



**T.C.
DICLE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YOĞUN BAKIM ÜNİTELERİNDE YATAN HASTALARDA
METİSİLİN REZİSTAN STAPHYLOCOCCUS AUREUS'UN
HIZLI TEST
(MOLEKÜLER YÖNTEM) İLE ARAŞTIRILMASI**

**Dr. AYŞE BATGÖZ AZARKAN
TIPTA UZMANLIK TEZİ
10-TF-01**

DİYARBAKIR-2011



**T.C.
DICLE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YOĞUN BAKIM ÜNİTELERİNDE YATAN HASTALARDA
METİSİLİN REZİSTAN STAPHYLOCOCCUS AUREUS'UN
HIZLI TEST
(MOLEKÜLER YÖNTEM) İLE ARAŞTIRILMASI**

**Dr. AYŞE BATG AZARKAN
TIPTA UZMANLIK TEZİ
10-TF-01**

DANIŞMAN: PROF.DR. ERALP ARIKAN

DİYARBAKIR-2011

ÖZET

Giderek artan oranlarda görülen MRSA'ların özellikle yoğun bakım ünitelerinde ciddi bir sorun haline gelmiştir. Bununla birlikte, hastaların hastanede kalma süresinin uzaması, hastane maliyetlerinin artması ve uygun olmayan antibiyotiklerin kullanımı sonucu meydana gelen antibiyotik direnci sorunlarını beraberinde getirmiştir. Bu çalışmada; gün geçtikçe daha fazla mortalite ve morbidite etkeni olan MRSA'larda metisilin direncinin daha güvenilir bir şekilde ve kısa sürede tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Yoğun bakım ünitelerine yatan hastalarda hastaneye yatışlarının ilk 24 saati içerisinde alınan nazal sürüntü örnekleri alındı. MRSA'nın hızlı tesbiti için GeneXpert real-time PCR yöntemi kullanıldı. Bu yöntemle elde edilen sonuçlar Vitek2, Phoenix, Sefoksitin DDT ve Chrom ID agar yöntemleriyle elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı.

Çalışmada 90 hastadan 3 nazal swabla örnek alındı. Birinci swab, GeneXpert real-time PCR yöntemi için kullanıldı. İkinci swab, kanlı besiyerine ekildi. Kanlı besiyerinde üreyen kolonilerden gram boyama yapıldı. Gram pozitif kok morfolojisinde olanlar Vitek2 ve Phoenix'le identifikasyon ve duyarlılıkları belirlendi. Üçüncü swab, Chrom ID agar'a ekildi.

90 örneğin 14'ü (% 15) GeneXpert ile, 4'ü (% 4.4) Vitek2 ve Phoenix ile, 5'i (% 5.5) Chrom ID agar testi ile MRSA olarak tespit edildi. 1 örnekte GeneXpert testi negatif olduğu halde otomatize sistemlerle MRSA olarak tespit edildi. GeneXpert ile sonuçlar 70 dakikada elde edildi.

Stafilokoklarda heterojen dirençli suşların nedeniyle metisilin direncini fenotipik yöntemlerle gösterilmesi sıklıkla yanlışlıklara neden olmaktadır. Çalışma sonucunda, GeneXpert real-time PCR testinin MRSA'yı tespit etmede hızlı ve güvenilir bir test olduğu sonucuna vardım.

SUMMARY

MRSA increasingly seen has become a serious problem particularly in intensive care units. This situation has brought the problems of prolonged hospital stay increased costs and antibiotic resistance caused by inappropriate use of antibiotics. This study aims to determine Methicillin resistance in MRSA, which causes increasing mortality and morbidity, more quickly and reliably.

Nasal swab samples were taken from patients in intensive care units within the first 24 hours of hospital admission. GeneXpert real-time PCR method was used for rapid detection of MRSA. The results obtained with this method were compared with the results of methods Vitek 2, Phoenix, Cefoxitin DDT and Chrom ID agar. In this study, samples were taken with three nasal swabs from 90 patients. The first swab was used for GeneXpert real-time PCR method. The second swab was inoculated on blood agar. Gram staining was performed by blood agar showed growth colonies. Identification and sensitivities of those with Gram-positive cocci morphology were determined by Vitek2 and Phoenix. The Third swab was inoculated on Chrom ID agar. 14 of 90 samples (% 15) with GeneXpert, 4 of 90 samples (%4.4) with Vitek2 and Phoenix and 5 of 90 samples (% 5.5) with Chrom ID agar test were found to be MRSA. Results were obtained in 70 minutes with GeneXpert.

Detection of methicillin resistance in staphylococci by phenotypical methods often leads to false results. As a result of the study, we concluded that GeneXpert real-time PCR assay for detection of MRSA is rapid and reliable test.

Ç İNDEK İLER

TÜRKÇE ÖZET	i
İNGİLİZCE ÖZET	ii
EKLER LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vi
KISALTMALAR	vii
1- GİRİŞ	1
2- GENEL BİLGİLER.....	2
2.1 Staphylococcus aureus'un Genel Özellikleri.....	2
2.2 Virulans ve Patojeniteleri.....	3
2.2.1 Kapsül	3
2.2.2 Hücre Duvarı	4
2.2.3 Teikoik Asit.....	5
2.2.4 Yüzey Proteinleri.....	5
2.3 Toksinler	5
2.4 Enzimler.....	5
2.5 Epidemiyoloji	6
2.6 Klinik Enfeksiyonlar.....	7
2.6.1 Stafilkokların Neden Oldu ğu Enfeksiyonlar	7
2.6.2 KNS Enfeksiyonları	7
2.7 Laboratuvar Tanısı.....	8
2.8 Tedavi.....	8
2.9 Stafilkoklarda Penisilin Direnci	9
2.10 Stafilkoklarda Metisilin Direnç Mekanizmaları	9
2.10.1 Yeni Bir Penisilin Ba ğlayıcı Protein (PBP2a) Sentezi Nedeniyle Olu şan Direnç.....	9
2.10.2 A ırkı Beta-Laktamaz Salgılanması ile Olu şan Direnç.....	15
2.10.3 Mevcut PBP'lerde Beta-laktam Antibiyotik Afinitesinde Azalma ile Olu şan Direnç.....	15
2.11 Metisilin Direncini Etkileyen İnternal Faktörler	15
2.11.1 Belirli Uzunluktaki Glikan Zincirleri.....	15
2.11.2 Normal Peptid Konfigürasyonu İçin Gerekli Kök Peptidler.....	15
2.11.3 İntakt Olmak İçin Gerekli Pentaglisin Çapraz Köprüleri.....	16
2.12. Metisilin Direncini Etkileyen Eksternal Faktörler	16
2.13. MRSA'nın Saptanmasında Tanı Yöntemleri	16
2.13.1 Oksasilin Disk Difüzyon Yöntemi	17
2.13.2 Sefoksitin Disk Difüzyon Yöntemi	17
2.13.3 Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi.....	17
2.13.4 Agar Tarama	17
2.13.5 E-test Yöntemi	18
2.13.6 Lateks Aglutinasyon.....	18
2.13.7 Kromojenik Yöntemler	18
2.13.8 Otomatize Yöntemler	19
2.13.9 Moleküler Yöntemler	19
2.13.10 Moleküler Yöntemler ile İlgili Kısıtlılıklar	21
2.14. MRSA'da Hızlı Tanının Avantajları.....	21
3. MATERYAL VE METOD.....	22

3.1 GeneXpert	22
3.2 Vitek2-Phoenix.....	22
Bu otomatize sistemlerle bakterilerin identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi sa lanmaktadır.....	22
3.3 sefoksitin DDT.....	22
3.4 Chrom ID MRSA	23
5. TARTI MA	28
6. SONUÇ.....	38
KAYNAKÇA	39

EK L L STES

ekil 1. a- Bir beta-laktam antibiyotik olan penisilin varlı ında Stafilokokal beta-laktamaz sentezinin indüklenmesi, b- S. aureus'ta metisilin direnç mekanizması	15
ekil 2 SCCmec gen kaset yapısı.....	16
ekil 3. mec gen kompleksinin dört sınıfı.....	17
ekil 4. ccr gen kompleksinin yapısı	17
ekil 5. Cepheid GeneXpertMRSA testinin çalı ma prosedürü.....	26

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Çalışmamızda kullanılan testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü	27
Tablo 2. Çalışmada kullanılan yöntemlerle elde edilen sonuçlar	28
Tablo 3. GeneXpert ve Vitek 2 ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması	28
Tablo 4. GeneXpert ve Phoenix ile elde edilen sonuçlar	29
Tablo 5. GeneXpert ve Chrom ID agar ile elde edilen sonuçlar	29
Tablo 6. GeneXpert ve Sefoksitin DDT ile elde edilen sonuçlar	29

KISALTMALAR

BORSA : Borderline Resistant Staphylococcus aureus

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

DDT : Disk Difüzyon Testi

FEM: Faktör Essential for Resistance to Methicillin

KNS : Koagülaz Negatif Staphylococcus

MRKNS : Metisilin Rezistan Koagülaz Negatif Staphylococcus

MSKNS : Metisilin Duyarlı Koagülaz Negatif Staphylococcus

MRS : Metisilin Rezistan Staphylococcus

MRSA : Metisilin Rezistan Staphylococcus aureus

MSS : Methicilline Duyarlı Staphylococcus

MSSA : Methicilline Duyarlı Staphylococcus aureus

SCC : Staphylococcal Cassette Chromosome

M C : Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu

MODSA : Moderately Resistant Staphylococcus aureus

MHA : Mueller Hinton Agar

NAG : N-Asetil Glukozamin

NAM : N-Asetil Muramik asit

PBP : Penisilin Ba layan Protein

PCR : Polimeraz Chain Reaction

1- G R

Stafilokoklarda metisilin direnci; mecA geni tarafından kodlanan yeni bir penisilin ba layıcı protein (PBP) olan PBP2a yapımı sonucu ortaya çıkar. Ancak, metisilin direncinin ekspresyonu, çevre ko ullarından kolay etkilenir ve S. aureus her zaman rutin kullanılan fenotipik testlerle belirlenemeyebilir. Bu nedenle mecA geninin tespitini sa layan genotipik çalı malar büyük önem ta ımaktadır.

Günümüzde S. aureus izolatlarında kar ıla ılan en önemli sorun, giderek artan oranlarda görülen metisilin direncidir. MRSA (Metisilin Rezistan Staphylococcus aureus) bir kez hastaneye girdikten sonra eradikasyonu oldukça zordur. Özellikle yo un bakım ünitelerinde yatan hastalara çok sayıda invaziv giri im yapılması ve hastalarda birden çok risk faktörünü bulunması MRSA'yı yo un bakım ünitelerinde önemli bir enfeksiyon problemi haline getirmi tir. Bu nedenle hastanelerde MRSA izolatlarının saptanması, yayılımının önlenmesi, özellikle hemodiyaliz ve cerrahi hastaları gibi yüksek risk ta ıyan hasta gruplarında, yo un bakım ünitelerinde MRSA kolonizasyonunun ortadan kaldırılması büyük önem ta ımaktadır. MRSA ile kolonize ya da enfekte hastalar, hastane dı ı kazanılmı olgular (uzun süreli bakım üniteleri, huzur evleri), daha önceden MRSA tanısı almı olan ve tekrar hastaneye kabul edilen hastalar, kolonize sa lık personeli ve hastane ortamı bu mikroorganizma ile meydana gelen enfeksiyonlar için en önemli kaynakları olu turmaktadır. Kolonize ve enfekte hastalar, MRSA'nın hastane içindeki yayılımında önemli faktördürler.

Bu çalı mada; gün geçtikçe daha fazla mortalite ve morbidite etkeni olan MRSA'larda metisilin direncinin daha güvenilir bir ekilde ve kısa sürede tespit edilmesi amaçlanmı tir.

Bu nedenle MRSA'nın hızlı tesbiti için GeneXpert real-time PCR yöntemi kullanılmı tir. Bu yöntemle elde edilen sonuçlar Vitek2, Phoenix, Sefoksitin DDT ve Chrom ID agar yöntemleriyle elde edilen sonuçlarla kar ıla tırılmı tir.

2- GENEL B LG LER

Stafilokoklar Micrococcaceae ailesi içerisinde yer alan, do ada yaygın olarak bulunan Gram pozitif koklardır. Memelilerin deri ve muköz membranlarında normal flora elemanlarıdır. Stafilokoklar genelde buldukları yerde konakla iyi huylu ve simbiyotik bir ili kiye sahiptirler, ancak deri ve mukozal travma, enjeksiyon veya cerrahi müdahaleler ile dokuya girmesi sonucu patojen olabilirler (1).

Stafilokokları ilk olarak 1878'de Robert Koch ık mikroskopunda tanımlamı ,1880'de Pasteur sıvı besiyerinde üretmi tir. Rosenbach 1884'de ilk kez insandan izole etmi tir. (1,2).

Alexander Fleming'in 1928'de penisilini bulması ve 1940'da Florey ve Chain tarafından penisilin üretiminin ba arılması ile stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde önemli bir a ama kaydedilmi tir. Penisilinaz üretimi ilk olarak 1940'da Abraham Chain tarafından *Escherichia coli*'de bildirilmi tir. *S.aureus* su larında penisilin direncini 1944'de Kirby tanımlamı tır (3).

1940'larda stafilokoklara karşı çok etkili olan benzilpenisilinler, penisilinaz üreten bakterilerin selektif seçilmesi üzerine etkinli ini kaybetmiştir. 1961 yılında ise 1959 yılında kullanıma giren metisiline dirençli ilk *S. aureus* su ları bildirilmi tir.

1970'lerde yaygın kullanılan antibiyotiklere (klindamisin, kloramfenikol, tetrasiklin, makrolidler, rifampin, aminoglikozidler ve trimetoprim-sulfametaksazol) karşı direnç geli iminden sonra 1980'lerde kinolon direnci saptanmı tır (4,5,6).

2.1 *Staphylococcus aureus*'un Genel Özellikleri

Stafilokoklar 0.5-1.5 µm çapında, yuvarlak, hareketsiz, sporsuz, katı besiyerinden hazırlanan boyalı preparatlarında üzüm salkımına benzeyen, sıvı besiyerinden hazırlanan boyalı preparatlarından ise diplokoklar veya kısa zincirler halinde görülen mikroorganizmalardır. Aerop ve fakültatif anaerop bakterilerdir. Optimal üreme ısıları 30–37°C'dir. 24 saat inkübasyon sonrasında agar plaklarında 1-3 mm çaplı, yuvarlak, düzgün, sarı renkli koloni görünümüne sahiptirler. Kapsüllü olan su lar mukoid koloni yapabilirler. Kanlı agarda makroskopik olarak *S. aureus* kolonileri etrafında beta hemoliz bulunmakta olup karotenoid pigment nedeniyle altın sarısı rengindedirler. Stafilokokların di er ayırt edici özellikleri ise 200 µg/ml lizostafinle erimeleri, 0.04 U basitrasine dirençli, 100 µg furazolidona duyarlı, oksidaz negatif,

anaerob ortamda glukozdan ve 0.4 µg/ml eritromisin varlığında gliserolden asit oluşum turmalarıdır (1,7,18).

Stafilokokların genomu yaklaşık 2800 baz çiftli sirküler bir kromozom ile profajlar, plazmidler ve transpozonlardan oluşur. Bakterinin virülansından ve direncinden sorumlu olan genler diğer *S. aureus* kökenlerine, başka stafilokok türlerine ve farklı cins Gram-pozitif bakterilere aktarılabilmektedir. Bu aktarım daha çok transdüksiyon yolu ile olmaktadır (8).

S. aureus, içerdiği çeşitli virülans faktörleriyle stafilokoklar arasında en patojen türdür (9). Plazmayı pıhtılaşma yeteneğini gösteren koagülaz deneyi, *S. aureus*'u diğer stafilokoklardan ayırt etmede en yaygın olarak kullanılan, en çok önem taşıyan ve genel olarak kabul gören identifikasyon kriteridir. *S. aureus* koagülaz pozitifdir. Her iki farklı yöntemle koagülaz testi yapılabilir. Birincisi stafilokokların besiyerine saldıkları serbest koagülazın araştırıldığı tüp testidir. İkincisi ise kümeleşme faktörü olarak da bilinen bağıl koagülazın araştırıldığı lam deneyidir. Lam deneyi hızlı sonuç vermekle birlikte, *S. aureus* suşlarının %10-15'i bu yöntemle negatif sonuç verebilir. Mannitolu yalnız *S. aureus* parçalamadığı halde koagülaz negatif olanlar parçalamazlar. Mannitole etki deneyi, koagülaz testinden sonra *S. aureus*'u diğer stafilokoklardan ayırt etmede en yararlı deneydir. Nitratları nitritlere indirgerler. Oksidaz olumsuzdurlar (10,11).

2.2 Virulans ve Patojeniteleri

2.2.1 Kapsül

Stafilokokların çoğunda en dışta bir polisakarit kapsül bulunur. *S. aureus* suşlarında 11 kapsül serotipi belirlenmiştir. Serotip 5 ve 7 insanda en sık enfeksiyona neden olan tiplerdir. Kapsül bakteriyi polimorfonükleer lökositlerin fagositozunu engelleyerek korumaktadır. Gevrek bağıl ve suda çözünen film tabakası (slime tabakası) stafilokokların çoğu tarafından farklı miktarlarda yapılmaktadır. Özellikle avirulan KNS'de bulunur ve bakterileri korumak üzere dokulara ayrıca greft, ant, prostetik kapak ve eklem gibi yabancı cisimlere tutunmasını sağlar (12).

2.2.2 Hücre Duvarı

Peptidoglikan tabaka

Hücre duvarının esas yapısını oluşturur, insan hücrelerinde bulunmayıp bakteri hücresinde bulunduğundan antibakteriyel ilaçlar için iyi bir hedef oluşturmaktadır. Bu tabaka üç bölüme ayrılır. Bunların ilki 1-4 glikozid bağları ile ba lanan N-asetil glukozamin (NAG) ve N-asetil muramik asit (NAMA) alt gruplarından oluşan disakkarid yapısıdır. İkinci tabaka N-asetil muramik asite bağlı D ve L aminoasitlerinden oluşan pentapeptid zinciridir. NAMA'ya ba lanan pentapeptid yapısı sırasıyla; L-alanin, D-glutamik asit, L-lizin, D-alanin, D-alanin şeklindedir. Son tabaka da ise NAMA'ya bağlı olan pentapeptid yan zincirleri, pentaglisin köprüleri ile bir zincirde D-alanin ile diğer zincirdeki L-lizin arasında olacak şekilde birbirlerine çapraz bağlanırlar. Çapraz bağlar hücre duvarının sağlamlığını ve yakından ilişkili kildir ve bu bağların yapısı türler arasında farklılık gösterir. S.aureus'da çapraz bağlanma oranı yüksektir ve bu özellik bakterinin lizozim enzimine karşı dirençli olmasını sağlar (2,13,16).

Transglikozilaz disakkarid pentapeptidlerin birbirlerine bağlanmalarını, transpeptidaz pentapeptid köprüleri oluşturarak peptidoglikan yapının retiküler bir yapı kazanmasını ve D-karboksipeptidaz pentapeptid yapısındaki son D-alaninin zincirden ayrılmasına neden olur. Beta-laktam antibiyotikler, peptidoglikan sentezini, spesifik olarak karboksipeptidaz ve özellikle de transpeptidazları inhibe ederek durdururlar. Bu enzimlere penisilin bağlayan proteinler (PBP) adı verilir, çünkü inhibisyon beta-laktam antibiyotiklerin bu enzimlere bağlanması sonucu gelir. S. aureus'ta PBP1, PBP2, PBP3, PBP4 olmak üzere dört tane PBP vardır (16). Penisilin bağlayan proteinler penisilin ve diğer beta-laktam antibiyotiklerin hedefidirler. Metisilin ve benzeri penisilinlere direnç bir genin (mecA) kazanımıyla ilişkili olup bu gen yeni bir penisilin bağlayan protein olan PBP2'yi kodlar. Bu protein penisilinlere bağlanmamasına karşı enzimatik etkinliğini sürdürür. MecA geni Stafilokoklarda kaset kromozom mec (SCC mec) üzerinde bulunur ve bu kasete beş gen sekansı (I-V) tanımlanmıştır (12). Stafilokokların peptidoglikan tabakası; makrofajlardan sitokin salınımını uyarır, komplemanın aktivasyonuna yol açar ve trombosit agregasyonuna neden olur. Ayrıca monositlerden IL-1 salınımını uyararak polimorfonükleer lökositlerin enfeksiyon bölgesine toplanmalarına ve sonuçta apse

oluşumuna da yol açar. Ter, gözyaşı ve lökositlerde bulunan lizozim (muramidaz) enziminin hedefi stafilokok ve diğer Gram pozitif bakterilerin peptidoglikan tabakasının 1-4 bağlarıdır. Stafilokoklardaki pentaglisin köprülerinin lizostafin enzimine özgül bir duyarlılığı vardır (2,13,16).

2.2.3 Teikoik Asit

Teikoik asit, suda eriyebilen, fosfodiester bağları ile bağlanarak uzun zincirler oluşturur. Eker-alkol-fosfat polimerleridir. Peptidoglikan tabakasındaki N-asetil muramik asit molekülüne fosfodiester bağlarıyla kovalent olarak bağlanmıştır. Sadece Gram pozitif bakterilerin hücre duvarında bulunur. Stafilokokların türe özgü antijenleri teikoik asitlerdir. Mukozalarda bulunan özgül reseptörleri (fibronektin, fibrinojen, laminin, trombospondin, vitronektin, elastin, siyaloprotein ve kollojen) ile birleşerek stafilokokların konağa adherensini sağlar (2,13,15).

2.2.4 Yüzey Proteinleri

Protein A, elastin, kollajen, fibronektin bağlayan proteinler ve kümeleme faktörü (clumping faktör) kimyasal yapıları ve hücre duvarı yerleşimleri birbirlerine benzeyen stafilokoksik yüzey proteinleridir. Bu proteinler stafilokokların konak dokularında kolonize olmasında en önemli faktörlerdir. Protein A'nın antikomplemanter ve antifagositer etkinliği vardır (14,15).

2.3 Toksinler

Sitolitik toksinler, hemolizinler, alfa hemolizin (Alfa toksin), beta hemolizin (Beta toksin), gama hemolizin (Gama toksin), delta hemolizin (Delta toksin), lökosidin (Panton-Valentine Toksin), enterotoksin, ekfoliyatif toksin (Ekfoliyatin), toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1) en çok bilinenleridir (13).

2.4 Enzimler

Katalaz, koagülaz, lipaz, hiyalüronidaz, fibrinolizin (Stafilokinaz), fosfatidilinozitol – spesifik fosfolipazC, deoksiribonükleaz, beta-laktamaz (penisilinaz) (13,14).

2.5 Epidemiyoloji

Çe itli mevsimsel ve epidemiyolojik faktörlere ba lı olarak eri kinlerde burun ta ıyıcılı ı oranı % 20-40 arasında oldu u tahmin edilmektedir. Üç tip nazal ta ıyıcılık bulunmaktadır. Toplumun %20'si devamlı %60'ı aralıklı ta ıyıcı durumunda iken %20'si asla kolonize olmaz. (17,18). Hastanede yatan hastalarda, sa lık personeline, ekzematöz deri hastalı ı olanlarda, kötü amaçla (ilaç ba ımlılı ı) ya da tıbbi amaçla (insüline ba lı diyabet, alerji testleri için enjeksiyon yapılan hastalar, hemodiyaliz hastaları) sık i ne kullananlarda bu oran daha yüksekler e çıkmaktadır. Bakterilerin mukozal yüzeylere adherensi stafilokok hücre yüzeyi adezinleri tarafından sa lanmaktadır (12).

Stafilokokların deri ve nazofanikste bulunması nedeniyle bu bakteriler sık olarak hastane enfeksiyonlarına neden olur. Stafilokoklar yüksek sıcaklı a, dezefektan ve antiseptik solüsyonlara duyarlı olmakla birlikte kuru yüzeylerde uzun süre canlılı ını koruyabilmektedirler. Bakteriler duyarlı bireylere do rudan temasla veya e yalarla temas (kontamine giysiler, yatak çar afları gibi) ile bula ırlar.

MRSA enfeksiyonları toplumdaki sa lıklı bireyler arasında yaygın görünmesede 2003 yılında MRSA'nın yeni su ları ile toplumda deri enfeksiyon salgını ve iddetli pnömoni vakaları görülmü tür. İginc oları bu bakterilerin hastanede dola an su lardan farklı olmasıdır. Her ülkede saptanan bakterilerin genetik farklılı ı bulunmaktadır:

- 1- Metisilin direncini kodlayan tip IV SCCmec kaseti
- 2- Panton-valentine lökositidin toksini
- 3- Beta-laktamları nda kalan antibiyotiklerin ço una duyarlılık

Bu toplum kökenli MRSA su larının epidemiyolojik tipleri buldukları ülke ile ili kili olup de i ik ülkelerde farklı tipler belirlenmektedir (12). MRSA enfeksiyonlarının sıklı ı ülkeden ülkeye, hastaneden hastaneye ve hatta hastane içinde de i ik servisler arasında bile büyük farklılık göstermektedir.

SENTRY çalı ması 1997-1999 yılları arasında, be kıtadan seçilmi 17 ülkenin katılımıyla yapılmı tır. Buna göre, MRSA oranları Japonyada %71.6, Avustralya'da %23.6, Güney Afrikada %42.9, Amerika ve Güney Afrikada %34.2 – 34.9, Avrupa'da %26.3 olarak belirlenmi tir. Aynı çalı mada Türkiye için %37.5 olarak bildirilmi tir (19). Bir ba ka çalı mada, Sader ve ark., 2002-2004 yıllarında

yaptıkları srveyans çalı masında, Belçika,Yunanistan, rlanda, srail ve ngiltere’de metisilin direnci >%40 ‘nın üzerinde bildirilmi tir. sve’te bu oran sadece %0.6 olarak bulunmu tur. Aynı alı mada Türkiye için metisilin direnci S.aureus izolatlarında %26.8 olarak tesbit edilmi tir (20). spanya’da 143 hastaneyi içeren geni bir çalı mada stafilokok su larının metisilin direnci S.aureus ta %31.7 KNS’de %67 olarak bulunmu tur. KNS içinde en sık %56 oranında S. epidermidis izlenmi tir (21).

Avrupa da Bouza ve ark (22). kateterlerden izole edilen metisiline dirençli stafilokok (MRS)su larından; S.aureus su larının % 40’ının, KNS su larının % 63.7’sinin dirençli oldu unu görmü lerdir.

Türkiye’de 1996-1999 yılları arasında yapılan dokuz ayrı çalı mada bildirilen metisilin direncinin ortalama % 47.5 oldu u hesaplanmı , 2000-2003 yıllarında ise sekiz ayrı çalı ma sonuçlarının ortalaması da bu orana çok yakın (% 46.6) bulunmu tur. Ancak son yıllarda hastanede yatan hastalardan izole edilen S.aureus su larına ili kin verileri içeren yayınlar, metisilin direncinin % 52’ye yükseldi ini göstermi tir (23).Türkiye geneline bakıldı nda e itli klinik örneklerden izole edilen MRSA direnç oranları %25-61, yo un bakım ve yanık ünitelerinde ise % 56-92 gibi yüksek oranlar bildirilmektedir (24).

2.6 Klinik Enfeksiyonlar

2.6.1 Stafilokokların Neden Oldu u Enfeksiyonlar

Deri ve yumu ak doku enfeksiyonları, dola ım sistemi enfeksiyonları, solunum sistemi enfeksiyonları, kas ve iskelet sistemi enfeksiyonları, santral sinir sistemi enfeksiyonları, üriner sistem enfeksiyonları ve toksinlere ba lı olarak geli en enfeksiyonlardır

Toksinleriyle yaptıkları hastalıklar ise ha lanmı deri sendromu, toksik ok sendromu, besin zehirlenmesidir (1,25,28).

2.6.2 KNS Enfeksiyonları

Ba ta S.epidermidis olmak üzere KNS’lar son yıllarda hastane enfeksiyonlarının önemli etkenleridir. Bu durumun nedeni normal flora bakterileri olmaları ve invazif giri imler sonucu kolayca alınabilmeleridir. KNS’lerin etken oldu u enfeksiyonların

ço u kateter veya protez ile ili kilidir. S.epidermidis enfeksiyonlarının büyük ço unlu u hastane kökenli iken, S.saprophyticus enfeksiyonları genellikle toplum kökenlidir (25,26).

KNS'ler özellikle damar kateterlerinin sık kullanıldı ı servislerde nozokomiyal bakteriyeminin en sık nedenidir. KNS'ler gö üs ve kalp cerrahisi sonrası geli en sternal osteomyelitler, protez eklemin etrafındaki kemik enfeksiyonları ve enfekte hemodiyaliz antlarından kaynaklanan hematogen osteomyelitlerin önemli etkenlerindendir (25,26,27).

2.7 Laboratuvar Tanısı

Stafilokoklar katı besi yerlerinde üretildiklerinde boyalı preparatlarında kümeler yapan ancak klinik örneklerde tek tek veya küçük gruplar halinde görülen Gram pozitif koklardır (12). Stafilokoklar, mikrokoklardan farklı olarak oksidaz negatif olup basitrasine dirençli, furazolidone ve lizostafine ise duyarlıdırlar. Stafilokokların laboratuvar tanısında koloni morfolojisi, boyama, pigment üretimi, hemoliz, mannitol fermantasyonu, yüksek tuz konsantrasyonlu ortamda üreme gibi özellikler önem arz etmektedir. S. aureus'un bütün su ları koagülaz pozitif olup mannitolü fermente ederler. S. aureus izolatları ve bazı KNS'ler koyun kanlı agarda hemoliz olu turmaktadırlar (2,13). Klinik örneklerde ticari nükleik asit amplifikasyon testleriyle S. aureus'un do rudan gösterilmesi ya da tanımlanması mümkündür.

2.8 Tedavi

Stafilokoklar , penisilinin bulunmasından sonra bu ilaça kar ı süratle direnç geli tirmilerdir Günümüzde bu ilaça duyarlı olan stafilokokların oranı % 10'un altına dü mü tür. Bu direnç penisillinaz'a (penisilin için özgül beta-laktamaz) ba lıdır. Bu enzime ait genetik bilgi, transfer edilebilen plazmidler üzerinde bulunur ve bu yolla stafilokoklar arasında direncin süratle yayılması sa lanmaktadır. Günümüzde toplum kökenli yada hastane enfeksiyonu etkeni stafilokokların ço u semisentetik penisilinlere de (metisilin , nafsilin, oksasilin, diklokzasilin gibi) dirençlidir. MRSA su ları ne yazık ki bütün beta laktam antibiyotiklere (penisilinler, sefalosporinler ve karbapenemler gibi) dirençlidirler. Geleneksel duyarlılık yöntemleri ile dirençli populasyonlardaki tüm bakteriler direnç

özelliklerini yansıtmazlar (heterojen direnç). Bu nedenle bu izolatlarda dirençten sorumlu penisilin ba layan proteini kodlayan PBP2a'nın gösterilmesi ile direnç tanımlanır. Hastanelerde yatan hastalarda MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde intravenöz vankomisin seçilecek ilaçtır. Hastane dı ı enfeksiyonlarda klindamisin, trimetoprim-sulfametoksazol veya doksisiklin gibi antibiyotikler kullanılabilir. Stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde yeni bir uygulama S. aureus kümelenme faktörü ve benzeri MSCRAMM proteinlerini (yüzey tutunma proteinleri) ba lanma bölgesine kar ı insan monoklonal antikorlarının kullanılmasıdır. Bu uygulamanın insanlarda kullanım ba arısının gösterilmesi gerekmektedir (12).

2.9 Stafilokoklarda Penisilin Direnci

Günümüzde stafilokok su larında penisilin direnci % 80-90'lara ula mı tır. Penisilinazlar, penisilin ile beraber bazı beta-laktam antibiyotikleri de parçaladıkları için beta-laktamaz olarak adlandırılırlar. Aktarılabilir bir gen olan beta-laktamaz geni, genelde di er antibiyotik direnç genleri ile birlikte bir plazmid üzerinde ta ınır. Stafilokoklarda tanımlanan beta-laktamaz; blaZ geni tarafından kodlanır. Bu gen bölgesinin ekspresyonu blaR1, blaR2 (regulator) ve blaI (inhibitor) gibi düzenleyici genler ile sa lanır. Gram negatif bakterilerde oldu u gibi stafilokoklarda da beta-laktamaz üretiminin indüklenebilirlik özelli i vardır. nhibisyondan sorumlu blaI geni ortamda beta laktam antibiyotik yoklu unda blaZ ve blaR gen bölgelerinin çalı masını baskı altında tutarak dü ük seviyede beta-laktamaz üretimine sebep olur. Ortamda beta-laktam antibiyotik varlı ında ise blaR1 tarafından blaZ geni uyarılarak artmı miktarda beta-laktamaz üretimi sa lanır (2,29,30).

2.10 Stafilokoklarda Metisilin Direnç Mekanizmaları

2.10.1 Yeni Bir Penisilin Ba layıcı Protein (PBP2a) Sentezi Nedeniyle Olu an Direnç

En sık kar ıla ılan dirençtir. MRS su larında, MSS su larından farklı olarak ek bir PBP vardır ve PBP2a olarak adlandırılmaktadır. PBP2a'nın beta-laktam antibiyotiklere afinitesi di er PBP'lerden daha dü üktür. PBP2a, 2 kb'lik DNA segmentine lokalize bir gen olan mecA geni tarafından kodlanmaktadır. Bazen bu

gen indüklenebilir ve transdüksiyon ile dirençli su lardan duyarlı su lara aktarılabilir (16,31).

Beta-laktam antibiyotikler duyarlı su larda hücre duvarındaki PBP'lere (transpeptidaz ve karboksipeptidaz enzimleri) ba lanarak, peptidoglikanı sa lamla tıracak çapraz ba ların olu umunu engellerler. Aynı zamanda otolizinleri uyarak hücre ölümünü sa larlar. Ancak metisiline dirençli su larda beta-laktam antibiyotikler PBP 2a'ya ba lanmadı ı için, tüm beta-laktam ajanlara kar ı direnç görülür. PBP2a'nın varlı nda metisilin, nafsilin ve oksasilin gibi semisentik penisilinazlara dirençli beta-laktamlara ve tüm sefalosporinlere direnç kazanılır.

MecA ekspresyonu, baskılayıcı bir gen olan transkripsiyonun regülatörü mecI ve membranda yer alan ve beta-laktam varlı nı saptayan bir sinyal iletici olan mecR1'in kontrolü altındadır. mecA ve mecR1 arasında bu genlerin prometerleri ve mecA geninin -10 sekansı ile mecR1'in -35 sekansı arasında operatör bölge bulunmaktadır. Antibiyotiksiz oratmda mecI, hem mecA hem de mecR1-mecI'nın transkripsiyonunu engeller. Beta-laktam antibiyotik varlı nda ise, önce mecR1 otokatalitik bir süreçle kesilir ve sitoplazmik kısmındaki bir metalloproteaz bölümü aktif hale gelir. Metalloproteaz, mecA'nın promoter bölgesine ba lanmı olan mecI'yı keser. Böylece mecA transkripsiyonu ve PBP 2a sentezi gerçekte ir. MecR1-mecI dı nda, beta-laktamaz yapımıyla ilgili blaI-blaR1 sistemi de mecA transkripsiyonunu etkiler. MecR1 ve mecI'nın plazmid aracılı stafilokokal beta-laktamaz geni olan blaZ'nin ekspresiyonunda rolü olan blaR1 ve blaI ile protein sekans homolojisi yüksektir. Bu da mecA'nın regülator genlerini blaZ sisteminden aldı nı dü ündürmektedir. Fakat beta-laktamaz sentezinin aksine PBP 2a'nın ekspresyonu normal regülatör genleri (mecA ve mecR1-mecI) ta ıyan su larda güçlü bir ekilde indüklenemez ve ayrıca indüksiyon da çok daha yava tır. Beta-laktamaz ekspresyonu için 15 dakika gerekirken PBP 2a sentezi için bu süre 48 saate kadar uzayabilmektedir. Bunun nedeni mecI'nın mecA transkripsiyonun sıkı bir regülatör olması ve beta-laktam antibiyotiklerinin ço unun mecR1'i etkin bir biçimde aktive edememesidir. Sonuç olarak bazı su lar mecA genini ta ımlarına ra men metisiline duyarlıdırlar ve bu su lar pre-MRSA olarak tanımlanırlar (16).

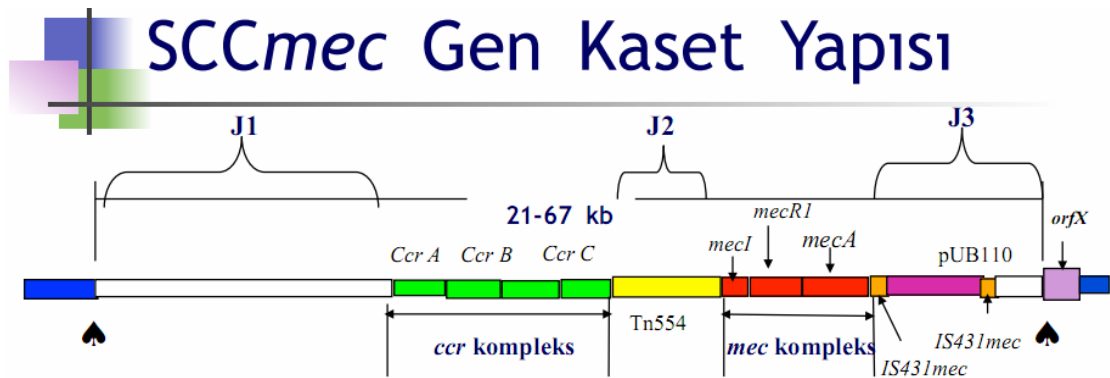
mecI ve mecA promoter/operatör bölgelerinde mutasyonu veya delesyonu olan bazı S.aureus su larında antibiyotik kullanımını selektif baskısına ba lı olarak represiyonun

SCC; stafilokok türleri arasında genetik madde alı veri ine aracılık eden hareketli bir elemandır. KNS türlerinde ve metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) izolatlarında da bulunmaktadır. SSCmec kasetinin kökeni hala bilinmemektedir. Fakat *S. scuri* penisilin ba layıcı proteini (PBP) ile MRSA ‘daki PBP2a arasında %82.8 homoloji nedeniyle kökenin bu bakteri oldu u sanılmaktadır (41) . Yapı olarak patojenite adasına benzemekle birlikte, hiç virulans geni içermemektedir. *mecA* geni SCCmec adı verilen ve SCC ailesinin metisilin direnci açısından özelle mi bir üyesinde bulunmaktadır (31,32,33).

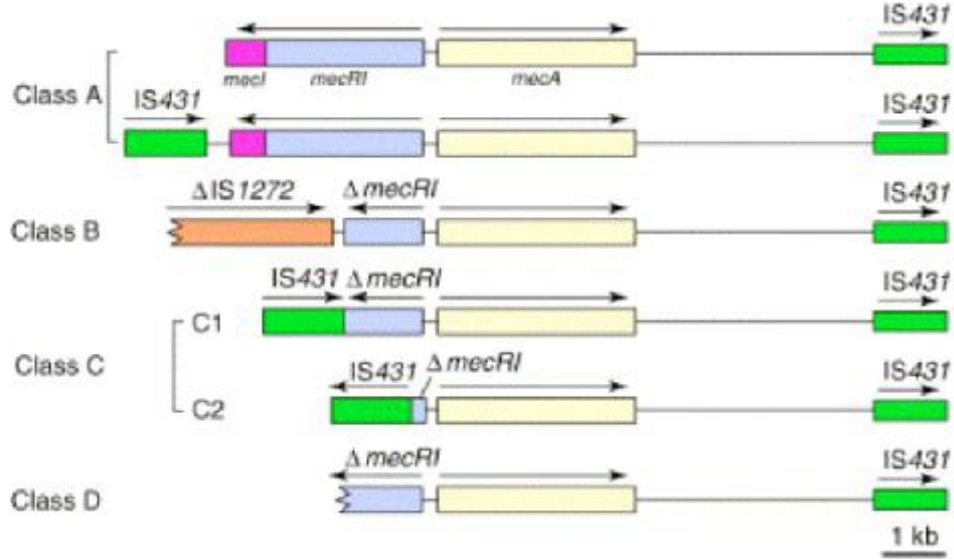
SCCmec, 21-67 kb büyüklü ünde bir DNA dizisi olup, kromozomda replikasyon ba langıcının (*oriC*) yakınındaki *orfX*’in 3’ ucunda *attB_{sc}* bölgesinde yer almaktadır.

SCCmec’in replikasyon merkezine yakın bir bölgede yerle mesi, antibiyotik direnç genlerini çabuk almasını sa layarak bakteriye önemli bir avantaj kazandırmaktadır (32,35). SCCmec, *mec* gen kompleksi (*mecA* ve regüle edici genler) ve *ccr* kompleksinden oluşur. *mec* gen kompleksi metisilin direncinden sorumludur. çerdikleri yapılara göre *mec* gen kompleksi dört sınıfta incelenir (33,34,36).

ekil 2. SCCmec gen kaset yapısı (43).

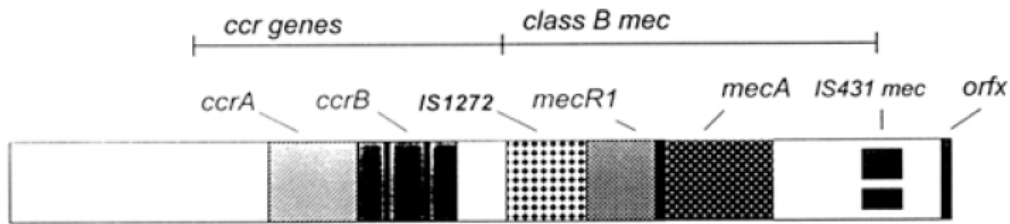


ekil 3. *mec* gen kompleksinin dört sınıfı (33).



SCC*mec* kasetinde ikinci ana genetik yapı olan *ccr* gen kompleksi kasetin bakteriyel genoma integrasyonu ve eksizyonundan sorumludur. Bunlar invertaz/rezolvaz ailesinden *ccrA*, *ccrB* ve yeni tanımlanan *ccrC* olmak üzere üç farklı rekombinaz kodlayan genlerdir. SCC*mec*'in mobilitesini sağlarlar. *ccrA* invertaz varlığında, SCC*mec* kromozomun doğru bölgesine girer ve *ccrB* rezolvaz ile kromozomdan tam bir şekilde, eksiksiz olarak ayrılır (33,36).

ekil 4. *ccr* gen kompleksinin yapısı (33).



SCC*mec* elemanının diğer kısımlarında ise, SCC *mec* tipleri içinde farklılık gösteren ve J (junkyard) bölgesi olarak adlandırılan çeşitli diziler bulunur. SCC*mec*'in boyut değişikliklerinin bu nedenle olduğu düşünülmektedir. J dizileri arasında "insertion sequence" denilen IS elemanları, farklı antibiyotiklere dirençten sorumlu transpozonlar yer almaktadır (33,34,36).

Tip I SCCmec: Sınıf B *mec* gen kompleksi ve tip I *ccr* gen kompleksinden oluşmaktadır. 1961 yılında izole edilen en eski MRSA suşunda bulunmuştur. Tip I SCCmec'in J bölgesi bir yüzey proteinini kodlayan *pls* genini içermektedir. Bu gen fibronektine bakteriyel adherensi etkilemektedir. Bu fonksiyon *S aureus*'ün enfeksiyonu başlatılmasında önemlidir. Tip I SCCmec, *mec A* hariçinde herhangi bir antibiyotik direnç geni taşımamaktadır (35).

Tip II SCCmec: Sınıf A *mec* gen kompleksi ve tip II *ccr* gen kompleksinden oluşmaktadır. J bölgesinde pUB110 plazmidi ve Tn554 transpozonu bulunmaktadır. SCCmec tip II ve III MRSA suşlarının özelliği, çoklu ilaç direncine neden olmaları ve özellikle hastane ortamında

bulunmalarıdır. Bu tipler taşıdıkları direnç genleri ile aminoglikozidler, makrolidler, tetrasiklin ile kadmiyum ve civa gibi ağır metallerle karşı dirençli olurlar. Tn554; makrolidlere, klindamisin ve streptogramin B'ye direnci kodlar (35,37,38).

Tip III SCCmec: Sınıf A *mec* gen kompleksi ve tip III *ccr* gen kompleksinden oluşmaktadır. pT181 plazmidi, Tn554 transpozonu ve pseudo Tn554 taşımaktadır. pT181; tetrasikline direnci kodlar (16,35,37,38).

Tip IV SCCmec: Sınıf B *mec* gen kompleksi ve tip II *ccr* gen kompleksi içermektedir. Tip IVa ve IVb, *mecA* geni dışında herhangi bir direnç geni taşımamaktadır. J1 bölgesi diğer SCCmec tiplerine göre oldukça küçüktür. J2 bölgesi ise bulunmamaktadır (35,38).

Tip V SCCmec : sınıf C *mec* gen kompleksi ile *ccrC* içermektedir. to ve ark. tarafından bir Avustralya suşundan tanımlanmıştır. Sadece, metisillin direncini kodlayan genlere sahiptir (36).

Ito ve ark. (39,40) tarafından, 3 major SCCmec elementinin yapısı tamamen ortaya konmuştur. İngiltere'de 1961 yılında izole edilen ilk MRSA (NCTC 10442) suşunun tip I, Japonya'da 1982 yılında izole edilen MRSA (N 315) suşunun tip II, Yeni Zelanda'da 1985 yılında izole edilen MRSA (85/2082) suşunun ise tip III SCCmec içerdiği saptanmıştır (39,40). TK-MRSA'da SCCmec gen kaseti tip4 ve 5 bulunur. Bu gen kasetleri diğer gen kasetlerine kıyasla çok daha küçüktür ve bu özelliği nedeniyle kolaylıkla diğer suşlara yayılımını kolaylaştırır. Ayrıca bu gen kasetlerinde beta laktam direnç antibiyotiklere direnç geni bulunmaz (42).

2.10.2 A ırı Beta-Laktamaz Salgılanması ile Olu an Direnç

Beta laktamazların a ırı salgılanması metisilini kısmen parçalayarak metisilin direncine neden olur. Bu tür direnç, beta laktam antibiyotiklerin beta laktamaz inhibitörü ile kombine edilmesi ile yenilebilir (16, 29,44).

2.10.3 Mevcut PBP'lerde Beta-laktam Antibiyotik Afinitesinde Azalma ile Olu an Direnç

Son yıllarda mecA geni ta ımadıkları halde metisiline dirençli stafilokoklar tespit edilmiştir. Çok az sayıda görülen bu su lar incelendi inde, bu bakterilerin mevcut PBP'lerinin beta laktam antibiyotiklere dü ük afinite gösterdikleri saptanmıştır. Ayrıca mecA negatif olmasına rağmen oksasilin M K de erleri 8-16 mg/L civarında olan su lar bulunabilmektedir. Bunların bir kısmı beta-laktamazın a ırı üretiminden [Borderline resistant S.aureus (BORSA)], bir kısmı da var olan PBP'lerdeki (özellikle PBP2 ve PBP4) nokta mutasyonlarından [Moderately resistant S. aureus (MODSA)] veya PBP4'ün (dü ük molekül a ırlıklı PBP) a ırı yapımından kaynaklanabilir (2,16,29).

2.11 Metisilin Direncini Etkileyen nternal Faktörler

2.11.1 Belirli Uzunluktaki Glikan Zincirleri

PBP2a, PBP2'nin transglikozilaz aktivitesine ba ımlıdır. Yani, PBP2a'nın do ru çalı abilmesi için PBP2'nin transglikozilaz domainine gereksinimi vardır. Beta laktamlar yüksek molekül a ırlıklı PBP'lerin transpeptidaz domain'ini inhibe ederken, transglikozilaz domain'ine bir etki göstermezler. Transglikozilaz domain'inin inaktivasyonu daha kısa olan glikan zincirlerin sayısında artı a ve metisilin direncinde belirgin azalmaya neden olur. Bu nedenle PBP'nin transglikozilaz domainini hedef alan bile ikler metisilin dirençli su ların tedavisinde gelecek vaat etmektedir (16,45).

2.11.2 Normal Peptid Konfigürasyonu için Gerekli Kök Peptidler

Ortama glisin konuldu unda, peptidoglikan zincirinin sonunda normal ko ullarda olması gereken iki alanin rezidüsünün yerini, iki glisin rezidüsünün almasının metisilin direncinde azalmaya ve homojen fenotipin heterojen fenotipe dönü mesine

neden oldu u bilinmektedir. UDP-N-asetil tripeptid sentatazı kodlayan gen olan murE (femF)'nin inaktivasyonu sonucunda da metisilin direncinde azalma olur. Nedeni hücre duvarı öncülleri havuzundaki UDP-ba lı muramil pentapeptidlerin azalması ve UDP-ba lı muramil dipeptidlerin birikmesidir. Bu sonuçlar PBP2a'nın do ru uzunlukta ve normal seride peptid elde edilmesi için kök peptidlerine ihtiyaç oldu una i aret etmektedir (16,45).

2.11.3 Intakt Olmak için Gerekli Pentaglisin Çapraz Köprüleri

Glikan zincirlerini birbirine ba layan pentaglisin çapraz köprülerinin yapımından femA, femB ve femX sorumludur. FemX birinci glisini, femA ikinci ve üçüncü glisinleri ve femB de dördüncü ve be inci glisinleri köprüye sokar. femA ve femB arasında de i me olmadı ndan bu proteinlerden herhangi birini kodlayan genlerin inaktivasyonu sonucu mono veya tri-glisinli çapraz köprüler olu ur. femA ve femB genlerinin herhangi birinin inaktivasyonu bakteri için letal oldu undan, femA ve femB proteinleri ilaç çalı malarının yeni hedefleridir (16,45).

2.12. Metisilin Direncini Etkileyen Eksternal Faktörler

Tuz konsantrasyonu, pH, ozmolarite ve ortam ısısı metisilin direncini etkileyen eksternal faktörlerdendir. Yüksek NaCl konsantrasyonunun (% 6.5) ve dü ük sıcaklı ın (30-35 oC) metisilin direncini nasıl artırdı ı tam olarak bilinmemektedir. nkübasyon süresinin 18 saat yerine 24 saate uzatılmasının metisilin dirençli su ların saptanmasını arttırdı ı da bilinmektedir (16,45) .

2.13. MRSA'nın Saptanmasında Tanı Yöntemleri

Günümüzde metisilin direncinin saptanmasında mecA geninin moleküler yöntemlerle saptanması altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak bu yöntemlerin klinik laboratuvarlarda uygulanması oldukça zor ve pahalıdır. Bu nedenden dolayı klinik laboratuvarlarda S. aureus izolatlarında metisilin direncinin saptanmasında çe itli yöntemler kullanılmaktadır.

2.13.1 Oksasilin Disk Difüzyon Yöntemi

Bu yöntemde MRSA izolatlarının saptanması amacıyla 1 µg oksasilin diski kullanılmaktadır. 0.5 McFarland bulanıklı a ayarlanmış olan bakteri süspansiyonundan Mueller-Hinton Agar (MHA)'a ekim yapıldıktan sonra, plaklar 35°C'de 24 saat inkübe edilmektedir. Oksasilin disk difüzyon yöntemi için CLSI tarafından belirlenen direnç sınır değerlerine göre inhibisyon zon çapı 10 mm olan izolatlar dirençli, 11-12 mm olan izolatlar orta düzeyde duyarlı, 13 mm olan izolatlar ise duyarlı olarak kabul edilmektedir (48,74).

2.13.2 Sefoksitin Disk Difüzyon Yöntemi

Son yıllarda metisilin direncinin saptanmasında sefoksitin disk difüzyon yönteminin kullanılması gündeme gelmiştir. Yapılan çalışmalarda, oksasilin disk difüzyon yöntemiyle elde edilen sonuçlara göre bu yöntemin duyarlılık ve özgüllüğünün daha yüksek olduğu bulunmuştur. Bu yöntemde 30µg sefoksitin diski kullanılmaktadır. 0.5 McFarland bulanıklı a ayarlanmış olan bakteri süspansiyonundan MHA'ya ekim yapıldıktan sonra, plaklar 35°C'de 24 saat inkübe edilmektedir. Sefoksitin disk difüzyon yöntemi için CLSI tarafından belirlenen direnç sınır değerlerine göre inhibisyon zon çapı 21 mm olan izolatlar dirençli, 22 mm olan izolatlar ise duyarlı olarak kabul edilmektedir (48,74).

2.13.3 Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

Bu yöntemde %2 NaCl içeren Mueller-Hinton sıvı besiyeri kullanılmaktadır. CLSI, testte kullanılacak olan inokulum miktarının 5 x10⁵ cfu/mL olmasını ve 24 saat 35°C'de inkübasyonu önermektedir. Antibiyotik olarak oksasilin tercih edilmektedir. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi için CLSI tarafından belirlenen direnç sınır değerlerine göre MIC değeri 2 µg/mL olan izolatlar duyarlı, 4 µg/mL olan izolatlar ise dirençli olarak kabul edilmektedir (48,74).

2.13.4 Agar Tarama

Bu yöntemde, 6 µg/mL oksasilin ve %4 NaCl içeren MHA'ya 0.5 McFarland bulanıklı a ayarlanmış olan bakteri süspansiyonundan ekim yapılır. Plaklar 24 saat

35°C’de inkübe edilir. Herhangi bir koloni üremesi halinde test edilen su metisiline dirençli olarak kabul edilir. Testin duyarlılık ve özgüllü ü oldukça yüksektir (48,74).

2.13.5 E-test Yöntemi

E-test yöntemi (AB Biodisk, Solna, sveç) de mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemlerine benzer ekilde test ko ullarından etkilenmektedir. Üretici firma tarafından %2 NaCl içeren MHA’ya 0.5 McFarland bulanıklı a ayarlanmı olan bakteri süspansiyonundan ekim yapılması önerilmektedir (48,74).

2.13.6 Lateks Aglutinasyon

Oldukça kısa bir sürede sonuç veren lateks aglutinasyon testi, PBP 2a saptanmasını temel alan bir yöntemdir. Koloni süspansiyonlarından PBP 2a ekstraksiyonu yapıldıktan sonra lateksle kaplanmı olan PBP 2a monoklonal antikorlarla aglutinasyon saptanır. S. aureus için testin duyarlılık ve özgüllü ü oldukça yüksektir (48,74).

2.13.7 Kromojenik Yöntemler

MRSA saptanması için literatürde birçok ticari veya “ev yapımı” kromojenik besiyeri bulunmaktadır. Kromojenik besiyerleri hem aranan çoklu dirençli patojenin seçilmesini sa layan hem de içerdikleri di er ayraçlar sayesinde farklı koloni renkleri olu turarak tür ayırımını sa lar. MRSA için kullanılan kromojenik besiyerlerinin bir kısmında seçici antibiyotik olarak sefoksitin bulunmaktadır. CHROMAgar MRSA (BBL), MRSASelect (BioRad), MRSA-ID (yeni adı CHROM ID MRSA) (bioMerieux), Chromogene MRSA agar (Oxoid) bu tip besiyerleridir. Bunlar yanısıra seçici antibiyotik olarak oksasilin de kullanılabilir. Örne in, oksasilin eklenmi (6 mg/L) mannitol tuz besiyeri, ORSAB (Oxoid) besiyeri gibi. Ancak oksasilin daha kolay bozulabildi i ve sefamisinler PBP 2a için daha iyi indükleyiciler oldu u için sefoksitin içeren besiyerleri MRSA tanımlanmasında oksasilin içerenlere kıyasla daha fazla kullanılmaktadır (46) .

CHROMAgar MRSA, MRSASelect, MRSA ID gibi besiyerleri için çe itli çalı malarda bildirilen duyarlılık % 80’den fazla, özgüllük ise % 100’e yakındır. Özgüllük çok yüksek oldu u için 24 saatte do rulama yapılmasına gerek yoktur.

nkübasyonun 48 saate uzatılmasının MRSA saptanmasına katkısı çok az olmakta, buna kar ın özgüllük dü mektedir.

2.13.8 Otomatize Yöntemler

Vitek2, Phoenix büyük ölçüde yalancı direnç ba ta olmak üzere az oranda yanlış sonuçların bildirilmi olmasına kar ın S. aureus için güvenilir oldukları bildirilmi tir (74).

2.13.9 Moleküler Yöntemler

MRSA saptanması için birçok PCR tabanlı test tanımlanmı tır. Bunların ço u PBP 2a'yı kodlayan mecA ile S.aureus'a özgü bir ba ka geni (nuc, coa, sa442,femA, femB) saptayan multipleks PCR testleridir. Bu testler günümüzde klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında metisilin direncinin do rulanması, S.aureus küçük koloni varyantlarının tanımlanması veya kan kültürlerinden MRSA saptanması için rutin olarak kullanılabilir. Bu testler do rudan klinik örnekler için de kullanılabilir. Ticari olanlara kıyasla ucuz ve esnek olan bu testlerin temel dezavantajı, aynı örnekte bir MSSA ile metisiline dirençli bir KNS'nin birlikte bulunması halinde, MRSA gibi yalancı pozitif sonuç verebilmeleridir (46).

Günümüzde do rudan sürüntü örneklerinden MRSA saptanmasını sa layan iki FDA onaylı gerçek zamanlı PCR testi bulunmaktadır, GeneOhm MRSA (eski adı IDI MRSA) (Becton Dickinson) ve GeneXpert (Cepheid). Bu testlerde mecA geni de il, mecA'yı ta ıyan SCCmec elemanının çevresindeki S.aureus'a özgü diziler hedeflenmektedir. Böylelikle moleküler testlerin yukarıda belirtilen dezavantajı çözümlenmi tir. Cepheid GeneXpertSCCmec insersiyon bölgesi olan AttBScce bölgesini; GenOhm MRSA ise SCCmec'in 3' ucundaki orfX bölgesini saptamaktadır. Bu testlerden GeneXpert, özel e itimli bir teknisyen olmaksızın herhangi bir laboratuvarda uygulanabilecek orta derecede karma ık bir test olarak FDA onayı almı tır. GeneOhm MRSA'nın ise ancak e itimli teknisyenlerce uygulanabilecek yüksek derecede kompleks bir test oldu u bildirilmektedir.

Cepheid GeneXpert nazal sürüntü örne inin test tüpüne konması ve üç ayracın deney sistemine eklenmesinden sonra tamamen otomatiktir. Buna kar ın GeneOhm MRSA testinde kullanıcı tarafından uygulanması gereken çe itli basamaklar bulunmaktadır.

GeneOhm MRSA'da 14 test örneği için ön hazırlık 1-1.5 saat; real-time PCR aşaması 63 dakika sürmektedir. GeneXpert ile sonuç çıkma süresi PCR için 75 dakikadır. Her iki testin maliyeti de yüksektir. Senede birkaç bin test uygulanması koşulu ile GeneOhm için maliyet 30 USD (25 euro)/örnek iken, GeneXpert için örnek başına 42 USD'dir. Ülkemizde de bulunan GeneOhm MRSA, nazal sürüntü, yara sürüntüsü ve kan kültüründen tanımlama için FDA onayı almıştır. Ürün katoloğunda test duyarlılığı % 92.5, özgüllük % 96.4 olarak bildirilmiştir. Nazal sürüntüdeki örneklerde duyarlılık düşmektedir. GeneXpert katoloğunda ise iki test 1.077 sürüntü örneği için kıyaslandığında, GeneXpert için duyarlılık % 86.3, özgüllük % 94.9 iken, GeneOhm için duyarlılık % 83.3, özgüllük % 94.4 olarak bildirilmiştir (46). Üçüncü bir ticari moleküler yöntem ise GenoType MRSA Direct (Hain Life Science, Nehren, Almanya) PCR testidir. Bu test hedef olarak SCCmec I-IV'un amplifiye edildiği bir revers hibridizasyon testidir. Test sırasında öncelikle kitteki protokoller ve araçlar kullanılarak PCR uygulanmakta, ardından DNA stripi ile hibridizasyon yapılarak görülen bantlara göre sonuç değerlendirilmektedir. Sonuçlar 6-7 saatte çıkmaktadır (46).

Bunlar dışında kan kültüründe üreme saptandıktan ve Gram boyalı preparatlarda Gram pozitif kok görüldükten sonra, türe özgü ribozomal RNA dizilerine tutunan floresan işaretli peptid nükleik asit problemlerinin kullanıldığı PNA-FISH (floresan in situ hibridizasyon) (AdvanDx) yöntemiyle KNS/ S.aureus ayırımı yapılabilmektedir. Ayrıca EvigeneMRSA (AdvanDx) ile kuyucuklara kaplanmış problemler ve sinyal amplifikasyon yöntemi ile kısa sürede ve ELISA formatında MRSA saptanması mümkün olmaktadır.

MRSA saptanması için kullanılan hızlı moleküler testlerin önündeki en önemli engel, gerçek MRSA varlığı ile, MSSA ve MRSE birlikte bulunmasının ayırt edilmesindeki güçlüğüdür. FDA onaylı testler bu engeli sadece MRSA izolatlarına özgü bir diziyi çoğaltarak almışlardır. Ancak yeni SCCmec tiplerinin çıkabilme olasılığı bulunması nedeniyle, test performansının sürekli olarak izlenmesi ve yeni klonlarla tekrar doğrulanması (validasyonu) gereklidir.

2.13.10 Moleküler Yöntemler ile İlgili Kısıtlılıklar

1. Maliyetin yüksek olması (örneğin, IDI MRSA için, 30 -53.60 USD/test, GeneXpert için 35-55 USD/test)
2. Bakterinin ölü olması ancak DNA pozitifliği için sürmesi (dekolonizasyon tedavisi sonrasında ve izolasyonun sona erdirilmesinde sorun olabilir),
3. Üreme olmadan saptanma olması nedeniyle, diğer testler için (ör. moleküler tiplendirme) su stoklarının bulunmaması,
4. DNA ekstraksiyonu ile ilgili problemler,
5. Prevalansın düşük olduğu durumlarda yalancı pozitiflik oranının artması ve pozitif prediktif değerin (PPV) düşmesi,
6. Moleküler testlerin düşük riskli hastalar ve düşük riskli ünitelerde kullanılması halinde maliyetin yarara kıyasla çok yüksek olması,
7. Ayrı duyarlılık nedeniyle kontaminasyon riski bulunması,
8. Pasajlar sırasında mecA'nın kaybedilmesine rağmen ticari testlerin mecA'dışı bölgeleri saptaması nedeniyle yalancı pozitiflik olması,
9. IDI MRSA (GeneOhmMRSA) için S.aureus orf X ile bazı Staphylococcus epidermidis orf X bölgelerinin benzerliği nedeniyle yalancı pozitiflik olabilmesi,
10. Bazı SCCmec tiplerinin diğerleri ile aynı etkinlikte saptanamaması (örneğin SCCmec tip V, bazı IV varyantları, yeni SCCmec tipleri)

2.14. MRSA'da Hızlı Tanımın Avantajları

- Kolonize ve kolonize olmayan hastaların ayrılması ve kolonize gruba temas önlemleri ve diğer önlemler (ör. dekolonizasyon) uygulanarak her iki grupta da enfeksiyon insidansının azaltılması,
- Uygun antibiyotik tedavisi ve çevresel temizlik önlemlerinin uygulanması ile bulaşın azaltılması,
- MRSA enfeksiyon hızlarının düşürülmesi ile enfeksiyon iddetine göre de i mekle birlikte maliyetin hasta başına 9,275- 35,367 USD arasında azalması,
- Kolonize olmayan hastalara gereksiz yere temas önlemleri uygulanmaması; buna bağlı maliyet ve yan etkilerden kaçınılması sayılabilir.

Bunlar yanı sıra, bakteri türünün ve antibiyotik duyarlılığının hızlı yapılabilmesi de maliyeti azaltmaktadır (46).

3. MATERYAL VE METOD

2010 yılında Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi yoğun bakım ünitelerine yatan ve antibiyotik kullanılmamış 90 hastada hastaneye yatmalarının ilk 24 saati içerisinde nazal sürüntü örnekleri alınarak metisilin direnci GeneXpert, Vitek2, Phoenix, sefoksitin DDT, Chrom ID MRSA yöntemi ile araştırıldı.

Hastalardan üç nazal swabla alınan sürüntü örnekleri 3 farklı yöntem kullanılarak MRSA yönünden incelendi. Birincisi, Cepheid GeneXpert cihazında çalışıldı. İkincisi, %5 koyun kanlı agar ekildi, 37 derecede 24 saat inkübe edildi. Üçüncüsü, Chrom ID MRSA agar ekildi, 37 derecede 24 saat inkübe edildi.

GeneXpert ile sonuçlar 70 dakika sonra elde edildi. %5 koyun kanlı besiyerine ekilen sürüntü örneğinde bakteri üremesi saptanan kolonilerde Gram boyamayla Gram pozitif kok morfolojisinde olanlar Vitek2 ve Phoenix otomatize sistemlerinde çalışıldı. *S. aureus* olarak tespit edilen örneklerde 30 mikrogram CLSI önerileri doğrultusunda sefoksitin disk difüzyon testi uygulandı.

3.1 GeneXpert

FDA onaylı 2. jenerasyon real-time testidir. Testin tüm basamakları (real-time PCR amplifikasyonu ve deteksiyonu) tek bir kartunun içinde gerçekleştirilmektedir. Bu yöntemde staphylococcal protein A (spa), mecA ve SCCmec olmak üzere 3 gen bölgesi araştırılmaktadır. MRSA varlığını için her üç gen bölgesinin de saptanması gereklidir.

3.2 Vitek2-Phoenix

Bu otomatize sistemlerle bakterilerin identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi sağlanmaktadır.

3.3 sefoksitin DDT

Bu yöntemde 30µg sefoksitin diski kullanılmaktadır. Sefoksitin disk difüzyon yöntemi için CLSI tarafından belirlenen direnç sınır değerlerine göre inhibisyon zonu çapı ≥ 21 mm olan izolatlar dirençli, ≤ 22 mm olan izolatlar ise duyarlı olarak kabul edilmektedir.

3.4 Chrom ID MRSA

Kromojenik substrat - glukozidazdır. Sefoksitin içerir. MRSA kolonileri ye il renk alır. Bazı mecA gene sahip ancak sefoksitin (4 mg/l) dü ük M K de eri olan S.aureus su ları bu besiyerinde geli meyebilir. Bunun aksine mecA genine sahip olmayan S.aureus su ları 24-48 saate karakteristik ye il koloniler olu turabilir.

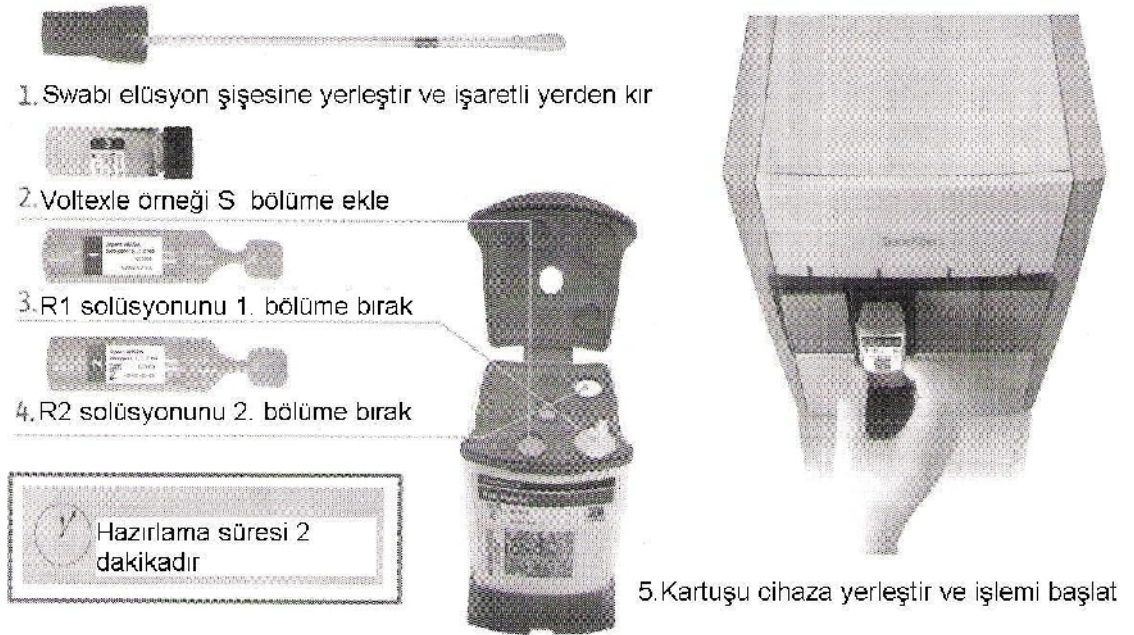
Genexpert'in Çalı ma Prosedürü

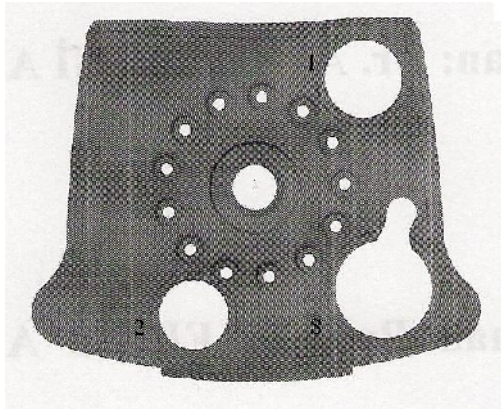
Üretici firma önerisi do rultusunda yapıldı. Nazal swap çenti e kadar elüsyon isesinin içersine konuldu. Çentikten kırılıp isenin kapa ı kapatılıp 10 saniye vortekslendi. steril pipetle i edeki sıvı alındı. Kartun kapa ı açılıp S yazan bölüme steril pipeteki sıvı aktarıldı. R1 solüsyonu 1 yazan bölüme ve R2 solüsyonu 2 bölüme aktarıldı. Kartu cihaza yerle tirilip cihaz çalı tırıldı.

R1 solüsyonu içeri i: Sodyum hidroksit

R2 solüsyonu içeri i: Tris buffer, sürfaktanlar, EDTA (Etilen Diamin Tetra Asetik asit)

ekil 5. Cepheid GeneXpertMRSA testinin çalı ma prosedürü (81).





S = Sample
1 = Reagent 1
2 = Reagent 2

4. BULGULAR

Yo un bakım ünitelerinde (genel cerrahi, dahiliye, nöroloji, beyin cerrahi, gö üs hastalıkları ve tüberküloz, kardiyoloji) yatan 90 hastadan alınan örnekler Genexpert, Phoenix, Vitek2 ve ChromID MRSA agar yöntemleriyle çalı ıldı. MecA gen varlı ı real-time PCR yöntemiyle ara tırıldı.

Çalı ılan 90 örne in 14'ünde GeneXpert ile mecA gen varlı ı tespit edildi. Vitek2 ve Phoenix sonuçları birbiriyle uyumlu olup GeneXpert ile MRSA olarak tesbit edilen 14 sonuçtan 3'ü Vitek2 ve Phoenix ile MRSA olarak tespit edildi. Ayrıca 1 örnekte mecA negatif oldu u halde otomatize sistemle MRSA sonucu bulundu. Ayrıca Vitek2 ve Phoenix ile 5 örnekte MRKNS, 2 örnekte MSKNS, 4 örnekte ise MSSA sonuçları elde edildi. Sefoksitin DDT ile 4 örnekte MRSA direnci gösterildi. Di er örnekler ise metisiline duyarlı olarak tespit edildi.

Chrom ID agara yapılan ekim sonucu 5 örnekte ye il renkte kolonilerin üredi i gözlenip MRSA tespit edildi. GeneXpert ile bu 5 örnekte MRSA sonucu elde edildi.

Tablo 1. Çalı mamızda kullanılan testlerin duyarlılı ı ve özgüllü ü

	Duyarlılık	Özgüllük
Vitek2	%21.42	%98.68
Phoenix	%21.42	%98.68
Sefoksitin DDT	%28.57	%98.68
Chrom ID agar	%35.71	%98.68

Tablo 2. Çalı mada kullanılan yöntemlerle elde edilen sonuçlar

Örnek sayısı	Genexpert	Phoenix	Vitek2	ChromID agar	Sefoksitin DDT
3	MRSA	MRSA	MRSA	MRSA	Dirençli
3	MRSA	MR	MR	-	Duyarlı
		S.epidermidis	S.epidermidis		
3	MRSA	MS S.aureus	MS S.aureus	-	Duyarlı
1	MRSA	MS S.aureus	MS S.aureus	MRSA	Duyarlı
2	MRSA	MS	MS	-	Duyarlı
		S.epidermidis	S.epidermidis		
1	MRSA	MR	MR	-	Duyarlı
		S.heamolyticus	S.heamolyticus		
1	MRSA	MR	MR	-	Duyarlı
		S. simulans	S. simulans		
1	-	MRSA	MRSA	MRSA	Dirençli

MR: Metisilin dirençli

MS: Metisilin duyarlı

Tablo 3. GeneXpert ve Vitek 2 ile elde edilen sonuçların kar ıla tırılması [n (%)]

	GeneXpert	Vitek 2
90	14 (% 15)	4 (% 4.4.)

n: hasta sayısı

Tablo 4. GeneXpert ve Phoenix ile elde edilen sonuçlar [n (%)]

	GeneXpert	Phoenix
90	14 (% 15)	4 (% 4.4.)

n: hasta sayısı

Tablo 5. GeneXpert ve Chrom ID agar ile elde edilen sonuçlar [n (%)]

	GeneXpert	Chrom ID agar
90	14 (% 15)	5 (% 5.5)

n: hasta sayısı

Tablo 6. . GeneXpert ve Sefoksitin DDT ile elde edilen sonuçlar [n (%)]

	GeneXpert	Sefoksitin DDT
90	14 (% 15)	4 (% 4.4)

n: hasta sayısı

5. TARTI MA

S. aureus, *mecA* geni tarafından kodlanan PBP2a üretmeleri nedeniyle metisiline ve dolayısıyla diğer beta-laktam antibiyotiklere direnç kazanabilir. Metisiline dirençli su lar; genetik direnç aktarımı sırasında diğer antibiyotik direnç genlerinin de beraber aktarımı nedeniyle ço unlukla makrolidler, aminoglikozidler, klindamisin, florokinolon, kloramfenikol ve ko-trimoksazol gibi birçok antibiyoti e de dirençlidirler. *MecA* geni kromozom üzerinde IS431 ve IS527 insersiyon sekans elementleri arasında yerle mi tir, bu özellik gene ba ka bakterilere geçme ve ba ka ilaç direnç genlerini alabilme özelli ini de verir. MRSA su larının beta-laktam dı ı birçok antibiyoti e de çoklu direnç göstermesinin altında bu özellik yatmaktadır (49). Stafilokoklarda özellikle yüksek düzey heterojen direncin varlı ı nedeniyle dirençli su lar sıklıkla gözden kaçabilir. Metisilin direncinin fenotipik yöntemlerle saptanması, uygulanan test ko ullarından etkilenmektedir. nokulum miktarı, inkübasyon ısısı ve süresi, ortamın pH'sı ve NaCl konsantrasyonu gibi birçok faktör direncin do ru bir ekilde belirlenmesinde önemli rol oynar. Bu nedenle direncin tespitinde *mecA* gen bölgesinin gösterilmesi, en iyi yöntem olarak kabul edilmektedir. Bu gen bölgesi PCR ya da DNA prob yöntemleri ile saptanabilmektedir. En önemli avantajları hızlı ve do ru sonuç alınması olan bu yöntemlerin, dezavantajları test ba ına maliyetlerinin yüksek olması ve e itimli personel gerektirmesidir (50). Direnç genlerinin saptanmasında moleküler testlerin kullanılmasının dört önemli nedeni vardır. Bunlardan birincisi, direkt olarak klinik örneklerde bulunan mikroorganizmalarda dirençle ili kili mutasyonların veya antimikrobial direnç genlerinin saptanması için kullanılabilir. Bu sonuçlar hem tedavide yol gösterici olması hemde hastanın izolasyon odasına alınması kararının verilmesinde anlam ta ımaktadır. kinci olarak, genetik yöntemler bakteri türlerinde direnç için sınır de erinde veya ona yakın de erde bulunan M K sonuçlarında karar vermek için kullanılabilir. Üçüncü olarak, genetik testler belli bir direnç geninin hastane ve toplumda epidemiyolojik yayılımının izlenmesinde direnç fenotipilerinin analizinden daha geçerli bir yöntemdir. Dördüncü olarak da, yeni duyarlılık testi yöntemlerinin geçerlili inin de erlendirilmesinde altın standart olarak kullanılabilir. Bununla birlikte genetik testlerin dirençli organizmaların saptanması

için kullanımında bazı potansiyel güçlükler bulunmaktadır. Bunlar; saptanan direnç genin eksprese olmaması, hedef organizmada mutasyon olması sonucunda PCR primerleri için kullanılan dizilerinin değişmesi ve var olan genetik testlerle saptanamayan yeni direnç genlerinin ortaya çıkması gibi. Bu etmenlerin her biri moleküler testin özgüllük ve duyarlılığını etkileyebilmektedir (51).

Hastaneye yatırılan MRSA burun taşıyıcısı hastaların saptanması ve bu hastaların izolasyonu sonucu MRSA'nın yol açtığı hastane enfeksiyonlarının insidansını ve maliyetleri azalttığını gösteren çalışmalara dayalı kanıtların sayısı her geçen gün artmaktadır. Bu nedenle yatan hastalarda MRSA burun taşıyıcılığının doğrudan ekilde saptanması her klinik mikrobiyoloji laboratuvarının görevidir. Konvansiyonel kültür yöntemleriyle burun sürüntüsünden MRSA saptanması için rapor verilmeden önce 48 saate ihtiyaç vardır. Bununla ilgili olarak PCR yöntemi ile klinik materyalden doğrudan MRSA varlığını tanımlamaya yönelik ilk çalışması Kitagawa ve ark. (52) tarafından yapılmıştır. Çalışmaya major cerrahi sonrası yüksek ateş ve diyare gelişen 35 hasta ve 6 sağlıklı gönüllü dahil edilmiş, kan kültüründen yapılan PCR ile mecA geni saptanan 12 hastanın kan kültürlerinde de MRSA izole edilmiştir. Diğer hasta ve sağlıklı gönüllülerin hiç birinde kan kültürü veya PCR pozitifliği saptanmamıştır. PCR sonuçları 4 saat içerisinde elde edilirken, kültür sonuçları 48 saat içerisinde sonuçlanmıştır.

Çeşitli çalışmalarda MRSA burun taşıyıcılığının saptanmasında moleküler yöntemler konvansiyonel kültür temeli yöntemlere göre daha hızlı bulunmuştur. Örneğin, Warren ve ark. real-time PCR yöntemiyle direkt nazal sürüntü örneğinde MRSA saptanabileceğini göstermek amacıyla yaptıkları çalışmada sonucunda bu testin direkt plak kültür yöntemi kadar duyarlı olduğunu, bununla birlikte kültürle 48 – 72 saate alınan sonuçların bu yöntemle 2 saatte alınabildiğini göstermişlerdir (51).

Durmaz yayınladığı makalesinde (53) S. aureus'larda metisilin direncini saptamada fenotipik yöntemlerin yanında dirençten sorumlu mecA geninin moleküler yöntemlerle araştırılmasının referans yöntem olarak kabul edildiğini belirtmektedir. Araştırıcı, MRSA taşıyıcılarının kısa sürede saptanarak, gerekli önlemlerin bir an önce alınması, dirençli su larabağı enfeksiyonların yayılmasının engellenmesi bakımından önemli olduğunu vurgulamaktadır. Moleküler yöntemlerle 1-2 saat içerisinde metisilin direncinin belirlenmesinin yanında, stafilokok türleri arasından

S.aureus ayrımının da yapılabildi ini belirtmi tir. Ta ıyıcılarda MRSA'nın taraması için geli tirilmi olan ticari bir moleküler test ile yapılmı olan kapsamlı bir çalı mada; özgülük ve duyarlılık sırasıyla % 95 ve % 85 olarak saptanmı ve bu moleküler yöntemin sa lık merkezlerindeki MRSA aktif sürveyansı için hızlı, basit ve güvenilir oldu unu ortaya koymu tur. Geçti imiz on yılda MRSA tanımlaması için PCR temelli pek çok cihaz geli tirilmi tir. Bizim çalı mamızda kulanđı mız real-time PCR yöntemi klasik PCR yöntemine göre direnç genini daha hızlı ve daha az kontaminasyon riski ta ıyarak belirleyebilmektedir.

Ülkemizde ise Turgut ve arkadaşlarının (54) yaptı ı çalı mada MRSA enfeksiyonlarının, özellikle anestezi yo un bakım ünitesi olmak üzere, yo un bakım ünitelerinde daha sık görüldü ünü saptamı tir. Ara tırcılar yo un bakım ünitelerinde hastalara birçok invazif giri im yapılması ve hastalarda birden çok risk faktörünün bulunması sebebiyle MRSA'yı yo un bakım ünitelerinde önemli bir enfeksiyon problemi haline getirdi ini savunmaktadırlar. Buna ek olarak, ara tırcılar MRSA enfeksiyonlarına ba lı geli en komplikasyon oranının artması, hastanın hastanede kalı süresini uzaması ve hastane maliyetlerinin artmasına neden oldu unu saptamı lardır.

Çalı mamızda yo un bakım ünitelerinde yatan hastalardan, yatı larının ilk 24 saati içersinde alınan 90 nazal sürüntü örne inde metisillin direncini belirlemek amacıyla mecA gen varlı ı altın standart kabul edilerek real-time PCR temelli moleküler bir test olan GeneXpertMRSA testi kulanılmı tir. Bununla birlikte otomatize sistemlerden phoenix , Vitek2 ile çalı ılmı tir. Ayrıca Kromojenik agar ve sefoksitin DDT yöntemi ile de ara tırılmı tir.

90 nazal sürüntü örneğinde GeneXpertyöntemiyle 14 su (% 15), sefoksitin DDT yöntemiyle 4 su (% 4.4), Chrom ID MRSA agar 5 su (% 5.5), Vitek2 yöntemiyle 4 su (% 4.4) ve Phoenix yöntemiyle 4 su (% 4.4) MRSA olarak bulunmu tur.

Wolk ve ark. (55) MRSA ve S. aureus'un tespiti için Cepheid Xpert MRSA/SA sistemi kulanılmı ve çalı mada staphylococcal protein A (spa) geni, mecA ve SCCmec genlerini hedeflenmi tir. MRSA'nın kan kültürlerindeki duyarlılı mını %98.3, yaradaki duyarlılı mını ise %97.1 olarak tespit etmi lerdir. Çalı mada S. aureus için duyarlılık her iki örnek için %100 bulunmu tur.

Kelly ve ark. (56) nazal ve kasık swablarıyla MRSA'nın kolonizasyonunu tespit etmek için iki ticari PCR test olan Xpert MRSA ve BD GeneOhm MRSA'yı kullanmışlardır. Ara tırcılar, bu iki testin kromojenik MRSA agar'a göre duyarlılıklarını % 87, %84.8 özgüllüklerini ise %98, %92.7 olarak bulmuşlardır. PCR'ın hızlı ve daha iyi de erlendirici olduğunu saptarlarken Xpert MRSA'nın nazal kolonizasyonu tespit etmede duyarlılığını % 89,5 özgüllüğünü %100, kültürün ise %86.3 duyarlılıkta ve %94.9 özgüllükte olduğunu belirlemişlerdir.

Wolk ve ark. (57) 1077 hastada nazal alınan nazal sürüntü örneklerinde MRSA'yı tespit etmek için Cepheid Xpert MRSA testi, direk kültür (CHROMagar) ve zenginleştirilmiş kültür agar (%6,5 sodyum kloridli Trypticase soy agar) ile karşılaştırılmıştır. Xpert MRSA testinin direk kültüre göre duyarlılığı %94.3, özgüllüğü %93.2 olarak bulunmuştur, zenginleştirilmiş kültür'e göre duyarlılığı %86.3 özgüllüğü %94.9 olarak bulunmuştur. Ara tırcılar sonuç olarak, Xpert MRSA testinin basit ve hızlı bir yöntem olduğunu tespit etmişlerdir.

Nancy L. Havil yayınladığı makalesinde (58) BBL CHROMagar MRSA, MRSA select, Spectra MRSA, Chrom ID MRSA, BD GeneOhm MRSA, GeneXpertMRSA testleri karşılaştırılmıştır. GeneXpertMRSA'nın duyarlılığı %69.2-%96.5 özgüllüğü %90.4-%98 iken, diğer bir moleküler yöntem olan BD GeneOhm testinin duyarlılığı %88- 96.1, özgüllük ise %93.5- 99 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada testlerin maliyeti ve çalışma süresi açısından da bir karşılaştırma yapılmıştır. Kromojenik yöntemler için ortalama maliyet 6-8.5 dolar, testin sonuçlanma süresi ise 18-48 saat olup, moleküler yöntemler için 30-42 dolar ve süre olarak 60-85 dakika olarak bulunmuştur. Ara tırcı sonuç olarak moleküler yöntemin kültür metotlarına göre daha pahalı olmasına rağmen, MRSA enfeksiyonun yayılımının önlenmesinde daha yararlı olduğunu belirtmiştir.

Bizim çalışmamızda yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda alınan nazal sürüntü örnekleri GeneXpertMRSA kiti kullanılarak çalışıldı. çalışma 70 dakikada sonuçlandı. mecA geni 90 hastanın 14'ünde pozitif, 76'sında negatif bulundu. Ancak mecA geni içermemesine rağmen 1 örnekte fenotipik yöntemlerle pozitif sonuç elde edildi.

MecA negatif su larda fenotipik olarak dirençli bulunan su ların a ır ı beta laktamaz yapımı, metisilini inaktive eden enzimlerin varlı ı, PBP2a d ı ında PBP'lerin bulunması gibi farklı mekanizmalarla açıklananabilece i bildirilmektedir (59).

Goffinet ve ark. (60) 24 MRSA su unu klasik PCR yöntemi, Vitek 2 sistemi ve/veya real-time PCR yöntemi olan LightCycler Staphylococcus-MRSA kitinde metisilin direncini tespit etme amaçlı ayrı ayrı çalı mı lardır. Bunlardan 14 su hem klasik PCR hem Vitek 2 hem de real-time PCR yöntemi ile belirlenmi olup, 4 su sadece Vitek 2 ile, 6 su ise sadece real-time PCR ile belirlenmi tir. Ara tırıcılar, real-time PCR yönteminin MRSA saptanması için hızlı ve etkili bir yöntem oldu unu ve bütün i lem süresinin yakla ık 4 saat oldu unu bildirmi lerdir.

Horstkotte ve ark (61) 200 KNS su unda metisilin direncini; Vitek 2 sistemiyle yaptıkları çalı mada % 99.2 duyarlılık ve % 80 özgüllük bulmu lardır. Ara tırıcılar, MRKNS tespiti için Vitek-2 sisteminin yüksek güvenilirlik ve hızlı fenotipik yöntem oldu unu ileri sürmü lerdir.

Çalı mamızda GeneXpert ile 14 hastada MRSA tespit edildi. Bununla birlikte Phoenix ve Vitek2 sistemi sonuçları birbiriyle uyumlu olup 4 örnekte MRSA bulundu. S. aureuslar için Vitek2 sisteminin duyarlılı ı % 21.42 özgüllü ü % 98.68 idi. Vitek2 sisteminde sonuçlar di er fenotipik yöntemlere göre daha kısa sürede tespit edildi i çalı ma boyunca gözlemlendi imiz bir sonuç olmu tur.

Kolbert ve ark (62) 155 S. aureus ve 261 KNS izolatında mecA sonuçlarıyla, oksasilin DDT'ni kar ıla tırımı , S. aureus izolatlarında mecA sonuçlarını DDT sonuçlarıyla uyumlu bulmu lardır. KNS'larda ise, DDT'inde duyarlı olarak tespit ettikleri 10 izolatın mecA'larını pozitif, dirençli olan 1 izolatın mecA genini ise negatif olarak rapor etmi lerdir. Bu de erlendirmeler sonucunda metisiline dirençli izolatları tanımlamada genotipik yöntemlerin duyarlı ve güvenilir oldu unu, duyarlılık testlerinin fenotipik de i ikliklerden etkilendi ini belirtmi lerdir.

Hetorejen dirençli izolatların saptanması için mecR1 için daha iyi ve hızlı bir indükleyici olan sefoksitin kullanılması, otolizinlerin etkisini azaltmak için ortama NaCl eklenmesi, mecA gen ekspresyonunun arttırılması için inkübasyon süresini uzatmak (18 saat yerine 24 saat) yüksek inokulum kullanmak ya da inkübasyon derecesini (30°C-35°C) azaltmak gibi uygulamalar yapılmaktadır. Ortama NaCl eklenmesi PBP 2a miktarını arttırmamasına ra men direncin eksprese edilmesini

arttırmaktadır. NaCl tüm hücrelerde otolizisi inhibe eder. 30°C’de inkübasyon da NaCl gibi antibiyotik ile tetiklenmiş otolizis aktivitesini inhibe eder. Bu etki sadece dirençli olan su lara özgül olmamakla birlikte PBP 2a varlığı nda direncin artmasına yol açar (16, 48,74).

Metisilin direncinin do ru olarak belirlenmemesi uygun olmayan bir tedavinin ba lanmasına neden olurken, yanlış pozitif sonucun bildirilmesi ise gereksiz yere pahalı ve ciddi yan etkileri bulunan glikopeptitlerin kullanılmasına neden olabilmektedir.

Metisilin direnci tespit etmede kar ıla ılan sorunlar nedeniyle genetik direnci, fenotipik yöntemlerle en iyi gösteren test veya yöntem arayışı sürmektedir. Heterojen dirence sahip stafilokoklarda, sefoksitin metisilin direncini oksasilinden daha iyi gösterdiğini kanıtlayan bir çok yayın bulunmaktadır. Sefoksitin, özellikle heterojen su ların tespitinde mecR1 için daha iyi ve hızlı bir indükleyici oldu u ve mecA gen varlığı ile uyumunun daha iyi oldu u bildirilmiştir.

Yapılan birçok çalışmada oksasilin DDT ‘de elde edilen sonuçlara göre sefoksitin DDT’nin duyarlılık ve özgüllüğünün daha yüksek oldu u ayrıca sefoksitin DDT’nin de erlendirilmesinin daha kolay oldu u bildirilmiştir (48).

CLSI 2005’de M100-S15 nolu belgesinde hem disk difüzyon hem de dilüsyon bölümlerindeki stafilokok tablosunda sefoksitin disk difüzyon yöntemini yeni test olarak önermiştir (63).

Telli ve ark. (64). 300 *S. aureus* su unda oksasilin DDT, sefoksitin DDT, lateks aglütinasyon test, oksasilin agar tarama test ve altın standart olarak kabul edilen PCR-mecA uygulamalarıdır. Testlerin duyarlılıklarını sırası ile, % 98.8, % 98.3, % 97.7 ve % 98.8; özgüllüklerini ise , % 99.1, % 99.1, % 97.4 ve % 98.3 olarak bulmuşlardır.

Swenson ve ark. (65) 62 *S. aureus* ve 53 KNS su unda sefoksitin DDT ve PCR yönteminin kar ıla tırılmalı çalışmasında duyarlılık ve özgüllüklerini; *S. aureus* su ları için % 98 ve % 100, KNS su ları için % 99 ve % 96 bulmuşlardır. Bu ara tırcılar bir başka çalışmalarında (66), 135 *S. aureus* izolatında sefoksitin ve oksasilin testlerini mecA-PCR sonuçları ile kar ıla tırdıklarında sefoksitin test sonuçlarının yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip oldu unu bildirmişlerdir.

Broekema ve ark (67) sefoksitin duyarlılık ve özgüllü ü Oxacillin ile karşılaştırıldı. İnda %97.3 ve %100 oranları bulunmuş olup, bu çalışmada mecA aracılı S. aureus direncini belirlemede yeni sefoksitin inhibisyon zon çapı geçerliliğini kanıtlamıştır.

Karagül ve ark. (68) MRSA su larında sefoksitin, oksasilin, moksalaktam disk testlerini karşılaştırmıştır. S.aureus su larında mecA gen varlığını multiplex PCR yöntemiyle araştırılmış ve referans yöntem olarak kabul edilmiştir. Metisilin direncinin tespit edilmesinde sefoksitin, oksasilin, moksalaktam disk testlerinin duyarlılık ve özgüllükleri %100 olarak tespit edilmiştir.

Çalışmamızda GeneXpert 90 hasta örneğinin 14'ünde MRSA pozitif bulunmuş olup (% 15), sefoksitin DDT ise GeneXpert ile pozitif bulunan 14 örneğinin sadece 4'ünde pozitif sonuç (% 4.4) elde edildi.

Özen ve ark.(69) klinik örneklerde izole edilen toplam 163 S.aureus su u çalışmaya alınmış, su ların tanımlanması BD Phoenix (Becton Dickinson, Sparks, ABD) otomatize identifikasyon ve antimikrobiyal duyarlılık sistemi kullanılarak yapılmıştır. Metisilin direncinin saptanmasında altın standart olarak kabul edilen mecA geni varlığını PCR yöntemi ile araştırılmış ve S.aureus olarak tanımlanan tüm su lar kromojenik MRSA ID agar besiyerine ekimi yapılmıştır. PCR yöntemi ile su ların 96'sında mecA geni pozitif, 67'sinde mecA geni negatif bulunmuştur. MecA geni pozitif su ların 82'si 24 saatlik inkübasyon sonrasında yeşil koloni oluştuğurken, 90'ı 48 saatlik inkübasyon sonrasında MRSA ID besiyerinde yeşil koloni oluştuğurmuştur. MecA geni negatif izolatlar ise 24 saatlik inkübasyon sonrasında besiyerinde üremezken, 48 saatlik inkübasyon sonrasında 40 MSSA izolatı besiyerinde yeşil koloni oluştuğurmuştur. MRSA saptanmasında; MRSA ID besiyerinin 24 saatlik inkübasyon sonrasında, duyarlılığı ve özgüllü ü sırasıyla % 85.4 ve % 53.7 olarak bulunmuştur. Besiyerinin 48 saatlik inkübasyon sonrasında duyarlılığı % 93.7'ye yükselirken, özgüllü ü % 40.3 olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar bu besiyerlerinin MRSA tanımlamasını direkt olarak yapabildiklerinden ek testlere olan ihtiyacı azaltarak zaman ve maliyet açısından önemli avantajlar sağladığını sonucuna varmışlardır.

Diederer ve ark.(70) yaptıkları çalışmaları MRSA ID besiyeri kullanılmı 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda duyarlılık %96.4 iken, 48 saat sonunda

duyarlılık arttı ve görülmü ve %98.8 olarak bulunmu tur. Özgüllük ise 24 saatlik inkübasyonun sonunda %92.2 iken, 48 saat sonunda azalarak %89.7 olarak bulunmu tur. Ara tırcılar inkübasyon süresinin 24 saatten 48 saate uzatılmasıyla özgüllük azaldı ve saptanmalar ve koagülaz negatif stafilokokların 48 saatlik süre sonucunda yanlış pozitif sonuçlara yol açabildiğini göstermektedir.

Perry ve ark. (71) yaptıkları çalışmada, MRSA suşlarını saptamada MRSA ID besiyerinin performansı, ilk 24 saatlik inkübasyonda CHROMagar MRSA ve ORSAB'a göre daha yüksek bulunmuştur, MRSA ID'nin sefoksitin içermesi nedeniyle, CHROMagar MRSA ve ORSAB'a göre MRSA'ları saptamada daha avantajlı olduğu belirtilmektedir.

Yazısız ve ark. (72) S. aureus suşlarında metisilin direncinin saptanması amacıyla mecA PCR, Phoenix otomatize sistemi ve sıvı mikrodilüsyon testinin karşılaştırılması amacıyla yapılan çalışmada 228 S. aureus suşu çalışmaya alınmıştır. Phoenix duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %99.4, %96.6 olup sıvı mikrodilüsyon yönteminin ise duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %98.2, %96.6 olarak saptanmıştır. Ara tırcılar bu iki yöntemin referans yöntem olan mecA geninin saptanması ile yüksek uyum olduğunu sonucuna varmışlardır.

Cesur ve ark. (73) MRSA suşlarının identifikasyonunda oksasiline tarama agar (ORSAB) ve kromojenik MRSA agar besiyerleri kullanılarak yapılan karşılaştırmalı çalışmalarıda ORSAB için duyarlılık ve özgüllük sırasıyla %97.7, %40 olup, kromojenik MRSA agar için ise %95.5, %37.6'dır. Bulunan düşük özgüllük (yüksek yanlış pozitiflik) oranı nedeniyle pozitif saptanan suşların diğer yöntemlerle doğrulanması gerektiğini ileri sürmüştür.

Warren ve ark. (74)'ün yaptıkları çalışmada Direkt nazal swabla alınan örneklerde MRSA'nın hızlı tesbit edilmesi için invitro diagnostik testleri (IDI-MRSA; Infectio Diagnostic, Inc., Sainte-Foy, Quebec, Canada,) kullanmışlar ve ara tırcılar 288 hasta örneğinde MRSA varlığını araştırmışlardır. IDI-MRSA kültürle karşılaştırıldığında duyarlılık %91.7, özgüllük %93,5 elde edilmiş olup, ara tırcılar IDI-MRSA testinin nazal kolonizasyonunu tesbit edilmede aynı gün sonuç veren duyarlı ve spesifik bir test olduğunu sonucunu elde etmişlerdir.

Boyce ve ark (75) MRSA'yı tespit etmek için CHROM agar ve BD GeneOhm testleri kullanılmış ve 286 nazal örnek çalışmaya alınmıştır. Ara tırcılar CHROM

agar MRSA testi ile PCR'ı karşılaştırdıklarında PCR'ın duyarlılığı %100, özgüllüğü ise %98.6 olarak bulunulmuştur. CHROM agar ile 63 hasta örneğinde (%22) MRSA pozitif olarak tespit edilmiş, buna karşın PCR metoduyla 72 örnekte (%25) MRSA pozitif sonuç elde edilmiştir. Ara tırcılar 69 örneğin (%24.1) gerçek pozitif sonuç olduğu, 3 örneğin ise (%1) PCR ile yanlış pozitif sonuç olduğu belirtilmiştir. PCR ile tespit edilen pozitif 6 örnek CHROM agarla negatif olarak bulunmuştur. Böylece PCR ile yeni MRSA taşıyıcılarının tespit edilmesi sağlanmıştır.

Van Hal ve ark. (76) yüksek risk grubundaki 200 hastayı nazal MRSA kolonizasyonu açısından taramışlar. Çalınan kromojenik selektif agar (MRSA ID ve C MRSA) ek olarak BD GeneOhm ve easy plex commercial RT PCR testleri kullanılarak yapılmış çalınan sonucunda BD GeneOhm testinin duyarlılığı %86, easy plex'in duyarlılığı %84 olup, MRSA ID ve CMRSA duyarlılığı sırasıyla %62, %84 bulunmuştur. Özgüllük easy plex (%90) dışında diğer yöntemlerde %98 olarak bulunmuştur. Ara tırcılar, kromojenik selektif agarda 48 saatlik inkübasyonun duyarlılığı arttırdığını bununla birlikte özgülük azalttığını belirtmişler ve bunun besiyerindeki kromojen maddeden kaynaklanabileceğini düşünmüşlerdir. Bununla birlikte moleküler yöntemlerin pahalı olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Peterson ve ark. (77) MRSA'nın sağlık kuruluşlarında görülme oranının giderek arttığını, bu nedenle MRSA kolonizasyonunun hızlı bir şekilde ortaya çıkarılmasının enfeksiyon geçişini azaltılabileceğini belirtmişlerdir. Ara tırcılar Roche LightCycle MRSA testi performansını BD GeneOhm MRSA testi ve kültürle karşılaştırmışlar. Toplam 1402 örnek çalınmaya alınmış, MRSA için direkt kültür altın standart kabul edilmiştir. LightCycler MRSA için duyarlılık %95.2, özgüllük %96.4 ve BD GeneOhm için %95.7, %91.7 bulunmuştur.

Laurent ve ark. (78) ileri ya grubundaki yatan hastaların nazal sürüntü örneklerinde GeneXpert real-time PCR testinin performansını değerlendirme amacıyla MRSA taraması yapılmıştır. Çift nazal sürüntü örneği ile alınan örnekler için Xpert MRSA testi ve kromojenik besiyerleri kullanılmıştır. Prospektif olarak 25 nazal MRSA taşıyıcısında içeren 246 hasta alınmış, kültürle karşılaştırıldığında Xpert MRSA duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %69.2, %97.7 olarak bulunmuştur. MRSA SCCmec'in evrimi nedeniyle bu testin yeni düzenleme ve dizaynının yapılması ve sürekli takip edilmesi gerektiğini belirtmişlerdir.

Akçalı ve ark. (79) burunda metisiline dirençli *S. aureus* saptamak için Cepheid Xpert MRSA testinin de erlendirilmesini yapmı lar. Çalı mada, kanlı agarda üretilmi olan *S.aureus* ATCC 6538 ve *S.aureus* ATCC 29213 su ları ile iki er adet farklı *S.aureus* ve *S.epidermidis* klinik izolatu test edilmi , tüm su lara CLSI kriterlerine uygun olarak oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon testi (DDT) uygulanmı , Vitek2 compact ve DDT ile metisiline duyarlı bulunan *S.aureus* izolatu, bu sistem ile pozitif sonuç verirken, her iki yöntemle de MRSA olarak saptanan izolat sistemde negatif sonuç vermi tir. Ayrıca MSSA oldu u bilinen ATCC 29213 su u ile MRSA oldu u bilinen ATCC 6538 su u bu sistemde pozitif sonuç vermi lerdir. Test edilen *S.epidermidis* su ları ile sistemde negatif sonuç alınmı tır. DDT ile uyumlu olmayan bu sonuçlar, sistemin fazla sayıda izolat ve di er moleküler bir yöntemle birlikte de erlendirilmesi gerekti ini göstermi tir. Ara tırcılar testin kullanımının son derece kolay olması, kitlerin oda sıcaklı nda saklanabilmesini avantaj olarak belirtmi ler. Ancak maliyeti yüksek olan bu testin, klinik kullanımının de erlendirilebilmesi amacıyla, ülkemizde çok merkezli çalı maların yapılması gerekti ini belirtmi ler.

Van Hal ve ark. (80) Çe itli örneklerde (nazal,koltuk altı,kasık) IDI MRSA ile GenoType MRSA'nın performanslarını kıyaslayan çalı malarında; IDI MRSA'nın nazal swablarla alınan örneklerde duyarlılı ı % 90, di er örnekler için (koltuk altı ve kasık) % 80 iken, GenoType MRSA'da ise bölgeden ba ımsız olarak (nazal, koltuk altı , kasık) % 69 olarak bulunmu tur. Özgüllük ise IDI MRSA için % 94, GenoType MRSA için % 96 olup, aynı çalı mada MRSA ID, MRSASelect ve CHROMAgar MRSA besiyerleri de kullanılmı tır. Bu besiyerleri için nazal sürüntü örneklerinde duyarlılık sırasıyla % 72, % 68, % 75; özgüllük ise swap çe idine ba lı olmaksızın % 95, % 98 ve % 99 olarak bulunmu tur. Ara tırcılar nazal swabların MRSA tesbitini kasık ve koltuk altı swablarından daha yüksek oranda belirledi i sonucuna varmı lardır.

Tenover sunumunda (81) BD Geneohm ve GeneXpertMRSA testlerinin kar ıla tırıldı ı bir çalı mada duyarlılık ve öz ülü ü BD GeneOhm için %97.1, %89.2, GeneXpert için %98,5, %90.4 olarak belirtmi tir. Yapılan çalı ma sonucunda ki test sonuçları arasında önemli bir fark bulunmadı ını ileri sürmü lerdir.

6. SONUÇ

Bizim çalı mamızda yo un bakım ünitelerine yatan 90 hasta örne inin 14'ünde GeneXpert ile MRSA pozitif bulduk, bu hasta örneklerinin 5'inde Chrom ID agarda ye il renkli renkli koloniler üremi olup MRSA pozitif olarak bulundu.

Çalı mamızda MRSA'nın tespit edilmesinde fenotipik yöntemler genotipik yöntemle kar ıla tırıldı. Yaptı ımız çalı ma sonucunda fenotipik yöntemlerle de erlendirilenmeyen su larda mecA gen varlı ını göstermek için PCR yöntemi yapılması uygun görüldü.

Metisilin direncinin belirlenmesindeki hatalar ciddi klinik sorunlara neden olabilir. Yalancı duyarlı sonuçlar tedavide yetersizli e ve MRSA su larının yayılmasına, yalancı dirençli sonuçlar ise glikopeptidlerin a ırı kullanımı ve gereksiz izolasyon tedbirleri nedeniyle a ırı maliyetle sonuçlanmaktadır. Metisiline dirençli stafilokokların birçok antibiyotige dirençli olması kısa sürede ve do ru olarak tespit edilmesinin önemini artırmaktadır. Bu nedenle stafilokoklarda metisilin direncinin do ru tanımlanması gereklidir. MecA geninin belirlenmesi ise MRS su larının ortaya çıkarılmasında en kesin yöntemdir.

Otomatize sistem ile metisiline dirençli su ların tespitinde; çok küçük bir oranda da olsa mecA geni içermemesi, mecA yönünden yanlı pozitif sonuçlar elde edilebilece ini, ancak farklı direnç mekanizmalarının bu duruma neden olabilece i görüldü. Stafilokoklarda heterojen dirençli su lar nedeniyle metisilin direncinin fenotipik yöntemlerle gösterilmesi sık olmasa da yanlı lıklara neden olmaktadır. Bu sorunun özellikle KNS'lerde, S. aureus'a göre daha da belirgin oldu u görülmektedir. Fenotipik yöntemlerin çevre artlarından çok etkilendi i göz önünde tutulmalı ve önerilen standartlar dı nda uygulamalardan kaçınılmalıdır.

Tedaviye klinik yanıtın olmadı ı olgularda ya da direnç sonuçlarının çıkması için 24-48 saat bekleyemeyecek hastalar gibi seçilmi olgularda moleküler yöntemlerin kullanılması daha hızlı ve do ru bir tercih olabilir.

KAYNAKÇA

1. Bannerman, L. T., Peacock J. S. Staphylococcus, Micrococcus ve Di er Katalaz Pozitif Koklar, Klinik Mikrobiyoloji (Manual of Clinical Microbiology), Murray PR, Baron J. Ellen, Jorgensen H. James (Ed). ,9 Baskı,Ankara, Atlas Kitapçılık, 2009,390-404.
2. Peacock SJ. Staphylococcus. In Borriello SP, Murray PR, Funke G. (Ed). Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections., 10th Ed., London, United Kingdom., Hodder Arnold ,2005: 771-832.
3. Shopsis B, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of methicillin resistant Staphylococcus aureus, Emerg Infect Dis, 2001; 7:323-326.
- 4- Ünal S. Staphylococcus aureus: Direnç mekanizmaları. Ulusoy S, Usluer G, Ünal S (Editörler). Önemli ve sorunlu gram pozitif bakteri enfeksiyonları'nda. Ankara, Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004.s.23-38.
- 5- Maranan MC, Moreira B, Vavra SB, Daum RS. Antimicrobial resistance in staphylococci. Infect Dis Clin North Am 1997;11:813-49.
6. Gülay Z. Gram Pozitif Bakteri nfeksiyonları: Direnç ve Epidemiyoloji, ANKEM Derg. 2008;22(Ek2):276-86.
7. Moreillon P, Que Y, Glauser MP. Staphylococcus aureus (Including Staphylococcal Toxic Shock). Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases 6th edition Volume 2, Elsevier Inc. 2005; 2321-52.
8. Saravolatz LD, Markowitz N, Pohlod DJ, Arking L, Fisher E., Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Epidemiologic observations during a community outbreak. Ann Intern Med.,1982; 96: 11-16.
- 9- Tünger A., Staphylococcus aureus: mikrobiyoloji, patogenez ve epidemiyoloji. in: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S, Gram-Pozitif bakteri enfeksiyonları, Ankara Bilmsel Tıp Yayınevi 2004; 9-68.
- 10- Waldvogel FA, Staphylococcus aureus (Including Staphylococcal Toxic Shock). In: MandellGL, Bennett JE, Dolin R (eds). Mandell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases. New York: Churchill Livingstone; 2000:2069-2092.
- 11- Cengiz A.T., Staphylococcus. Ustacelebi . Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabından. Gune Kitabevi, Ankara; 1999: 339-346.
- 12- Murray R. P. Rosenthal S. K., Pfaller A. M., Stafilokoklar ve Benzer Gram-Pozitif Koklar,Tibbi Mikrobiyoloji, 6. Baskı, Ankara,2010:209-223.
- 13- The gram-positive cocci: Part 1: Staphylococci and related organism. In: Alen S, Koneman E, Janda W, Schreckenberger P, Winn W, Woods G, Procop G. Eds. Color

- Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 5th Ed, Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins, 2006: 539-576.
- 14 - Cengiz AT. Staphylococcus. Usta çelebi . Temel ve Klinik Mikrobiyoloji Kitabından. Ankara:Güne Kitabevi, 1999: 339-346.
- 15 - Tünger A., Staphylococcus aureus: Mikrobiyoloji, patogenezi ve epidemiyoloji. In: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Gram-Pozitif Bakteri enfeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2004; 9-68.
- 16 - Ünal S., Staphylococcus aureus: Direnç mekanizmaları., Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. (ed.) Grampozitif bakteri enfeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2004: 23-38.
- 17 - Martin RR, Buttram V, Bosch P, et al. Nasal and vaginal Staphylococcus aureus in young women: Quantitative studies. Ann Intern Med. 1982;96:951.
- 18 - Dündar V. Oztürk Dundar D. Stafilokok enfeksiyonları. Topcu AW, Soyletir G, Do anay M., enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul;2002:1507-1516.
- 19 Diekema DJ, Pfaller M.A, Schmitz FJ et al. Survey of Infections due to Staphylococcus species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in United States, Canada, Latin America, Europe, and Westren Pacific Region from the CENTRY Antimicrobial Surveillance Program,1997-1999.CID 2001;32 (Suppl 2):114-132.
- 20- Sader HS,Streit JM, Fritsche TR, Jones RN.Antimicrobial susceptibility of Gram-positive bacteria from European medical centres: results of the daptomiçin surveillance programme (2002-2004) Clin Microbiol Infect 2006; 12:844-852.
- 21 - Cuevas O, Cercenado E, Vindel A et al. Evolution of the antimicrobial resistance of Staphylococcus spp. in Spain. Five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. Antimicrob Agents Chemother, 2004;48:4240-4245.
- 22 - Bouza E, San Juan R, Munoz P, Pascau J, Voss A, Desco M. Cooperative Group of the European Study Group on Nosocomial Infections (ESGNI). A European perspective on intravascular catheter-related infections: report on the microbiology workload, aetiology and antimicrobial susceptibility (ESGNI-005 Study). Clin Microbiol Infect, 2004; 10:838-842.
- 23 Derbentli . Cerrahi enfeksiyonlarda dirençli Gram pozitif bakteri sorunu. ANKEM Derg, 2004;18:215-221.
- 24 - Derbentli ., Stafilokoklarda antibiyotik direnci: 2003-2004 Türkiye haritası. ANKEM Derg,2005; 19 (Ek 2):54-60.

- 25-Dünder V., Dünder DÖ., Stafilokok Enfeksiyonları. In: Topçu AW, Söyletir G, Do anay M. Ed.Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2008; 2065-2077.
- 26 -Archer GL,Climo MW. Staphylococcus epidermidis and other coagulase-negative staphylococci. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2005: 2352-2360.
- 27 - Kloos WE, Bannerman TL. Update on clinical significance of Coagulase-Negative Staphylococci. Clin Microbiol Rev, 1994; 7: 117-140.
- 28 . Bilgehan H., Gram olumlu koklar. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. İzmir: Fakülteler kitabevi, 2002;31: 496-523.
- 29- Rice LB, Sahn D, Bonomo RA. Mechanism of resistance to antimicrobial agents. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RC. Ed. Manual of Clinical Microbiology 8thEd. Washington DC, 2003: 1074-1101.
- 30- Gür D. Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç. Topçu AW, Söyletir G, Do anay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2008: 243-257.
- 31- Hiramatsu K, Katayama Y, Yuzawa H et al. Molecular genetics of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Int J Med Microbiol, 2002; 292:67-74.
- 32- Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: Molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev, 1997; 10:781-91.
- 33- Hanssen AM, Ericson Sollid JU. SCCmec in staphylococci: genes on the move. FEMS Immunol Med Microbiol, 2006; 46:(1):8-20.
- 34- Ito T, Okuma K, Ma XX et al. Insights on antibiotic resistance of Staphylococcus aureus from its whole genome: genomic island SCC. Drug Resist Update, 2003; 6:41-52.
- 35- Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Trends Microbiol, 2001; 9:486-93.
- 36-Martins A, Cunha MRS. Methicillin resistance in Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. Microbiol Immunol, 2007; 51(9):787-795.
- 37- Deresinski S. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus: An Evolutionary, Epidemiologic, and Therapeutic Odyssey. CID 2005;40:562-73.
- 38- Hiramatsu K, Katayama Y, Yuzawa H, Ito T. Molecular genetics of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Int J Med Microbiol 2002;292:67-74.

- 39- Ito T, Katayama Y, Asada K, Mori N, Tsutsumimoto K, Tiensasitorn C, Hiramatsu K. Structural comparison of Three Types of Staphylococcal Cassette Chromosome in Methicillin resistant Staphylococcus. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1323-36.
- 40- Ito T, Katayama Y, Hiramatsu K. Cloning and Nucleotide Sequence Determination of the Entire mec DNA of Pre-Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus N315. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1449-58.
- 41-- Said Salim B, Mathema B, Kreiswirth BN: Community-acquired methicillin- resistance Staphylococcus aureus: an emerging pathogen, *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003; 24 (6): 451-5.
- 42- Zautis TE, Toltzis P, Chu J, Abrams T, Dul M, Kim J, McGowan KL, Coffin SE: Clinical and Molecular epidemiology of Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections among children with the risk factors for health care-associated infection: 2001-2003, *Pediatr Infect Dis J* 2006;25 (4):343-8.
43. Kılıç A., Antimikrobik Kemoterapi Laboratuvar Uygulamaları ve Yenilikler, Gülhane Mikrobiyoloji Günleri, 20-22 Nisan 2010, erişim 10 Ocak 2011 http://www.tmc-online.org/userfiles/file/gulhane_gunleri_sunumlar/Abdullah_Kilic.pdf
- 44- 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.
- 45- Bachi BB, Rohrer S. Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Arch Microbiol*, 2002;178:165-171.
- 46- Gülay Zeynep, Çoklu Dirençli Hastane Enfeksiyonu Etkenlerinin Kontrolünde Hızlı Tanı Testleri, *ANKEM Derg*, 2009;23(Ek2): 193-200.
- 47- Warren DK, Liao RS, Merz LR, Eveland M, Dunne WM Jr., Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus directly from nasal swab specimens by a real-time PCR assay, *J Clin Microbiol*. 2004 Dec;42(12):5578-81.
- 48- Sancak B. Staphylococcus aureus'ta metisilin ve vankomisin direnci, *Hacettepe Tıp Dergisi* 2007; 38:127-134.
- 49- Dündar V. ve Dündar D. Ö., Stafilokok Enfeksiyonları, Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi 2, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008: 2065-2076.
- 50- Cavassini M, Wenger A, Jaton K et al. Evaluation of MRSA-screen, a simple anti-PBP2a slide latex agglutination kit, for rapid detection of methicillin resistance Staphylococcus aureus. *J Clin Microbiol*, 1999; 37:1591-1594.

- 51- Rasheed JK, Cockerill F, Tenover FC. Patojen Bakterilerde Antimikrobiyal Direnç genlerinin Saptanması ve Tanımlanması. In Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Landry M (Ed.) Manual of Clinical Microbiology 9. Baskı, Ankara, 2009; 1248-1267.
- 52- Kitagawa Y, Ueda M, Ando N, Endo M, Ishibiki K, Kobayashi Y, Arai T, Kitajama M: Rapid diagnosis of Methicillin – resistant Staphylococcus aureus bacteremia by nested polymerase chain reaction, Ann Surg 1996;224 (5): 665-71.
- 53- Durmaz, R., Direnç Gelişimini Önlemede Moleküler Mikrobiyolojinin Katkısı, Aknem Dergisi, 2009;23(Ek 2),111-115.
- 54- Turgut H., Saçar S., Sungurtekin H., Toprak S. ve arkadaşları, “Nozokomiyal Metisilin Dirençli Staphylococcus aureus enfeksiyonlarının Epidemiyolojisi” Nobel Medicus Online Dergi, <http://www.nobelmedicus.com/contents/200513/07-10.htm> (Erişim tarihi, 28.04.2010).
- 55- Wolk D.M, Struelens M.J., Pancholi P., Davis T., Della-Latta P. et al, Rapid Detection of Staphylococcus and Methicillin – Resistant S. aureus (MRSA) in Wound Specimens and Blood Cultures: Multicenter Preclinical Evaluation of The Cepheid Xpert MRSA/SA Skin and Soft Tissue and Blood Culture Assays, Journal of Clinical Microbiology, Mar.2009,p.823-826.
- 56- Kelley P.G. , Grabsch E. A, Howden B. P., Gao W. and Grayson M. L. Comparison of the Xpert Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Assay, BD GeneOhm MRSA Assay, and Culture for Detection of Nasal and Cutaneous Groin Colonization by MRSA, J Clin Microbiol. 2009 November; 47(11): 3769–3772.
- 57- Wolk D. M., Picton E., Johnson D., Davis T., Pancholi P. et al. Multicenter Evaluation of the Cepheid Xpert Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Test as a Rapid Screening Method for Detection of MRSA in Nares, Journal of Clinical Microbiology, , Vol. 47, No. 3, March 2009: 758-764.
- 58- Havil, N. L. , Recent Advances in MRSA Surveillance Detection, Infection Disease Special Edition 2010: 31-35.
- 59- Swenson, Jana M., Patel J.B., Jorgensen J.H., Antibakteriyel Direnci Saptamada Özel Fenotipik Yöntemler, Klinik Mikrobiyoloji (Manual of Clinical Microbiology), Murray PR, Baron J. Ellen, Jorgensen H. James (Ed),.Atlas Kitapçılık,9 Baskı,Ankara, 2009:1173-1192.
- 60- Goffinet P, Louahabi A, Hougard N. Specific detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus directly from clinical specimen by real-time polymerase chain reaction.ESCMID, 2005: 1134.

- 61- Horstkotte MA, Knobloch JKM, Rohde H et al. Rapid detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci with the Vitek 2 system. *J Clin Microbiol*, 2002; 40:3291-3295.
- 62- Kolbert CP, Arruda J, Varda-Delmore P et al: Branched-DNA assay for detection of the *mecA* gene in oxacillin-resistant and oxacillin-sensitive staphylococci. *J Clin Microbiol*, 1998; 36:2640-2644
- 63- NCCLS (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement. CLSI Document M100-S15 Pennsylvania: CLSI, 2005.
- 64- Telli M, Sümerkan B, E el D. Staphylococcus aureus'ta metisilin direncinin belirlenmesinde sefoksitin disk, oksasilin disk, oksasilin agar tarama ve PBP2a lateks testlerinin karılaştırılması. *InfekDerg*, 2006; 20:93-96.
- 65 - Swenson JM, Tenover FC. Result of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in Staphylococcus spp. *J Clin Microbiol*, 2005; 43:3818-3823.
- 66- Swenson JM, Lonsway D, McAllister S et al. Detection of *mecA*-mediated resistance using reference and commercial testing methods in a collection of Staphylococcus aureus expressing borderline oxacillin MICs. *Diagn Microbiol and Infect Dis*, 2007; 58:33-39.
- 67- Broekema N. M., Van T. T., Monson Timothy A., Marshall Steven A., and Warshauer David M. Comparison of Cefoxitin and Oxacillin Disk Diffusion Methods for Detection of *mecA*-Mediated Resistance in Staphylococcus aureus in a Large-Scale Study, *Journal of Clinical Microbiology*, January 2009 Vol. 47, No. 1, , p. 217-219.
- 68- Karagül A., Özhak B. B., Ö ünç D. ve ark., Staphylococcus aureus su larında sefoksitin, oksasilin, moksalaktam disk testlerini karılaştırması, XXXII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kongre Kitabı, İstanbul, 2008, 731-732.
- 69- Özen N. S., Da lar D., Baysan B. Ö. ve ark. "Metisilin Dirençli Staphylococcus Aureus Su larının Saptanmasında Mrsa Id Kromojenik Besiyerinin De erlendirilmesi", *ANKEM Derg* 2011;25(1):31-34.
- 70- Diederer BM; van Leest ML; van Duijn I; Willemse P; van Keulen PH; Kluytmans JA, Performance Of MRSA ID, A New Chromogenic Medium For Detection Of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus., Diederer BM - *J Clin Microbiol* - 01-FEB-2006; 44(2): 586-8.

- 71- Perry JD, Davies A, Butterworth LA, Hopley AL, Nicholson A, Gould FK.,
Development And Evaluation Of A Chromogenic Agar Medium For Methicillin-
Resistant Staphylococcus Aureus, J Clin Microbiol. 2004 Oct;42(10):4519-23.
- 72- Yazısız H., Özcan A., Özhak B. ve ark., Staphylococcus Aureus Su larında Metisilin
Direncinin Saptanmasında mecA PCR,Phoenix Otomatize Sistemi ve Sıvı
Mikrodilasyon Testinin Kar ıla tırılması , XXXII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kongre
Kitabı, stanbul, 2008,s.413.
- 73- Cesur S., Yıldız E., Irmak H.ve ark. , Metisilin Dirençli Staphylococcus Aureus
Su larının identifikasyonunda Oksasiline Tarama Agar ve Kromojenik MRSA Agar
Besi Yerlerinin Kar ıla tırılması, XXXII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi Kongre Kitabı,
stanbul, 2008,s.413-414.
- 74- Derek F.J. B., David I. E., Peter M. H. Et all. Metisilin Dirençli Staphylococcus
aureus'un (MRSA) laboratuvar Tanısı ve Duyarlılık Testi için Klavuzlar,
Antimikrobial Kemoterapi Dergisi, (2005) 56,1000-1018.
- 75- John M.B. and Nancy L.H., Comparison of BD GeneOhm MRSA PCR versus
CHROMagar MRSA for Screening Patients for Methicillin-Resistant Staphylococcus
aureus , J. Clin. Microbiol. doi:10.1128/JCM.02130-07, JCM Accepts, published online
ahead of print on 21 November 2007.
- 76- Van Hal S. J. , Jennings Z. , Stark D. , Marriott D. and Harkness J. MRSA detection:
comparison of two molecular methods (BD GeneOhm® PCR assay and Easy-Plex) with
two selective MRSA agars (MRSA-ID and Oxoid MRSA)for nasal swabs, European
Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases Volume 28, Number 1 ,2009,
47-53.
- 77- Peterson LR, Liesenfeld O, Woods CW, Allen SD, Pombo D, Patel PA, Mehta MS,
Nicholson B, Fuller D, Onderdonk A., Multicenter evaluation of the LightCycler
methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) advanced test as a rapid method for
detection of MRSA in nasal surveillance swabs, J Clin Microbiol. 2010 May;48(5):1661-
6.
- 78- Laurent C, Bogaerts P, Schoevaerdt D, Denis O, Deplano A, Swine C, Struelens MJ,
Glupczynski Y., Evaluation of the Xpert MRSA assay for rapid detection of methicillin-
resistant Staphylococcus aureus from nares swabs of geriatric hospitalized patients and
failure to detect a specific SCCmec type IV variant, Eur J Clin Microbiol Infect Dis.
2010 Aug;29(8):995-1002.
- 79- Akçalı A., Otkun M. T., ener A. Ve ark. Burunda Metisiline Dirençli Staphylococcus
aureus Saptamak için Cepheid Xpert MRSA Testinin De erlendirilmesi, 6 Moleküler

Mikrobiyoloji Kongresi,

http://78.187.81.117/6kongrebildiri/6MolekulerMikrobiyolojiKongresi_bildiriler.pdf ,
15.03.2011.

- 80- S. J. van Hal, D. Stark, B. Lockwood, D. Marriott, and J. Harkness, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Detection: Comparison of Two Molecular Methods (IDI-MRSA PCR Assay and GenoType MRSA Direct PCR Assay) with Three Selective MRSA Agars (MRSA ID, MRSASelect, and CHROMagar MRSA) for Use with Infection-Control Swabs, *J Clin Microbiol.* 2007 August; 45(8): 2486–2490.
- 81- Tenover F.C., Rapid Diagnosis of MRSA Colonization: State of The Art, idsociety.org/WorkArea/downloadasset.aspx?id=7490 , eri im 23.02.2011.