72.

35. **Archer GL, Climo MW.** *Staphylococcus epidermidis* and other coagulase-negative Staphylococci. In: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of Infectious Diseases, eds. Gerald L, Mandell GL, John E, Bennett JE, Dolin R, 6th ed. Philadelphia, Pennsylvania, Churchill Livingstone, 2005; 2352-2360.
36. **Stout RD, Li Y, Miller AR, Lambe DW Jr.** Staphylococcal glycocalyx activates macrophage prostaglandin E2 and interleukin 1 production and modulates tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production. *Infect Immun*, **1994**; 62(10): 4160-4166.
37. **Gülay Z.** Antibakteriyel ilaçların etki mekanizmaları. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, **2008**; 227-243.
38. **Ustaçelebi Ş.** Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1. Baskı. İzmir: Güneş Kitabevi **1999**; 339-345.
39. **Ayaz C.** Beta laktamların genel özellikleri ve penisilinler. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, **2008**; 266-278.
40. **Gür D.** Bakterilerde Antibiyotiklere Karşı Direnç. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, **2008**; 243-257.
41. **Leblebicioğlu H.** Parenteral Sefalosporinler. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S. Guncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler, Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi, **2003**; 253-266.
42. **ÖzgÜven V, Dizer U.** Monobaktam ve Karbapenemler. Topcu AW, Soyletir G, Doğanay M. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, **2002**; 209-214.
43. **Topcu AW.** Aminoglikozidler. Topcu AW, Soyletir G, Doğanay M. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, **2002**; 214- 222.
44. **Aydın K,** Makrolidler ve Linkozamidler. *ANKEM Derg*, **2007**; 21(2):57-61.
45. **Rice LB, Sahm D, Bonomo RA.** Mechanism of resistance to antimicrobial agents. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Phaller MA, Tenover FC (Eds). *Manual of clinical microbiology*, 8th ed. Washington DC: ASM Press, **2003**; 1074-1101.
46. **Kayaalp SO.** Tıbbi Farmakoloji. 1.Cilt, Hacettepe Taş Yayınları, 8. Basım, Ankara, **1998**,248-254.
47. **Yiğit N, Aktaş AE, Al FD.** Klinik Örneklerden İzole Edilen Stafilokokların Metisilin, Fusidik asit ve Mupirosin Direnci. *Türk Hij Den Biyol Der*, **2008**; 65(1):17-23.
48. **Ulusoy S.** Streptograminler (Kinupristin/Dalfopristin). *ANKEM Derg* **2004**; 18 (2):174-177.
49. **Mülazımoğlu L.** Oksazolinidonlar. *ANKEM Derg*, **2001**; 15(3): 543-545.
50. **Roth EP, Martin FC, Villar J, Mendez-Alavarez S.** Multipleks PCR for Simultaneous Identification of *Staphylococcus aureus* and Detection of Methicillin and Mupirocin Resistance. *J. Clin Microbiol*, **2001**; 39:4047-4041.
51. **Çetinkaya Y, Ünal S.** Glikopeptid Antibiyotikler: Vankomisin ve Teikoplanin. *Flora İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi*, **1997**; 3: 1-14.
52. **Ekşi F, Balcı İ, Gayyurhan ED, Çekem G.** Klinik örneklerden soyutlanan *Staphylococcus aureus* suşlarının metisilin direncinin belirlenmesi ve antimikrobiyal ilaçlara duyarlılıklarının değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Dergisi*, **2007**;21 (1): 27-31.
53. **Sabath LD.** Mechanism of resistance to beta lactam antibiotics in strains of *Staphylococcus aureus*. *Ann Intern Med*, **1982**; 97-339.

54. **Hartman BJ, Tomasz A.** Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, **1984**; 158(2): 513-516.
55. **Pichon B, Hill R, Laurent F, et al.** Development of a real-time quadruplex PCR assay for simultaneous detection of nuc, Pantón–Valentine leucocidin (PVL), *mecA* and homologue *mecA*_{LGA251}. *J Antimicrob Chemother*, **2012**; 67(10):2338-2341.
56. **Gregory PD, Lewis RA, Curnock SP, Dyke KG.** Studies of the repressor (BlaI) of β - lactamase synthesis in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol*, **1997**; 24:1025-1037.
57. **Kuwahara-Arai K, Kondo N, Hori SE, et al.** Suppression of methicillin resistance in a *mecA* containing pre-methicillinresistant *Staphylococcus aureus* strain is caused by the *mecI* mediated repression of PBP 2' production. *Antimicrob Agents Chemother*, **1996**; 40:2680-2685.
58. **Ünal S.** Sorun gram pozitif bakteri infeksiyonlarının tedavisinde yenilikler. *Antibiyotik Bul*, **1993**; (3): 71-76.
59. **Salmenlinna S.** Molekular Epidemiology of Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Finland. Academic dissertation. Faculty of Medicine, University of Helsinki, Haartman Institute. Helsinki, **2002**.
60. **Ünal S.** Stafilokoklarda Metisilin Direnç Mekanizmaları ve Metisilin Direnç Tespit Yöntemleri. *Flora*, **1996**;1:14-17.
61. **McDougal L, Thornsberry C.** The role of b-lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase resistant penicillins and cephalosporins. *J Clin Microbiol*, **1986**; 23: 832-839.
62. **Dumlupınar B.** Antibiyotiklere Dirençte Yeni Eğitimler. *Klinik Dergisi*, **2001**;14(2):47-56.
63. Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement. M100-S17, Wayne, PA, US, January;**2007**:44-51.
64. Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-third informational supplement. M100-S23, Wayne, PA, US, January;**2013**, S:72-89.
65. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tanles for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0, **2014**, S:17-21. <http://www.eucast.org>.
66. British society for antimicrobial chemotherapy, BSAC Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing. Version 12 May **2013**, S: 31-37.
67. **Chambers HF.** Meticillin Resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. *Clinical Microbiology Reviews*, **1997**; 10:781-791.
68. **Derbentli Ş.** Stafilokoklarda antibiyotik direnci. *ANKEM Derg*, **2005**; 19(Ek-2):54-60.
69. **Rasheed JK, Tenover FC.** Detection and characterization of antimicrobial resistance genes in bacteria. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover MC. (Ed.) *Manual of Clinical Microbiology* 8th Ed. Washington DC, **2003**; 1196-1212.
70. **Çetinkol Y, Altındış M, Çetinkaaya Z, Aktepe OC.** Stafilokoklarda Metisilin Direncinin Farklı Yöntemlerle Araştırılması ve Çoklu Antibiyotik Direncinin Saptanması. *Mikrobiyol Bul*, **2008**; 42: 119-124.
71. **Al-Ruaily MA, Khalil OM.** Detection of (*mecA*)gene in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) at Prince A / Rhman Sidery Hospital, Al-Jouf, Saudi Arabia. *J Med Genets Genomic*, **2011**; 3 (3): 41 - 45.

72. **Peters G, Becker K.** Epidemiology, control and treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Infection Drugs*, **1996**;52(Suppl 2):50-54.
73. **Vannuffel P, Gigi J, Ezzedine H, et al.** Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, **1995**; 33(11):2864-2867.
74. **Mathews AA, Thomas M, Appalaraju B, Jayalakshmi J.** Evaluation and comparison of tests to detect methicillin resistant *S. aureus*. *Indian J Pathol Microbiol*, **2010**; 53(1):79-82.
75. **Swenson JM, Brasso WB, Ferraro MJ, et al.** Correlation of Cefoxitin MICs with the Presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol*, **2009**; 1902-1905.
76. **Kaya E G, Karakoç E, Yağcı S, Yücel M.** Evaluation of phenotypic and genotypic methods for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Afr J Microbiol Res*, **2009**; 3(12): 925-929
77. **Sevgican E, Sınırtaş M, Özakin C, Gedikoğlu S.** *Staphylococcus* türlerinde Metisilin Direncinin Farklı Yöntemlerle Saptanması. *İnfeksiyon Derg*, **2009**; 23 (2): 63-68.
78. **Gür D.** Bakteriler için Kullanılan Antibiyotik Duyarlılık Testleri. *ANKEM Derg*, **1999**; 13 (3): 322-324.
79. **Swenson JM, Tenover FC.** Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol*, **2005**; 43: 3818-23.
80. **Velasco D, del Mar Tomas M, Cartelle M, et al.** Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother*, **2005**; 55(3): 379-82.
81. **Zhu LX, Zhang ZW, Wang C, Yang HW, Zhang Q, Cheng J.** Evaluation of the CLSI cefoxitin 30-microg disk diffusion method for detecting methicillin resistance in staphylococci. *Clin Microbiol Infect*, **2006**; 12(10): 1039-1042.
82. **Özel G, Aslan V, Erdem GB, Çağatay M, Şencan İ, Mert A.** Stafilokoklarda metisilin duyarlılığının belirlenmesinde oksasilin, sefoksitin, seftizoksim ve moksalakтам disk difüzyon yöntemlerinin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul*, **2011**; 45(2): 258-265
83. **Tiwari HK, Sapkota D, Das AK, Sen MR.** Assessment of different test to detect methicillin resistant *staphylococcus aureus*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, **2009**; 40(4): 801-806
84. **Öğünç D, Çolak D, Saygan MB, Öngüt G, Saygan S, Gültekin M.** *Staphylococcus aureus* suşlarında oksasilin direncinin Saptanmasında E-test, mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemlerinin karşılaştırılması. *ANKEM Derg*, **2001**; 15 (1):84-87,.
85. **Cekovska Z, Panovski N, Petrovska M.** Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Comparison of Susceptibility Test Methods with *mecA* Gene Analysis for Determining Oxacillin (Methicillin) Resistance in Our Clinical Isolates. *Bratisl Lek Listy*, **2005**; 106(4-5): 163-167.
86. **Sünbül M, Furtun F, Esen Ş, Eroğlu C ve ark.** Hastane enfeksiyonlarından izole edilen stafilokok suşlarında oksasilin direncinin dört ayrı yöntem ile araştırılması. *Mikrobiyol Bul*, **2000**; 34: 215-221.
87. **Vural A, Afşar İ, Kurultay N, Demirci M.** *Staphylococcus aureus*'da Metisilin Direncinin Saptanmasında Disk Difüzyon, Oksasilin Agar Tarama, Mikrodilüsyon ve PBP2a Lateks aglütinasyon Testlerinin Karşılaştırılması. *ANKEM Derg*, **2011**; 25(3): 145-149.
88. **York MK, Gibbs L, Chehab F et al.** Comparison of polymerase chain reaction detection of *mecA* with standard susceptibility testing methods to determine methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol*, **1996**; 34: 249-253.

89. **Atay T, Gülay Z.** Comparison of PBP2a latex agglutination test with disk diffusion, *mecA* PCR and Vitek for the detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *ANKEM Derg*, **2004**; 18(4): 205-208.
90. **Sakoulas G, Gold HS, Venkataraman L, Degirolami PC, Eliopoulos GM, Qian Q.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing method and analysis of *mecA*-positive susceptible strain. *J Clin Microbiol*, **2001**; 39(11): 3946-51.
91. **Bowers KM, Wren MWD, Shetty NP.** Screening for methicillin resistance in staphylococci aureus and coagulase-negative Saphylococci: an Evaluation of Three selective Media and Maslatex- MRSA Latex Agglutination. *Br J Biomed Sci*, **2003**; 60(2): 71-74.
92. **Uzun B, Karataş-Şener AG, Güngör S, Afşar İ, Ergin ÖY, Demirci M.** *Staphylococcus aureus* Suşlarındaki Metisilin Direncinin Belirlenmesinde Sefoksitin Disk Difüzyon Testi, Otomatize Sistem ve Kromojenik Besiyerinin Karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul*, **2013**; 47(1): 11-18.
93. **Perry JD, Davies A, Butterworth A, et al.** Development and evaluation of a chromogenic agar medium for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*, **2004**; 42: 4519-23.
94. **Cesur S, Yıldız E., Irmak H ve ark.** *Staphylococcus aureus* Klinik İzolatlarında Metisilin Direncinin Saptanmasında Oksasilin Direnci Tarama Agar ve Kromojenik MRSA Agar Besiyerlerinin Değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*, **2010**; 44: 279-284.
95. **Özen NS, Dağlar D, Baysan BH ve ark.** Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* Suşlarının Saptanmasında MRSA ID Kromojenik Besiyerinin Değerlendirilmesi. *ANKEM Derg*, **2011**; 25(1):31-34
96. **Cuny C, Laver F, Strommenger B, Witte W.** Rare occurrence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC130 with a novel *mecA* homologue in humans in Germany. *PLoS One*. **2011**; 6(9): e24360.

7. ÖZGEÇMİŞ

Dilek Yüzak 20.05.1987 tarihinde Trabzon’da doğdu. İlk orta ve lise eğitimini Trabzon’da tamamladı. 2006 yılında girdiği Abant İzzet Baysal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünden Haziran 2011’de mezun oldu. 2011-2014 yılları arasında Abant İzzet Baysal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde yüksek lisans öğrenimine başladı.

