

T. C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İNFEKSİYON HASTALIKLARI ve KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

HASTANE KÖKENLİ KOAGÜLAZ NEGATİF
STAFİLOKOK SUŞLARINDA OKSASİLİN DİRENCİNİN
MOLEKÜLER ve GELENEKSEL YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI

Dr. Hasan PEKSEL

UZMANLIK TEZİ

İZMİR

2006

T. C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
İNFEKSİYON HASTALIKLARI ve KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

HASTANE KÖKENLİ KOAGÜLAZ NEGATİF
STAFİLOKOK SUŞLARINDA OKSASİLİN DİRENCİNİN
MOLEKÜLER ve GELENEKSEL YÖNTEMLERLE
ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. Hasan PEKSEL

DANIŞMANLAR
Prof. Dr. Ayşe YÜCE
Doç. Dr. Nur YAPAR

İZMİR
2006

Bu uzmanlık tezi DEUTF Klinik Bilimler Etik Kurulundan
23.02.2005 tarih, 32 sayı ve 617 protokol numarası ile etik kurul onayı almıştır.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini bizlerle paylaşan hocalarım Sayın Prof. Dr. Ayşe Yüce, Sayın Prof. Dr. Nedim Çakır, Sayın Yard. Doç. Dr. Mine Erdenizmenli Saccosa, Sayın Doç. Dr. Nur Yapar, Sayın Öğr. Gör. Uz. Dr. Vildan Avkan Oğuz, Sayın Öğr. Gör. Uz. Dr. Ziya Kuruüzüm'e;

Tez araştırmam sırasında yardımlarını eksik etmeyen Sayın Prof. Dr. Zeynep Gülay'a

Tez çalışmamda desteklerinden dolayı PCR laboratuvarı görevlileri Sayın Berrin Koldan ve Filiz Ayata başta olmak üzere tüm Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Bölümü ekibine;

Uzmanlık eğitimim boyunca, beraber çalıştığım uzman ve asistan arkadaşlarıma;

Tüm Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı hemşire, sekreter ve personeline;

Hayatımı güzelleştiren ve anlam katan, zorlu meslek yaşantımda bana gösterdikleri sevgi ve anlayış ile her zaman destek olan canım eşime ve aileme;

Sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürler...

Dr. Hasan Peksel

ÖZET

Hastane Kökenli Koagülaz Negatif Stafilokok Suşlarında Oksasilin Direncinin Moleküler ve Geleneksel Yöntemlerle Araştırılması

Dr. Hasan PEKSEL *

Danışmanlar: Prof. Dr. Ayşe YÜCE*, Doç. Dr. Nur YAPAR *

* Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji A.D. İZMİR

Amac: Hastane kökenli koagülaz negatif stafilokoklarda (KNS) metisilin direncinin, Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü – CLSI (The Clinical and Laboratory Standards Institute) önerileri doğrultusunda, oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon testi, oksasilin agar dilüsyon testi ve dirençten sorumlu *mecA* geninin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile gösterilmesi planlandı.

Gereç yöntem: Nisan 2005 ile Eylül 2005 tarihleri arasında, hastanemizde yatan hastaların kan kültürlerinden elde edilen ve hastane kökenli oldukları belirlenen 105 KNS izolatı çalışmaya alındı. Bu KNS izolatlarında, metisilin direncini göstermek üzere CLSI önerileri doğrultusunda; oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon testleri, oksasilin agar dilüsyon testi ve *mecA*-PCR gerçekleştirildi.

Bulgular: Çalışılan 105 KNS izolatının 56 tanesi (% 53.3) yoğun bakım ünitelerinden (YBÜ), 27 tanesi (% 25.7) dahili birimlerden, 22 tanesi de (% 21) cerrahi birimlerden gönderilen örneklerden elde edilmiş izolatlardı. Oksasilin disk difüzyon testine göre izolatların 82'si oksasiline dirençli, 23'ü duyarlı bulundu. Sefoksitin disk difüzyon yöntemine göre izolatların 80'i sefoksitine dirençli, 25'i duyarlı bulundu. Oksasilin agar dilüsyon testine göre ise izolatların 84'ü oksasiline dirençli, 21'i duyarlı bulundu. Dikkat çekici bir bulgu olarak elde edilen dirençli 84 izolatın 46 tanesinin (% 54.8) MİK değeri ≥ 4 µg/ml olarak bulundu. KNS'lerin *mecA*-PCR yöntemi ile 83'ünde (% 79) *mecA* geni gösterilirken, 22'sinin (% 21) *mecA* geni negatif bulundu.

İstatistiksel analiz: Dört gözlü tablo ile elde edilen verilere göre; oksasilin disk difüzyon, sefoksitin disk difüzyon ve oksasilin agar dilüsyon yöntemlerinin altın standart olarak kabul edilen *mecA*-PCR yöntemine göre duyarlılıkları sırasıyla % 97.59, % 96.38, % 100 ve seçilimleri sırasıyla % 95.45, % 100 ve % 95.45 olarak bulunmuştur. Testlerin ROC eğrisi altında kalan alana göre elde edilen “k” değerlerine göre; fenotipik

yöntemlerden sefoksitin disk difüzyon testi diğer yöntemlere göre altın standart teste en yakın test olarak bulunmuştur.

Sonuç: Stafilocoklarda heterojen dirençli suşlar nedeniyle metisilin direncinin fenotipik yöntemlerle gösterilmesi sıklıkla yanlışlıklara neden olmaktadır. Bu sorunun özellikle KNS'lerde, *Staphylococcus aureus*'a göre daha da belirgin olduğu gözlenmektedir. Sefoksitin disk difüzyon yönteminin oksasiline göre metisilin direncini göstermedeki üstünlüğü bizim çalışmamızda da belgelenmiştir. Ancak en ideali; hem KNS'lerde hem de *S.aureus*'ta metisilin direncinin belirlenmesinde altın standart olarak kabul edilen PCR ile *mecA* geni saptanması yönteminin giderek rutin laboratuvarlarda da kullanıma girmesidir.

Anahtar kelimeler: Koagülaz negatif stafilokok, duyarlılık testleri, oksasilin direnci.

Abstract

Evaluation of Oxacillin Resistance by Traditional and Molecular Methods in Nosocomial Strains of Coagulase Negative Staphylococci

PEKSEL Hasan, MD. *

Advisors: YÜCE Ayşe, MD, Professor of Infectious Diseases and Clinical Microbiology* and YAPAR Nur, MD, Assoc. Professor of Infectious Diseases and Clinical Microbiology *

* Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Infectious Diseases and Clinical Microbiology Department
Izmir / Turkey

Purpose: To detect the methicillin resistance in nosocomial strains of coagulase negative staphylococci (CoNS) by oxacillin and ceftazidime disc diffusion tests, oxacillin agar dilution test and to show the gene sequence “*mecA*” that is responsible for the resistance by polymerase chain reaction (PCR) according to the Clinical Laboratory Institute (CLSI) suggestions.

Materials and methods: Nosocomial strains of 105 CoNS were isolated from blood cultures of patients in Dokuz Eylül University Hospital, between April to September 2005. To detect the methicillin resistance; oxacillin and ceftazidime disc diffusion tests, oxacillin agar dilution test and *mecA* polymerase chain reaction (PCR) were conducted according to the CLSI suggestions.

Results: Of the evaluated CoNS isolates, 56/105 (53.3 %) were from the intensive care units (ICU), 27/105 (25.7 %) isolates were from medical departments and 22/105 (21 %) isolates were from the surgical departments. By the oxacillin disc diffusion test; 82 isolates were resistant and 23 were susceptible to oxacillin. By the ceftazidime disc diffusion test; 80 isolates were resistant and 25 were susceptible to ceftazidime. By the oxacillin agar dilution test; 84 isolates were resistant and 21 were susceptible to oxacillin. It's conspicuous that the minimum inhibition concentrations of 46/84 (54.8 %) isolates were ≥ 4 µg/ml. By the method *mecA*-PCR; 83/105 (79 %) of isolates were *mecA* positive and 22/105 (21 %) were *mecA* negative.

Statistical analysis: By the data gained from the four-filled table; the sensitivity of oxacillin disc diffusion test, ceftazidime disc diffusion test and oxacillin agar dilution tests when compared with the gold standard test *mecA*-PCR were; 97.59 % ; 96.38 % and 100%

respectively. The specificity of the tests were; 95.45 % ; 100 % and 95.45 % respectively. By the results of the ROC analysis, cefoxitin disc diffusion test was the most concordant test reflecting the results of gold standard method *mecA*-PCR

Conclusion: Evaluating methicillin resistance in staphylococci by phenotypic methods will mostly cause inaccuracy. This is a more common and evident problem in CoNS than *Staphylococcus aureus*. The results of our study showed that the cefoxitin disc diffusion test is preferable to the oxacillin disc diffusion method. But it's considered that the gold standard method *mecA*-PCR must be used in the routine laboratory to show the methicillin resistance in both CoNS and *S.aureus*.

Key words: Coagulase-negative *Staphylococci*, susceptibility testing, oxacillin resistance

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET	iv
İNGİLİZCE İSİM ve ÖZET	vi
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
TABLO DİZİNİ	xiv
ŞEKİL DİZİNİ	xv
RESİM DİZİNİ	xv

1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
-----------------------	---

2. GENEL BİLGİLER	2
-------------------------	---

2.1 Tarihçe ve Sınıflama.....	3
2.2. KNS'lerin Laboratuvar Tanısı.....	5
2.2.1. Morfolojik Özellikleri	5
2.2.2. Direkt Gram Boyama	6
2.2.3. Katalaz Testi	6
2.2.4. <i>Micrococcus</i> Türlerinin <i>Staphylococcus</i> Türlerinden Ayırılması.....	6
2.2.5. KNS'leri <i>S.aureus</i> 'tan Ayıran Yöntemler	7
2.2.5.1 Lam Koagülaz Testi	8
2.2.5.2 Tüp Koagülaz Testi	8
2.2.5.3 Mannitol Hidrolizi.....	9
2.2.6. KNS Türlerinin Kendi Aralarında Ayırımı.....	9
2.3. KNS'lerin Etken Olduğu Enfeksiyonlarda Patogenez	11
2.3.1. <i>S.epidermidis</i> 'in Biyofilm Oluşturma Mekanizması.....	11
2.3.2. <i>S.epidermidis</i> 'in Diğer Virulans Faktörleri	15
2.3.3. Lantibiyotik Üretimi.....	15
2.3.4. Konak İçerisinde Demir Kazanımı	16
2.3.5. <i>S.saprophyticus</i> 'un Patojenitesi	16
2.3.6. <i>S.lugdunensis</i> ve <i>S.schleiferi</i> 'nin Virülans Faktörleri	17
2.4. KNS'lerin Etken Olduğu Enfeksiyonlar	19

2.4.1. İntravenöz Kateter İnfeksiyonları ve Nozokomiyal Bakteriyemi.....	19
2.4.2. Doğal ve Prostetik Kapak Endokarditi.....	20
2.4.3 Serebrospinal Sıvı Şantı İnfeksiyonları.....	21
2.4.4. Peritoneal Diyaliz Kateteri İlişkili Peritonit	22
2.4.5. İdrar Yolu İnfeksiyonları.....	23
2.4.6. Protez Eklem İnfeksiyonu ve Osteomyelit.....	24
2.5 KNS infeksiyonlarında Kullanılan Antibiyotikler ve Tedavi	25
2.5.1. MS-KNS ile Oluşmuş İnfeksiyonlarda Tedavi.....	25
2.5.2. Stafilokoklarda Penisilin Direnci.....	26
2.5.3. Stafilokoklarda Metisilin Direnci	27
2.5.3.1. Metisilin Direncinin Düzenlenmesi	32
2.5.3.2. Metisilin Direncinin Belirlenmesinde Kullanılan Laboratuvar Yöntemleri	32
2.5.3.2.1. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri.....	32
2.5.3.2.2. Aglütinasyon Testleri.....	33
2.5.3.2.3. Moleküler Yöntemler	34
2.5.3.2.4. MR-KNS İnfeksiyonunda Kullanılabilecek Antibiyotikler.....	34
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	38
3.1. Koagülaz Negatif Stafilokokların Eldesi ve Tanımlanması.....	38
3.2. Kullanılan Standart Suşlar.....	38
3.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	39
3.4. Disk Difüzyon Testi.....	39
3.5. Agar Dilüsyon Testi ile Oksasilin MİK Değerinin Saptanması	40
3.5.1. Agar Dilüsyon Plaklarının Hazırlanması	40
3.5.2. İnokulum Hazırlanması	42
3.5.3. Agar Dilüsyon Plaklarının İnokülasyonu	42
3.5.4. Agar Dilüsyon Plaklarının İnkübasyonu	43
3.5.5. Agar Dilüsyon Son Noktaların (MİK) Belirlenmesi	43
3.6. PCR ile Metisilin Dirençli KNS Saptanması:	44
3.6.1. Akromopeptidaz Yöntemi ile DNA Ekstraksiyonu	44
3.6.2. <i>mecA</i> PCR İçin Gerekli Malzemeler.....	44

3.6.3. <i>mecA</i> PCR Uygulanması	45
3.6.4. Agaroz Jelin Hazırlanması ve Sonuçların Değerlendirilmesi.....	46
4. BULGULAR	47
4.1. Oksasilin ve Sefoksitin Disk Difüzyon Testi Sonuçları	47
4.2. Agar Dilüsyon ile Oksasilin MİK Değeri Sonuçları.....	48
4.3. <i>mecA</i> PCR Sonuçları.....	49
5. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ ve İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	54
6. TARTIŞMA	58
7. KAYNAKLAR.....	71
Ek 1: Tez Onay Formu.....	82

SİMGELER VE KISALTMALAR

AAP	Yığılma fazı ilişkili proteinin “Accumulation associated protein”
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ADTS	Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu grubu
Bap	Biyofilm ilişkili protein “Biofilm associated protein”
Bhp	Bap homolog proteini
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
BSCA	“British Society of Antimicrobial Chemotherapy”
CAPD	Devamlı ayaktan peritoneal diyalizi
CASFM	“Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie”
CDC	“Centers for Disease Control and Prevention”
CFU	Koloni oluşturan ünite “Colony forming unit”
CLSI	“The Clinical and Laboratory Standards Institute”
CRG	“Commissie Richtlijnen Gevoeligsbepalingen”
CRF	“Coagulase reacting factor”
DIN	“Deutsches Institut für Normung”
DNA	Deoksiribonükleik asit
ESCMID	“European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease”
EUCAST	“The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing”
FAME	Yağ asidi modifiye edici enzim “Fatty acid modifying enzyme”
Fbe	Fibrinojen bağlayan protein
FDA	“Food and Drug Administration”
GISA	Glikopeptite orta duyarlı <i>S.aureus</i>
HICPAC	“Hospital Infection Control Practices Advisory Committee”

HIV	İnsan immun yetmezlik virusu
Ig	İmmunglobulin
IS	“Insertion sequence”
İYİ	İdrar yolu infeksiyonu
KDİ	Kan dolaşımı infeksiyonu
KAMHA	Katyonu ayarlanmış MHA
KNS	Koagülaz negatif stafilokok
MHA	Mueller Hinton Agar,
MHBY	Mueller Hinton Besiyeri (sıvı)
MR-KNS	Metisilin dirençli koagülaz negatif stafilokok
MS-KNS	Metisilin duyarlı koagülaz negatif stafilokok
MRS	Metisilin dirençli stafilokok
MRSA	Metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Metisilin duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSE	Metisilin dirençli <i>Staphylococcus epidermidis</i>
MSSE	Metisilin duyarlı <i>Staphylococcus epidermidis</i>
MİK	Minimal İnhibitör Konsantrasyon
NCCLS	“The National Committee for Clinical Laboratory Standarts”
NNIS	“National Nosocomial Infections Surveillance System”
NWGA	“Norwegian Working Group on Antibiotics”
ORF	Açık okuma bölgesi “Open reading frame”
PBP	Penisilin bağlayıcı protein
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu (“polymerase chain reaction”)
PIA	Polisakkarit hücre içi adezin

PMMA	Polimetilmetakrilat
PS/A	Polisakkarit/adezin
RNA	Ribonükleik asit
SAA	Slime-iliskili antijen “Slime associated antigen”
SRGA	“The Swedish Reference Group for Antibiotics”
SSP	Stafilokokal yüzey protein “Staphylococcal surface protein”
<i>Ssp</i>	<i>S.saprophyticus</i> yüzey ilişkili protein
SCC	Stafilokokal kaset kromozam “Staphylococcal cassette chromosome”
TNF α	“Tumor necrosis factor α ”
TMC	Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti
YBÜ	Yoğun bakım ünitesi

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: İnsan deri ve mukozalarının normal florasını oluşturan bakteriler	2
Tablo 2: Bugüne kadar tanımlanmış stafilokok tür ve alt türleri	4-5
Tablo 3: <i>Staphylococcus</i> , <i>Micrococcus</i> ve <i>Macrococcus</i> türlerinin fenotipik özellikleri	7
Tablo 4: <i>S.aureus</i> dışı koagülaz pozitif stafilokokların tüp ve lam koagülaz özellikleri	8
Tablo 5: KNS türlerinin novobiyosine duyarlılığına göre ayrımı	9
Tablo 6: Sık izole edilen KNS türlerinin biyokimyasal özellikleri	10
Tablo 7: Stafilokokların yüzey proteinleri ve fonksiyonları	18
Tablo 8: CLSI'ye göre KNS'lerde metisilin direnci saptama yöntemleri	33
Tablo 9: MR-KNS suşlarının diğer antibiyotiklere karşı duyarlılık durumu	36
Tablo 10: Stafilokoklarda antibiyotik direnç mekanizmaları	37
Tablo 11: KNS'lerde disk difüzyon yöntemleri ile metisilin direnci saptanması için CLSI önerileri	39
Tablo 12: Agar dilüsyon testinde kullanılacak oksasiline sulandırım şeması	41
Tablo 13: <i>mecA</i> primerleri	45
Tablo 14: KNS'lerin geldiği kliniklere göre dağılımı	47
Tablo 15: Oksasiline ve sefoksitin ile yapılan disk difüzyon sonuçları	47
Tablo 16: KNS izolatlarının MİK değerlerine göre sayısal dağılımları	48
Tablo 17: KNS izolatlarının <i>mecA</i> varlıklarının servislere göre dağılımları	49
Tablo 18: KNS izolatlarının disk difüzyon, MİK ve <i>mecA</i> PCR toplu sonuçları	51-53
Tablo 19: İstatistiksel hesaplamalar için kullanılan dört gözlü tablo	54
Tablo 20: Oksasiline ve sefoksitin disk difüzyon; oksasiline MİK ve <i>mecA</i> gen varlığı arasındaki ilişki	55
Tablo 21: Kullanılan testlerin istatistiksel anlamları	55
Tablo 22: Kullanılan testlerin ROC eğrisi ile elde edilen κ değerlerinin karşılaştırılması	57
Tablo 23: Farklı Avrupa ülkelerinde kabul edilen oksasiline ve sefoksitin disk difüzyon zon çapları ve MİK değerleri	65

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: <i>S.epidermidis</i> 'in biyofilm oluşturma mekanizması için şematik model	15
Şekil 2: Stafilokoklarda saptanan SCCmec tipleri	29
Şekil 3: Stafilokoklardaki <i>mec</i> geni sınıfları	30
Şekil 4: KNS izolatlarının MİK değerlerine göre yüzdesel dağılımları	49
Şekil 5: KNS'lerin birimler içerisindeki <i>mecA</i> pozitifliği yüzdesi	50
Şekil 6: <i>mecA</i> geni varlığına göre MR-KNS'lerin servislere göre dağılımı.....	50

RESİM DİZİNİ

Resim 1: % 5 Koyun kanlı agarda <i>S.epidermidis</i> 'in görünümü.....	6
Resim 2: Klinik örnekte Gram boyama ile <i>S.epidermidis</i> 'in görünümü.....	6
Resim 3: <i>S.epidermidis</i> 'in uzun dönem kullanılmış silikon bir kateter üzerinde oluşturmuş olduğu biyofilm tabakanı elektron mikroskobu altında görüntüsü.....	12
Resim 4: Oksasiline ve sefoksitine duyarlı KNS izolatu.....	40
Resim 5: Oksasiline ve sefoksitine dirençli KNS izolatu.....	40
Resim 6: Sigma Aldrich R2383-1EA 3mm çaplı bakteri replikatörü	42
Resim 7: Mikrodilüsyon plağından bakterilerin alınması	42
Resim 8: Antibiyotikli agarlara bakterilerin ekilmesi	42
Resim 9: Agar dilüsyon yöntemi ile MİK değerlerinin belirlenmesi.....	43
Resim 10: <i>mecA</i> PCR sonuçları.....	46
Resim 11: On iki numaralı örneğin disk difüzyon testi sonucu.....	48
Resim 12: Seksen dört numaralı örneğin disk difüzyon testi sonucu	48

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Stafilokoklar nozokomiyal infeksiyon etkenleri arasında gün geçtikçe önemi artan mikroorganizmalardır. Bakteriyemi düşünülen hastalardan alınan kan kültürlerinde stafilokoklar sık izole edilmekte ve özellikle koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) zamanla *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) kadar önemli bir mortalite ve morbidite nedeni olarak karşımıza çıkmaktadır. KNS'ler; hem deri flora üyesi oldukları, hem de başta kateter infeksiyonları ve bakteriyemiler olmak üzere birçok infeksiyondan giderek daha sıklıkla sorumlu tutulduklarından infeksiyon-kolonizasyon ayırımı yapmada ve direnç paternlerini değerlendirmede klinisyenleri zor durumda bırakmaktadır. Metisiline dirençli KNS'lerin (MR-KNS) beta-laktam antibiyotiklerin yanı sıra diğer antibiyotiklere de dirençli olması nedeniyle; direnç özelliklerinin hızlı ve güvenilir olarak en kısa sürede tanımlanması, uygun antibiyoterapiye başlanması açısından önemlidir. Oysa metisilin direnci arama yöntemi olarak hastanelerde yaygın kullanılan disk difüzyon yöntemlerinin bu bakterilerin metisiline dirençliliğini göstermedeki duyarlılığı % 100 değildir.

Metisilin direnci, kromozomal *mecA* geni tarafından kodlanan bir dirençtir. Bu geni taşıyan izolatlar yeni bir penisilin bağlayıcı protein (PBP) yapımı nedeniyle (PBP2a) tüm beta-laktam antibiyotiklere dirençlidir. Ancak, metisilin direncinin ekspresyonu, çevre koşullarından kolay etkilenir ve her zaman rutin testlerle saptanamaz. Bunun sonucunda; metisilin dirençli bir bakteri duyarlı olarak tanımlanabilmektedir. Bu nedenle son yıllarda metisilin direncini göstermede çevre koşullarından ve heterojen metisilin direncinden daha az etkilenen sefoksitin disk difüzyon testi giderek daha fazla kullanılan bir yöntem olmuştur. Bu çalışmada; gün geçtikçe daha fazla mortalite ve morbidite etkeni olan KNS'lerin metisilin direncinin daha güvenilir bir şekilde saptanıp, izolatların metisilin duyarlılıklarının mümkün olan en kısa sürede belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu bilgiler ışığında, bu çalışmada KNS'lerde metisilin direncini Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü – CLSI (The Clinical and Laboratory Standards Institute – eski ismi; The National Committee for Clinical Laboratory Standarts - NCCLS) önerileri doğrultusunda; a) oksasilin disk difüzyon yöntemi ile, b) sefoksitin disk difüzyon yöntemi ile, c) oksasilin için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin saptanması ile ve d) metisilin direncini belirlemede altın standart olarak kabul edilen *mecA* geninin saptanması ile gösterilmesi amaçlanmıştır.

Sonuç olarak bu dört yöntem birbirleri ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

KNS'ler başta *Staphylococcus epidermidis* (*S.epidermidis*) olmak üzere grup olarak insan normal florasının önemli bir bölümünü oluşturmaktadır [1]. Hastane ortamında sıklıkla bulunan bu mikroorganizmalar ayrıca nozokomiyal infeksiyonlarda sıklıkla izole edilen bakteri grubudur [2, 3]. Yıllar boyu ürettiği kültür ortamlarında sıklıkla deri kontaminantı olarak değerlendirilseler de 80'li yılların ortasından itibaren klinik önemleri anlaşılmaya başlanmıştır [4]. Tablo 1'de insan normal deri ve mukoza florasını oluşturan bakteriler görülmektedir [5].

Tablo 1: İnsan deri ve mukozalarının normal florasını oluşturan bakteriler [5]

BAKTERİ	Deri	Konjunktiva	Burun	Ağız	Anterior üretra	Vajina
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ve diğer KNS'ler *	++	+	++	++	++	++
<i>Staphylococcus aureus</i> *	+	+/-	+	+	+/-	+
<i>Streptococcus mitis</i>				++	+	+
<i>Streptococcus salivarius</i>				++		
<i>Streptococcus mutans</i> *				++		
<i>Enterococcus faecalis</i> *				+	+	+
<i>Streptococcus pneumoniae</i> *		+/-	+/-	+		+/-
<i>Streptococcus pyogenes</i> *	+/-	+/-		+		+/-
<i>Neisseria sp.</i>		+	+	+	+	+
<i>Neisseria meningitidis</i> *			+	+		+
<i>Veillonellae sp.</i>				+		
<i>Escherichia coli</i>		+/-	+/-	+	+	+
<i>Proteus sp.</i>		+/-	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> *				+/-	+/-	
<i>Haemophilus influenzae</i> *		+/-	+	+		
<i>Bacteroides sp.</i> *					+	+/-
<i>Lactobacillus sp.</i>				++		++
<i>Clostridium sp.</i> *				+/-		
<i>Corynebacteria</i>	++	+	++	+	+	+
<i>Mycobacteria</i>	+		+/-		+	
<i>Actinomyces</i>				+		
<i>Spirochetes</i>				++		
<i>Mycoplasma</i>				+	+/-	+

* Potansiyel patojenler

2.1 Tarihçe ve Sınıflama

Stafilokoklar ilk kez 1878 yılında Robert Koch tarafından ışık mikroskobu altında görülmüş ve 1880’de Louis Pasteur tarafından sıvı besiyerinde üretebilmiştir. 1881’de Sir Alexander Ogston stafilokokların fareler ve kobaylar için patojen olduğunu gösterirken bu mikroorganizmaları; üremeleri sırasında birbirlerinden ayrılmayıp, üzüm salkımına benzeyen düzensiz kümeler oluşturmalarına dayanarak “*Staphylococcus*” (“Staphyle”: üzüm salkımı) olarak adlandırmıştır. Rosenbach 1884’de insan hastalık örneklerinden ilk kez stafilokokları izole etmiş ve kültür ortamlarında kolonilerin oluşturduğu renklere göre stafilokokları iki gruba ayırmıştır: *Staphylococcus aureus* (aureus: sarı) ve *Staphylococcus albus* (albus: beyaz) [6]. 1960’ların başından itibaren başta yara yeri olmak üzere birçok infeksiyon odağından saf kültür olarak elde edilen *Staphylococcus albus*’un infeksiyon etkeni olabileceği düşünülse de, bu durumun akademik çevrede kabul görmesi 1980’leri bulmuştur. 1970’lerde *S.albus* olarak adlandırılan bakteri grubunun aslında birden fazla alt türü içerdiği bulunmuş ve 1970’lerden itibaren *S.epidermidis* dışındaki diğer KNS türleri de tanınmaya başlanmıştır [7].

Stafilokoklar; Bergey’in 1986’da yaptığı sistematik bakteriyoloji sınıflamasına göre *Micrococcaceae* ailesi içerisinde *Micrococcus*, *Planococcus*, *Stomatococcus* genuslarıyla beraber bulunurlar. DNA dizi analizi, DNA-rRNA hibridizasyonu ve 16 S rRNA analizleri sonucunda *Staphylococcus* genusunun *Micrococcus*’lardan çok yeni tanımlanan *Macrococcus* genusuna daha yakın olduğu bildirilmektedir. Bununla birlikte genotipik olarak *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus* kümesinde yer aldığı belirlenmiştir [8].

Staphylococcus genusu içinde bugüne kadar 60’ın üzerinde tür tanımlanmış olup bunlardan 32 tanesi klinik insan örneklerinde saptanmıştır [8, 9] (Tablo2). Stafilokoklar arasında en patojen tür *S.aureus* olup, diğer stafilokok türlerinden koagülaz üretme özelliği ile ayrılmaktadır [8]. *S.aureus* dışındaki tüm stafilokok türleri genel olarak KNS olarak anılmakta ve giderek yaygınlaşan sıklıklarda klinik örneklerden izole edilmektedir. KNS’ler içerisinde klinik örneklerden en sık izole edilen tür bir deri flora üyesi olan *S.epidermidis*’tir. Bunu genç kadınlarda idrar yolu infeksiyonlarından izole edilebilen *Staphylococcus saprophyticus* izler. Daha nadir olarak *S.haemolyticus*, *S.hominis*, *S.warnerii*, *S.saccharolyticus*, *S.cohnii*, *S.simulans*, *S.capitis*, *S.sciuri*, *S.lugdunensis*, *S.caprae* de fırsatçı infeksiyonlar oluşturabilmektedir [9].

KNS türleri, genellikle hastane infeksiyonu etkeni olarak; deri – yumuşak doku, kan dolaşımı infeksiyonları (KDİ) ve vücuda uygulanan yabancı cisim – biyomedikal cihaz taşıyan kişilerde oluşan infeksiyonlarda karşımıza çıkmaktadır. Hastalığın seyrinin genel ve lokal bağışıklık yanıtının kısıtlı olduğu hastalarda daha kötü seyrettiği ve mortalitesinin de yüksek olduğu bilinmektedir [3].

Tablo 2: Bugüne kadar tanımlanmış stafilocok tür ve alt türleri [8, 10]

Tür	Alt tür	Durum	Referans
<i>S.arlettae</i> §		Yeni tür	Schleifer et al. 1985
<i>S.aureus</i>	<i>anaerobius</i>	Yeni alt tür	De La Fuente et al. 1985
<i>S.aureus</i> *	<i>aureus</i>	Kabul edilmiş tür	Rosenbach 1884
<i>S.auricularis</i> *		Yeni tür	Kloos and Schleifer 1983
<i>S.capitis</i> *	<i>capitis</i>	Kabul edilmiş tür	Kloos and Schleifer 1975
<i>S.capitis</i> *	<i>ureolyticus</i>	Yeni tür	Bannerman and Kloos 1991
<i>S.caprae</i> *		Yeni tür	Devriese et al. 1983
<i>S.carnosus</i> §	<i>carnosus</i>	Yeni tür	Schleifer and Fischer 1982
<i>S.carnosus</i> §	<i>utilis</i>	Yeni alt tür	Probst et al. 1998
<i>S.caseolyticus</i> §		Eski isim	Schleifer et al. 1982
<i>S.chromogenes</i> §		Yeni kombinasyon	(Devriese et al. 1978) Hajek et al. 1987
<i>S.cohnii</i> *	<i>cohnii</i>	Kabul edilmiş tür	Schleifer and Kloos 1975
<i>S.cohnii</i> *	<i>urealyticum</i>	Yeni alt tür	Kloos and Wolfshohl 1991
<i>S.condimenti</i>		Yeni tür	Probst et al. 1998
<i>S.delphini</i> §		Yeni tür	Varaldo et al. 1988
<i>S.epidermidis</i> *		Kabul edilmiş tür	(Winslow and Winslow 1908) Evans 1916
<i>S.equorum</i> §	<i>equorum</i>	Yeni tür	Schleifer et al. 1985
<i>S.equorum</i> §	<i>linens</i>	Yeni alttür	Place et al. 2003
<i>S.felis</i> §		Yeni tür	Igimi et al. 1989
<i>S.fleurettii</i>		Yeni tür	Vernozy-Rozand et al. 2000
<i>S.gallinarum</i> §		Yeni tür	Devriese et al. 1983
<i>S.haemolyticus</i> *		Kabul edilmiş tür	Schleifer and Kloos 1975
<i>S.hominis</i> *	<i>hominis</i>	Kabul edilmiş tür	Kloos and Schleifer 1975
<i>S.hominis</i> *	<i>novobiosepticus</i>	Yeni alt tür	Düzeltilme: Kloos et al. 1998
<i>S.hyicus</i> §		Kabul edilmiş tür	(Sompolinski 1953) Devriese et al. 1978
<i>S.hyicus</i>	<i>chromogenes</i>	Eski isim	Devriese et al. 1978
<i>S.intermedius</i>		Kabul edilmiş tür	Hajek 1976
<i>S.kloosii</i> §		Yeni tür	Schleifer et al. 1985
<i>S.lentus</i> §		Yeni kombinasyon	(Kloos et al. 1967) Schleifer et al. 1983
<i>S.lugdunensis</i> *		Yeni tür	Freney et al. 1988
<i>S.lutrae</i>		Yeni tür	Foster et al. 1997
<i>S.muscae</i> §		Yeni tür	Hájek et al. 1992
<i>S.nepalensis</i>		Yeni tür	Spergser et al. 2003
<i>S.pasteuri</i> *		Yeni tür	Chesneau et al. 1993
<i>S.piscifermentans</i> §		Yeni tür	Tanasupawat et al. 1992
<i>S.pulvereri</i> *		Yeni tür	Zakrzewska-Czerwinska et al. 1995
<i>S.saccharolyticus</i> *		Yeni kombinasyon	(Foubert and Douglas 1948) Kilpper-Bälz and Schleifer 1984

Tablo 2'nin devamı

Tür	Alttür	Durum	Referans
<i>S.saprophyticus</i>	<i>bovis</i>	Yeni alt tür	Hájek et al. 1996
<i>S.saprophyticus</i> *	<i>saprophyticus</i>	Kabul edilmiş tür	(Fairbrother 1940) Shaw et al. 1951
<i>S.schleiferi</i> *	<i>coagulans</i>	Yeni alt tür	Igimi et al. 1990
<i>S.schleiferi</i>	<i>schleiferi</i>	Yeni tür	Freney et al. 1988
<i>S.sciuri</i>	<i>carnaticus</i>	Yeni alt tür	Kloos et al. 1997
<i>S.sciuri</i> §	<i>lentus</i>	Eski isim	Kloos et al. 1976
<i>S.sciuri</i> §	<i>rodentium</i>	Yeni alt tür	Kloos et al. 1997
<i>S.sciuri</i> §	<i>sciuri</i>	Kabul edilmiş tür	Kloos et al. 1976 Düzeltilme: Kloos et al. 1997
<i>S.simulans</i> *		Kabul edilmiş tür	Kloos and Schleifer 1975
<i>S.succinus</i>	<i>casei</i>	Yeni alt tür	Place et al. 2003
<i>S.succinus</i>	<i>succinus</i>	Yeni alt tür	Lambert et al. 1998
<i>S.vitulinus</i> §		Yeni tür, Düzeltilmiş isim	Webster et al. 1994 Düzeltilme: Svec et al. 2004
<i>S.warneri</i> *		Kabul edilmiş tür	Kloos and Schleifer 1975
<i>S.xylosus</i> *		Kabul edilmiş tür	Schleifer and Kloos 1975

* İnsanlarda ve insan dışı primatlarda bulunan stafilocoklar

¥ Diğer hayvanlarda bulunan stafilocoklar

§ Daha çok doğa ve toprakta bulunan stafilocoklar

2.2. KNS'lerin Laboratuvar Tanısı

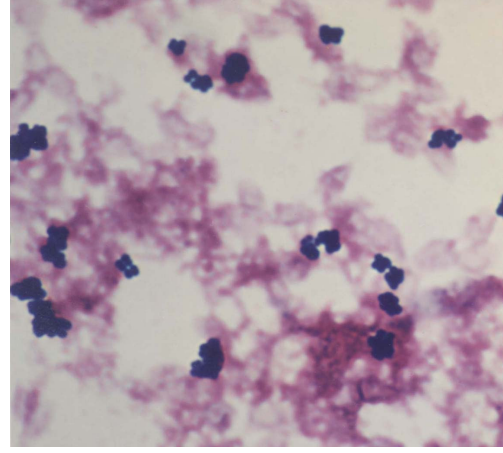
2.2.1. Morfolojik Özellikleri

Stafilocoklar; 0.5 – 1.5 µm çapında, hareketsiz, spor oluşturmayan, fakültatif anaerop, katalaz oluşturan Gram pozitif boyanan koklardır. Genellikle 24 saatlik inkübasyonda 1 – 2 mm çaplı düz, hafif konveks koloniler oluşturlar. Sarı/sarı- turuncu pigmentli *S.aureus* kolonilerinin aksine, KNS türleri beyaz – gri renkte koloniler oluşturlar (Resim 1). Ancak KNS kolonilerinin incelenmesinde en iyi yöntem ekim yapılan plakların 35 – 37°C'de 48 – 72 saat tutulduktan sonra inkübasyona iki gün daha oda ısısında devam edilmesidir. Değişik kolonilerin % 90'dan fazlası 72 saatten sonra ve oda ısısında devam edilen inkübasyonlarda belirir [1, 8].

Bazı *S.aureus* ve KNS suşlarında puslu veya farklı beta-hemoliz zonları bulunur ve inkübasyon süresi uzatılırsa beta-hemoliz belirginleşir. Anaerop özellik gösteren *S.saccharolyticus* ve *S.aureus subsp anaerobicus* dışındaki tüm stafilocok türleri fakültatif anaeroptur. DNA'larındaki G + C içeriği % 30 – 39 moldür [1, 8].



Resim 1: % 5 Koyun kanlı agarda *S.epidermidis*'in görünümü



Resim 2: Klinik örnekte Gram boyama ile *S.epidermidis*'in görünümü (x40 büyütme)

2.2.2. Direkt Gram Boyama

KNS'ler; klinik örneklerden yapılan direkt Gram boyamada 0.5–1.5 µm çaplı Gram pozitif kok olarak görünürler. Tek tek, çiftler, kısa zincirler ya da kümeler halinde üzüm salkımı şeklinde görünebilirler [1, 8].

2.2.3. Katalaz Testi

Tüm *Micrococcaceae* ailesi üyelerinde sitokrom oksidaz enzimi bulunur. Bu enzimi üreten bakteriler hidrojen peroksiti (H_2O_2) su ve oksijene ayrıştırır. Bu test için içerisinde kan bulunmayan bir besiyerinde üretilmiş stafilokok kolonileri kullanılmalıdır. Aksi taktirde kırmızı kan hücrelerinin içinde bulunan enzimler zayıf pozitif katalaz reaksiyonuna neden olabilir. Birkaç stafilokok kolonisinin cam lam üzerindeki bir damla % 3'lük hidrojen peroksitte süspanse edilmesi durumunda oluşacak hava kabarcıkları, hidrojen peroksitin su ve oksijene ayrıştığının göstergesidir. Bu test *Micrococcaceae* ailesinin; katalaz testi negatif olan diğer Gram pozitif koklardan, özellikle streptokok ve enterokoklardan ayrılmasını sağlar [1, 8].

2.2.4. *Micrococcus* Türlerinin *Staphylococcus* Türlerinden Ayrılması

Gram ve katalaz pozitif olma özellikleriyle birbirlerine benzeyen *Staphylococcus* ve *Micrococcus* türleri birbirlerinden başlıca dört özellikleriyle ayrılır:

- Staphylococcus* türleri basitrasine dirençli iken *Micrococcus* türleri duyarlıdır.

- b) 100 µg Furazolidone ile yapılan disk difüzyon testinde *Staphylococcus* türleri furazolidone'a duyarlı iken *Micrococcus* türleri dirençlidir.
- c) *Staphylococcus* türleri lizostafin'e duyarlı iken *Micrococcus* türleri dirençlidir.
- d) *S.lentus*, *S.sciuri* ve *S.vitulinus* dışındaki *Staphylococcus* türleri oksidaz negatif iken *Micrococcus* türleri oksidaz pozitifdir [1, 8].

Stafilokokların, Mikrokoklar ve Makrokoklardan ayrılmasını sağlayan yöntemler Tablo 3'te özetlenmiştir.

Tablo 3: *Staphylococcus*, *Micrococcus* ve *Macroccoccus* türlerinin fenotipik özellikleri [1, 8]

Karakteristik özellik	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Micrococcus spp.</i>	<i>Macroccoccus spp.</i>
Koloni büyüklüğü	0.6 – 1.5 µm	1 – 1.8 µm	1.3 – 2.5 µm
Lizostafin duyarlılığı	duyarlı	dirençli	duyarlı
Furazolidone (100 µg) duyarlılığı	duyarlı	dirençli	duyarlı
Basitrasin (0.04 U) duyarlılığı	dirençli	duyarlı	dirençli
Modifiye oksidaz testi	- (*)	+	+
Anaerobik ortamda glukozdan asit oluşturma	+	-	-

* : Oksidaz pozitif olan *S.lentus*, *S.sciuri* ve *S.vitulinus* dışındaki *Staphylococcus* türleri oksidaz negatiftir

2.2.5. KNS'leri *S.aureus*'tan Ayıran Yöntemler

Bazı stafilokok türlerinde bulunan koagülaz proteinleri, bakterilerin bir fibrin veya fibrinojen kılıfı ile kaplanarak fagositozdan korunmasını sağlar. Bu özelliği saptamak için yapılan koagülaz testi stafilokok türlerini birbirinden ayırmada en önemli testtir. Koagülaz testi pozitif olan en önemli patojen *S.aureus*'tur. Bu nedenle bu özellik bu türün tanımı ile özdeşleşmiştir. *S.aureus* dışında koagülaz testi pozitif olan türler *S.intermedius*, *S.hyicus*, *S.lugdunensis*, *S.schleiferi* olarak sayılabilir. Ancak bu dört tür çok nadir olarak klinik örneklerden soyutlanır ve koagülaz pozitif olmalarına karşın gerek yerleşimleri, gerek mikrobiyolojik özellikleri gerekse oluşturdıkları infeksiyonlar açısından daha çok koagülaz negatif stafilokoklar içerisinde incelenirler [1, 8].

Bağlı ve serbest formda olmak üzere iki farklı koagülaz vardır. Serbest koagülaz; protein yapıda olup plazmadaki koagülaz ile birleşen faktörü (coagulase reacting factor –

CRF) aktive etmektedir. Bağlı koagülaz (clumping factor) ise bakterinin bir yüzey proteini olup hücre dışına salgılanmaz. Bu yapı plazmadaki fibrinojene doğrudan bağlanır. Serbest koagülazı göstermek için tüp koagülaz testi, bağlı koagülazı göstermek için ise lam koagülaz testi uygulanmaktadır. *S.aureus* dışı koagülaz pozitif stafilocokların koagülaz özellikleri Tablo 4’te izlenmektedir [8].

Tablo 4. *S.aureus* dışı koagülaz pozitif stafilocokların tüp ve lam koagülaz özellikleri

<i>Koagülaz</i>	<i>S.intermedius</i>	<i>S.hyticus</i>	<i>S.lugdunensis</i>	<i>S.schleiferi</i> subsp. coagulans	<i>S.schleiferi</i> subsp. schleiferi
Tüp koagülaz testi	+	+	-	+	-
Lam koagülaz testi	+/-	-	+	-	+

2.2.5.1 Lam Koagülaz Testi

Lam üzerine bir damla steril distile su damlatılır. Besiyerinde üremiş bulunan birkaç adet stafilocok kolonisi bu distile suda karıştırılarak homojen süspansiyon elde edilir. Üzerine bir damla tavşan plazması damlatılır ve elde çevrilerek karıştırılır. On saniye içinde bakterilerin birbirine yapışmasından kaynaklanan gözle görülen kümeleşmenin olması testin pozitif olduğunu gösterir. Eğer lam koagülaz testi negatif ise tüp koagülaz testi yapılmalıdır. Çünkü bağlı koagülaza sahip olmayan suşlar genellikle serbest koagülaz üretirler [1, 8].

2.2.5.2 Tüp Koagülaz Testi

Hücre dışına salınan koagülazı gösterir. Serum fizyolojik ile 1/5 oranında sulandırılmış tavşan plazması içinde stafilocok kolonisi ezilip karıştırılır. Saat başı kontrol edilerek 35°C’de dört saat pıhtının oluşması için bekletilir. Pıhtının oluşması pozitif sonuç olarak değerlendirilir. Negatif olan testler oda sıcaklığında 18 – 24 saat bekletilmelidir. Çünkü bazı suşlar uzun inkübasyonlarda fibrinolizin üretebilirler. Bu da çözülmeye neden olur. Tüplerin oda sıcaklığında bekletilmesi bu etkinin ortadan kalkmasını sağlar [1, 8].

Ancak günümüzde bu koagülaz testilerine bir alternatif olarak *S.aureus* hücre duvar proteini olan Protein A’nın gösterilmesine yönelik testler kullanabilmektedir. Protein A

Staphylococcus genusu içerisinde sadece *S.aureus*'ta bulunan, IgG'nin Fc kolu için özgül afiniteye sahip olan bir proteindir. Plazma ile kaplanmış lateks partiküllerin *S.aureus* ile karşılaştırılması sonucu plazmadaki IgG'lere afinite gösteren Protein A, partiküllerin kümeleşmesini sağlar. Kümeleşme sağlanması bakterinin *S.aureus* olduğunu gösterir [1, 8].

2.2.5.3 Mannitol Hidrolizi

Genellikle koagülaz oluşturan stafilokoklar mannitolü de fermente ederler. Mannitollü tuzlu agar besiyerinde üretilen *S.aureus* mannitolü fermente ederek, besiyerinin içerdiği fenol kırmızısı ayırıcının rengini sarıya çevirir ve kolonilerinin etrafında 48 saatte sarı zon oluşur. *S.epidermidis* kolonilerinin etrafında ise kırmızı zon oluştuğu gözlenir. [8].

2.2.6 KNS Türlerinin Kendi Aralarında Ayrımı

KNS'ler kendi aralarında öncelikle novobiyosine duyarlılıklarına göre ikiye ayrılırlar. Novobiyosine duyarlı grup genel olarak *S.epidermidis* grubu, novobiyosine dirençli olan grup ise *S.saprophyticus* grubu olarak adlandırılırlar [1, 8]. Tablo 5'te KNS'lerin novobiyosine duyarlılıklarına göre sınıflandırılması görülmektedir.

Tablo 5: KNS türlerinin novobiyosine duyarlılığına göre ayrımı

Novobiyosine duyarlı		Novobiyosine dirençli
<i>S.epidermidis</i>	<i>S.capitis</i>	<i>S.saprophyticus subsp. saprophyticus</i>
<i>S.haemolyticus</i>	<i>S.hominis</i>	<i>S.xylosus</i>
<i>S.lugdunensis</i>	<i>S.caprae</i>	<i>S.cohnii</i>
<i>S.auricularis</i>	<i>S.simulans</i>	<i>S.sciuri</i>
<i>S.saccharolyticus</i>	<i>S.warneri</i>	
<i>S.schleiferi subsp schleiferi</i>	<i>S.pasteuri</i>	

Novobiyosin duyarlılığı dışında laboratuvarlarda KNS'lerde tür tanımlanması emek yoğun, zaman alıcı ve maliyet/etkin olmayan bir yöntemdir. Bu nedenle rutin laboratuvarlarda genellikle yapılmaz. Ancak tedavi başarısızlığı veya bir salgın söz konusu olduğunda tür tanımlaması yapılması gerekir. Bunun için ilk önce baskın koloni tipinin doğru belirlenmesi gerekmektedir. Eğer 24 saatlik kültür ele alınacak olursa tüm KNS'lerin koloni morfolojileri birbirlerine benzeyeceğinden yanlışlıklara neden olabilir. KNS'lerin,

48 – 72 saat, 35 – 37°C’de inkübasyonunu takiben iki gün de oda ısısında tutulması bakterilerin morfolojik özelliklerinin ortaya çıkmasını sağlayacaktır. Bu sayede baskın olan koloni tipi seçilmiş olur. *S.epidermidis* kolonileri 2.5 – 6 mm çapında olup genelde pigmentsizdir (Resim 1). *S.haemolyticus* ve *S.hominis* kolonileri ise daha büyük olup 5 – 9 mm çapında, düzgün kenarlı, opak, pigmentsiz olabileceği gibi krem veya sarı renkte koloniler oluşturabilir. *S.lugdunensis* 4–7 mm çapında parlak, beyaz – krem ya da sarı renkli, düzgün, ortası konveks koloniler yaparlar. *S.warneri* kolonileri ise *S.lugdunensis* kolonilerine benzer koloni morfolojisine sahiptir. *S.saprophyticus* ise 5 – 8 mm çapında, bazen opak olarak gözlenen düzgün parlak konveks koloniler oluşturur [1, 8].

Bundan sonraki işlem bazı biyokimyasal testler ile tür belirlenmesi yapılmasıdır. Termonükleaz, fosfataz, pirolidonil arilamidaz, ornitin dekarboksilaz, üreaz, β-galaktosidaz aktiviteleri, polimiksin direnci, asetoin oluşumu ve karbonhidratlardan asit oluşumu gibi ileri biyokimyasal testler ile tür ayrımı yapmak olasıdır [1, 8]. Sık gözlenen KNS türlerinin biyokimyasal özellikleri Tablo 6’da özetlenmiştir.

Tablo 6: Sık izole edilen KNS türlerinin biyokimyasal özellikleri [1, 8]

Tür ve alt tür	Koloni pignemti	Koagülaz	Clumping factor	Termostabil nükleaz	Alkalen fosfataz	Pirolidonil arilamidaz	Ornitin dekarboksilaz	Üreaz	Galaktosidaz	Asetoin oluşumu	Novobiyosine direnç	Polimiksin B direnci	Aerobik şartlarda asit oluşumu					
													D-trehaloz	D-mannitol	D-mannoz	D-turanoz	Maltoz	Sükroz
<i>S.epidermidis</i>	-	-	-	-	+	-	(d)	+	-	+	-	+	-	-	(+)	(d)	+	+
<i>S.haemolyticus</i>	d	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	d	-	(d)	-	+
<i>S.hyicus</i>	-	d	-	+	+	-	-	d	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+
<i>S.intermedius</i>	-	+	d	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	(d)	+	d	+/-	+
<i>S.lugdunensis</i>	d	-	(+)	-	-	+	+	d	-	+	-	d	+	-	+	(d)	-	+
<i>S.saprophyticus</i> <i>subsp. saprophyticus</i>	d	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	d	-	+	+	+
<i>S.schleiferi subsp</i> <i>schleiferi</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	(+)	+	-	-	d	-	+	-	-	-
<i>S.warneri</i>	d	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	d	-	(d)	(+)	+

+: ≥% 90 olumlu –: ≥% 90 olumsuz () : Gecikme reaksiyonu d: Değişken; % 11-89 arası olumlu

Günümüzde tür tanımlamak için geliştirilmiş hızlı ticari yöntemler mevcuttur. Bunlardan en yaygın kullanılanlarının başında ülkemizde de bulunan API Staph, Vitek GPI (Biomerieux, Fransa) yer almaktadır. Bunların dışında; Microscan Pos ID (Dade Microscan, ABD), Cyrstal Gram pozitif identifikasyon sistemi, Spector Staphylococcus MIC/ID paneli, Spector Gram Positive Breakpoint ID/Panel (Becton Dickinson) sayılabilir. Ayrıca stafilokok türleri hücresel yağ analizi ile hızlı gaz kromatografisini birleştiren veya ribotip patern analizi yapan otomatize sistemlerle de tanınabilmektedir [11].

2.3. KNS'lerin Etken Olduğu İnfeksiyonlarda Patogenez

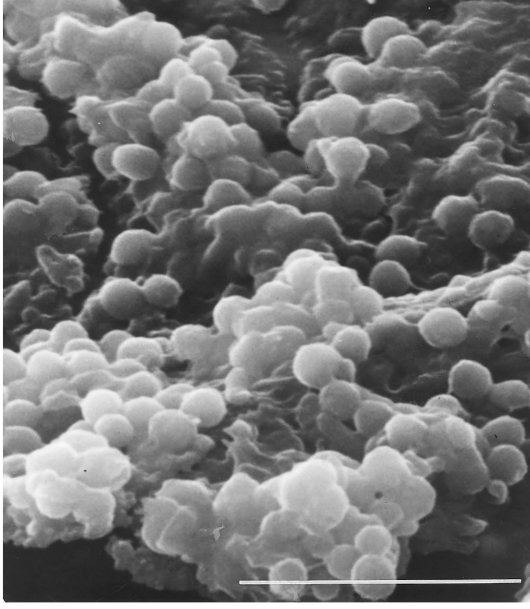
KNS'lere bağlı gelişen infeksiyonların seyri çoğu zaman *S.aureus*'tan farklıdır. Genel klinik tablo özgül değildir ve sinsi gelişir. İnfeksiyonun fulminan belirtileri pek gözlenmez ve durum subakut hatta kronik bir şekilde ilerler. KNS'lere bağlı gelişen bakteriyemi eğer zamanında ve yeterli tedavi edilirse nadiren hayatı tehdit eder. Ancak bağışıklık sistemi baskılanmış ve nötropenik hastalarda daha ciddi klinik durumlara neden olabilirler [12]. Bunun dışında patojenik potansiyeli *S.aureus*'a benzeyen ve diğer KNS'lere oranla daha virulan olan *S.lugdunensis*'in etken olduğu klinik durumlarında da tedavi güçlükleri gözlenebilir [13].

2.3.1. *S.epidermidis*'in Biyofilm Oluşturma Mekanizması

S.epidermidis özellikle yabancı cisimler-polimer yüzeyler üzerinde rahat kolonize olması ve kalın çok tabakalı biyofilm (slime factor) oluşturması ile ünlüdür. Derinin normal florasında bulunan bu bakterinin çok az miktarlarının bile polimer yapıdaki herhangi bir implanta ameliyat sırasında kontamine olması, ileride bu implantın enfekte olması için yeterlidir. Çoğu zaman bu bakteri hastanın kendi florasından değil, cerrahi ya da klinik ekibin elinden bu bölgeye kontamine olup yerleşmektedir. Bu klinik soruna ışık tutan birçok rehber yayınlanmış bulunmaktadır [14, 15].

Biyofilm oluşumu iki basamaklıdır. Öncelikle bakteri polimer materyale hızlıca bağlanır. Sonraki aşamaya ise *yığılma fazı* (accumulation phase) denir. Bakteri polimer yüzeye doğru çok tabakalı bir biçimde proliferer olur ve materyalin uzandığı derinliğe kadar yayılır. Biyofilmler günümüzde elektron mikroskopları yardımıyla net bir biçimde

gözlenebilmektedir (Resim 3). Son yıllarda *S.epidermidis*'in biyofilm oluşturma mekanizmasının anlaşılması moleküler yöntemlerin gelişmesi ile hız kazanmıştır.



Resim 3: *S.epidermidis*'in uzun dönem kullanılmış silikon bir kateter üzerinde oluşturmuş olduğu biyofilm tabakasının elektron mikroskobu altında görüntüsü [16]. (* Resimdeki barın uzunluğu 5µm'dir)

Biyomateriyallere mikrobiyal tutunma daha çok bakterinin hücre duvarı ve polimer materyalin özelliklerine bağlıdır. İlk tutunmada *van der Waal's güçleri*, hidrofobik etkileşimler ve kutuplaşma gibi özgül olmayan fiziko-kimyasal güçler ön plandadır.

Bu tutunmadan sonra bakteriyel yüzey ilişkili proteinler devreye girmektedir. *S.epidermidis* için stafilokokal yüzey proteinleri (Staphylococcal surface protein) SSP-1 (280 kDa) ve SSP-2 (250 kDa) tanımlanmıştır [17]. Ancak bu proteinleri kodlayan genler henüz gösterilebilmiş değildir.

Biyofilm ilişkili proteinin (Biofilm associated protein) “Bap”; *S.aureus*'ta biyofilm oluşumunda görev aldığı gösterilmiştir [18]. Buna çok benzeyen Bap homolog proteinini “Bhp” ise *S.epidermidis* için aynı görevi görecektir olan eşdeğeri olarak gösterilmektedir. Moleküler ağırlığının 258 kDa olduğu tahmin edilmektedir [19].

Proteinlerin dışında bir polisakkarit olan kapsüler polisakkarit/adezinin (PS/A), biyofilm yapımı ve ilk tutunma ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Yapılan tavşan endokarditi modelinde PS/A eksik mutantların daha az virulan olduğu ve bunun ötesinde PS/A'ya karşı yapılan aşılamanın enfeksiyondan koruduğu gözlenmiştir [20].

Hastaya damar içi kateter takılır takılmaz polimer materyalin dış yüzeyi plazmanın yanı sıra hücre dışı matriks proteinleri olan fibronektin, fibrinojen, vibronektin, trombospondin ve *von Willebrand faktör* ile kaplanır. Bundan sonra hem bu proteinler hem de polimer yüzey bakteri tutunmasına ve kolonizasyonuna zemin hazırlar. Özellikle *S.aureus*'un bu konak faktörlerine karşı özgül reseptörlere sahip olduğu bilinmektedir. *S.epidermidis*'in de bu tür yüzey proteinlerini sentezleyebildiği ve protein kaplı implantlara kolayca tutunup biyofilm tabaka oluşumunu başlatabildiği düşünülmektedir. *S.aureus*'un tüm suşları fibrinojene bağlanma konusunda oldukça başarılıdır. Ancak *S.epidermidis*'in fibrinojene tutunması suşlar arasında ciddi farklılıklar göstermektedir [21].

S.aureus'ta bulunan fibronektin ve fibrinojen bağlayıcı proteinler gibi birçok konak faktör bağlayıcı proteinlerin, hem klonlanmaları sağlanmış hem de sekans analizleri yapılmıştır. Ancak *S.epidermidis* için çok fazla konak faktör bağlayıcı protein bilinmemektedir. Bir yüzey ilişkili otolizin olan AtlE'nin bakterinin yüzeye tutunmasının yanında hücre dışı matriks proteini olan vitronektin'e de bağlanmada önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Bu bulgu AtlE'nin vibronektin kaplı yabancı materyalin kolonizasyonunda önemli rol oynadığını göstermektedir. Bu anlamda otolizinler virulans faktörü olarak kabul edilmektedir. Bunu destekleyen hayvan modeli çalışmalarda AtlE mutasyonu oluşturulan suşların kateter ilişkili infeksiyonlarda daha az virulan olduğu gösterilmiştir [22].

S.saprophyticus'tan elde edilip sekans analizi yapılmış başka bir gen ise Aas genidir. Aas geni; AtlE'ye önemli derecede homoloji göstermektedir. Aas geninin kodladığı proteinin fibronektine bağlandığı, bunun yanında da koyun eritrositlerini aglütine ettiği gösterilmiştir. Aas ve AtlE arasındaki bu benzerlik yeni bir grup stafilokokal adezin ile otolizin/adezinlerin varlığını düşündürmektedir.

Bunların dışında *S.epidermidis*'in diğer bazı proteinlerinin de konak proteinlerine afinite gösterdiği gösterilmiştir. Fibrinojen bağlayan protein (Fbe) 119 kDa büyüklüğünde, serin - aspartat (SD) tekrarları (Sdr) içeren, hücre duvarına bağımlı yüzey proteinleri ailesi üyesidir [23]. Geni klonlanıp, sekanslanan Fbe'nin eksik olduğu mutant suşların hastalardan çıkarılmış polietilen materyallere tutunma yeteneklerinin azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca Fbe'ye karşı oluşturulmuş antikorların da tutunma reaksiyonunu engellediği gösterilmiştir. Bu bulgu ileride damar içi kateter ya da implante araç ilişkili infeksiyonları önlemek için *immüno-profilaktik yaklaşım* konusunun gündeme geleceğinin göstergesidir.

S.epidermidis'ten izole edilmiş olan diğer yüzey ilişkili proteinler SdrG (Fbe ile % 95 özdeş), SdrF ve SdrH'dir. SdrG ve SdrH'ye karşı oluşmuş antikorlar konvelesan dönemdeki hastalardan izole edilmiş olup bu bulgu, bu protein genlerinin infeksiyon sırasında eksprese edildiğini göstermektedir [24].

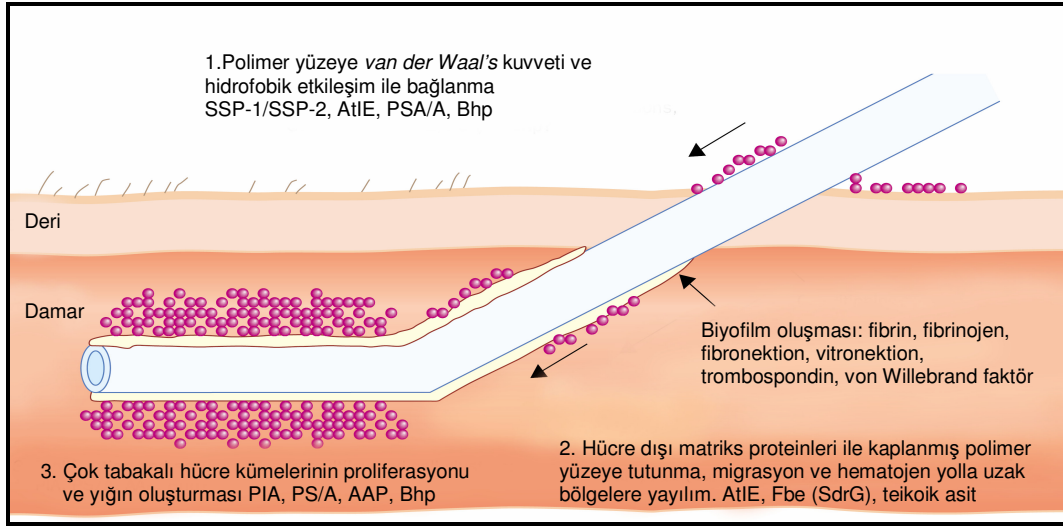
Ayrıca *S.epidermidis*'in hücre yapısında bulunan teikoik asidin de fibronektine bağlanma ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Hem *S.epidermidis*'in hem de fibronektin kaplı yüzeylerin teikoik asit ile pre-inkübasyonunun, *S.epidermidis*'in fibronektine bağlanmasını desteklediği gözlenmiştir. Bu bulgu teikoik asidin fibronektin kaplı polimer ile bakteri arasında bir köprü molekülü olabileceğini göstermektedir [25].

S.epidermidis yabancı cisim yüzeyine yapıştıktan sonra burada çoğalarak çoklu tabakalı hücre yığınları oluşturmaya başlar. Tn917 mutantların yığın oluşturmadağı ve bu mutantlarda *S.epidermidis* polisakkarit hücre içi adezin'in (PIA) eksik olduğu gösterilmiştir [26]. Bu bulgu PIA'nın yığılma fazında önemli bir rolü olduğu göstermektedir. PIA sentezini gerçekleştiren gen ailesi olan *icaABCD*; klonlanıp, sentezlenmiş olup yapılan araştırmalar sonucunda *icaABCD*'nin PIA sentezi dışında hemaglutinasyona da yardımcı olduğu gösterilmiştir [27]. Kimyasal olarak PIA ile ilişkili olduğu bilinen PS/A üretiminin de *ica* gen kümesi (*ica* gene cluster) tarafından sağlandığı bilinmektedir [28].

Biyofilm oluşturma ve yığılmanın bir belirteci de slime-ilişkili antijendir (Slime associated antigen: SAA). Daha önceden tanımlandığında bir N-asetilglukozamin olduğu belirtilen SAA'nın günümüzde purifikasyon tekniklerinin gelişmesi ile aslında bir PIA olduğu kabul görmektedir [29].

S.epidermidis'in biyofilm oluşturmada bir başka hücre dışı protein olan 140 kDa büyüklüğündeki yığılma ilişkili proteinin (Accumulation associated protein: AAP) *S.epidermidis*'in biyofilm tabakası oluşumunda yığılma fazında etkili olduğu belirtilmektedir [30].

S.epidepmidis'in biyofilm oluşturma mekanizması için şematik model Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1: *S.epidermidis*'in biyofilm oluşturma mekanizması için şematik model [31]

2.3.2. *S.epidermidis*'in Diğer Virulans Faktörleri

Günümüzde, klinik önemi nedeniyle akademik ilginin üzerinde yoğun olduğu *S.aureus*'un virulans faktörleri çok iyi tanımlanmıştır. Klinik önemi giderek artan bir mikroorganizma grubu olan KNS'lerin virulans faktörleri ise yeni yeni ortaya konulmaktadır.

S.epidermidis'in virulans faktörleri olarak gösterilen grup içerisinde; elastaz aktivitesine sahip olan hücre dışı metalloproteaz, sistin proteaz, serin proteaz, lipaz, daha önce *S.aureus*'ta tanımlanmış yağ asidi modifiye edici enzim (fatty acid modifying enzyme: FAME) gibi birçok enzim bulunmaktadır. Bilindiği gibi *S.aureus*'un ürettiği olduğu birçok toksin vardır. Ancak farklı olarak *S.epidermidis*, *S.aureus* kadar toksijenik değildir. *S.aureus*'ta da bulunan δ -toksinin *S.epidermidis* tarafından da üretildiği günümüzde kesin kabul edilmiştir. Bu toksini *hld* geninin kodladığı bilinmektedir. Bazı *S.epidermidis* suşlarının enterotoksin ve toksik şok sendrom toksini – 1 ürettiği konusu ise henüz tartışmalı bir konudur [31].

2.3.3. Lantibiyotik Üretimi

Lantibiyotik üretimi; *S.epidermidis*'in deriye bu kadar etkili kolonize olabilmesinin altında yatan önemli bir nedenidir. Lantibiyotikler; *S.epidermidis* ve diğer bazı Gram pozitif bakterilerin (ör: *Bacillus subtilis*, *Lactobacilli*) ürettiği bakteriyosinlerdir.

İlginç olarak *S.aureus*'ta bu özellik bulunmamaktadır. Birçok farklı çalışmada farklı lantibiyotikler tanımlanmıştır. Bunlar *epidermin*, *Pep5*, *epilansin*, *K7* ve *episidin* gibi nadir tiyoeter amino asidi içeren antibiyotik peptitlerdir. Lantibiyotikler daha çok Gram pozitif bakterilere karşı etkilidir. Böylece *S.epidermidis*, lantibiyotiklere duyarlı olan bakteriler karşısında kolonizasyonda üstünlük sağlamaktadır. Lantibiyotik salınımindan sorumlu genler genellikle plazmidler üzerinde yer almaktadır [31].

2.3.4. Konak İçerisinde Demir Kazanımı

Her bakteri gibi stafilokoklar da üremek için demire gereksinim duyar. Hücre dışı sıvılarda, transferrin ya da laktotransferrin gibi yüksek derecede serbest demiri bağlayan glikoproteinlerin varlığında stafilokokal üreme yavaşlamaktadır. Stafilokokların transferrinden demir sağlamalarının mekanizması bu gün için açıklığa kavuşmamıştır. Genel olarak bakterilerin demir kullanımı için iki mekanizma bilinmektedir. Bunlardan ilki transferrinden demiri uzaklaştırıp düşük moleküler ağırlıklı demiri bağlayan sideroforların üretimidir. Siderofor – demir kompleksleri özgül bakteriyel taşıyıcı sistemleri ile taşınmaktadır. Stafiloferrin A ve B (sırasıyla 481 ve 448 Da) ilk olarak *S.hyicus*'tan izole edilmiştir ve *S.epidermidis*'in de demir kısıtlı ortamlarda bu proteinleri sentezlediği bildirilmiştir İkinci mekanizma ise transferinin doğrudan bakteri yüzeyindeki reseptörlere bağlanmasıdır [32].

2.3.5. *S.saprophyticus*'un Patojenitesi

S.saprophyticus daha çok cinsel aktif genç kadınlarda görülen idrar yolu infeksiyonlarından sorumlu bir KNS'dir. Diğer KNS'lere göre daha sık idrar yolu infeksiyonu yapmasının nedeni özellikle üroepitelyal hücrelere daha yüksek afinite ile bağlanmasıdır. *S.saprophyticus*'un yüzeyinde bulunan 160 kDa büyüklüğündeki hemagglütinin/adezin özelliklerine sahip bir protein, bu yapışma özelliğini ve *S.saprophyticus*'un üst üriner sisteme doğru kolonizasyonunu açıklamaktadır. Bu protein genellikle anaerobik koşullarda eksprese olur ve üroepitelyal hücre yüzeyindeki fibrinojene bağlanır. Bu proteinin *S.aureus* ve *S.epidermidis*'te gözlenen otolizinlerle (Atl ve AtlE)

homolog olan bir otolizin olduğu düşünölmektedir. Aas adı verilen bu otolizin/adezin'in yeni bir stafilokokal adezin sınıfının üyesi olacağı düşünölmektedir [33].

Bir başka yüzey ilişkili fibriler protein ise *S.saprophyticus* yüzey ilişkili protein Ssp'dir. Üropatojen *S.saprophyticus*'ların % 98'inde saptanmıştır. Ayrıca *S.aureus* ve *S.epidermidis*'te bulunan Sdr proteinlerine benzer bir yüzey ilişkili protein olan Sdrl de *S.saprophyticus*'ta gösterilmiştir [34].

Kolonizasyon sağlandıktan sonra *S.saprophyticus* üreaz üretmeye başlar. 1980'lerin sonlarında aynı sayıda üreaz negatif ve üreaz pozitif *S.saprophyticus* suşlarının deneysel bir infeksiyon modelinde incelenmesi sonucu; üreaz pozitif bakterilerin aynı ortamda daha çok üredikleri gösterilmiştir. Bu bulgu doğrultusunda üreaz üretimi idrar yolu infeksiyonu oluşturan *S.saprophyticus* için bir virulans faktörü olarak kabul edilmiştir [35].

2.3.6. *S.lugdunensis* ve *S.schleiferi*'nin Virulans Faktörleri

S.lugdunensis ve *S.schleiferi*'nin 1988 yılında tanımlanmalarının hemen ardından her iki bakterinin de endokardit, polimer ilişkili infeksiyonlar, osteomyelit, septik artrit, idrar yolu infeksiyonu ve yara yeri infeksiyonu gibi nozokomiyal infeksiyonlardan soyutlandıkları bildirilmeye başlanmıştır. Birçok olguda agresif klinik seyir gözlenmesi ve özellikle endokardit olgularının diğör KNS'lerden daha ağır klinik tablo ile seyretmesi bu iki türün diğör KNS'lere oranla daha patojenik olduklarını düşöndürmektedir. [36-39].

S.lugdunensis ve *S.schleiferi* kümeleştirici faktör (clumping factor) oluşturmaları ve termostabil DNaz üretebilmeleri nedeniyle *S.aureus*'a benzerler. Ancak *S.lugdunensis* ve *S.schleiferi*'nin infeksiyon oluşturmalarındaki patojenik mekanizmalar henüz bilinmemekle beraber virulans determinantlarını *S.aureus* ile paylaştıkları düşünölmektedir.

S.lugdunensis suşlarının % 25'i bakteriyel kolonizasyonda ve nötrofillerin fagositoz ilişkili aktivitelerinde önemli rol oynayan hücre dışı slime ya da glikokaliks üretirler. Bu maddenin monositlerdeki prostoglandin E2 üretimini güçlü bir şekilde uyardığı ve sonuç olarak T hücre proliferasyonunu engellediğı gösterilmiştir [40]. Monositlerin bu aktivasyonu, makrofajların TNF α (tumor necrosis factor α) ve nitrik oksit gibi iki önemli maddenin antimikrobiyal aktivitelerinin de modüle edilmesi ile sonuçlanmaktadır.

Bunun yanında *S.lugdunensis*'in esteraz, FAME, proteaz, lipaz gibi enzimleri ürettiği ve bunların doku invazyon faktörleri gibi rol oynadıkları belirtilmektedir. *S.lugdunensis*'in; kollojen, fibronektin, vitronektin, laminin, fibrinojen, trombospondin, plazminojen ve insan IgG gibi birçok moleküle bağlanma kapasitesi mevcuttur Ancak fibronektin kaplı polimetilmetakrilat (PMMA) yüzeylere iyi yapışmamaktadır [31].

Değişken olarak bazı *S.lugdunensis* suşlarında *S.aureus*'taki δ -hemolizine fenotipik olarak benzeyen bir hemolizin olan "SLUSH" üretilmektedir. Bu hemolizin ayrıca *S.haemolyticus* tarafından salgılanan bakteriyosine de benzemektedir [31].

S.lugdunensis için tanımlanmış olan virulans faktörlerinin çoğu son on yılda *S.schleiferi* için de tanımlanmıştır. Bu virulans faktörlerinden glikokaliks, enzimlerden esteraz, proteaz, FAME, lipaz ve hemolizinerler sayılabilir. Ayrıca *S.lugdunensis*'den farklı olarak *S.schleiferi* de fibronektin ve fibrinojen kaplı PMMA yüzeylere *S.aureus* kadar güçlü tutunma göstermektedir. Ancak *S.aureus*'ta bulunan ClfA'ya da homolog olabilecek bir fibrinojen bağlayıcı yüzey komponenti bulunamamıştır [31].

KNS'lerin infeksiyon patogeneğinde önemli rol alan yüzey proteinleri ve işlevleri Tablo 7'de özetlenmiştir.

Tablo 7: Stafilokokların yüzey proteinleri ve fonksiyonları [31]

Yüzey yapısı	Fonksiyonu
Stafilokokal yüzey proteinleri: SSP-1, SSP2	<i>S.epidermidis</i> 'in değişmemiş polistren'e tutunması
Otolizin: AtlE	<i>S.epidermidis</i> 'in değişmemiş ya da vitronektin kaplı polimer yüzeye tutunması
Biyofilm ilişkili protein: Bap	<i>S.aureus</i> 'un polimer yüzeye tutunması ve biyofilm birikmesi
Bap-homologu protein: Bhp	<i>S.epidermidis</i> 'in biyofilm oluşturmaya
Kapsüler polisakkarit adezin: PS/A	<i>S.epidermidis</i> 'in polimer yüzeye tutunması ve biyofilm birikmesi
Fibrinojen bağlayıcı protein: Fbe	<i>S.epidermidis</i> 'in fibrinojenin β zincirine bağlanması
SD-tekrarı içeren proteinler: SdrG, SdrF, SdrH	SdrG: <i>S.epidermidis</i> 'in fibrinojenin β zincirine bağlanması ve trombin ile indüklenen fibrinojen pıhtılaşmasını engellenmesi. SdrF ve SdrH fonksiyonları henüz bilinmemektedir.
Hücre içi adezyon gen kümesi: <i>icaADBC</i>	PIA üretilmesi
Polisakkarit hücre içi adezin PIA	Hücre içi adezyon ve biyofilm birikmesi
Slime-ilişkili antijen: SAA	PIA ile aynı fonksiyona sahiptir
Akümülyasyon-ilişkili protein AAP	Biyofilm kümelenmesi
Otolizin: aas	<i>S.saprophyticus</i> 'un fibronektine ve üroepitelyal hücrelere tutunması, hemaglütinasyon
<i>S.saprophyticus</i> ilişkili protein: Ssp	<i>S.saprophyticus</i> 'un üroepitelyal hücrelere tutunması

2.4. KNS'lerin Etken Olduğu İnfeksiyonlar

2.4.1. İntravenöz Kateter İnfeksiyonları ve Nozokomiyal Bakteriyemi

Hastaneye yatan hastaların yarısından fazlasına, yattıkları süre boyunca, damar içi araç uygulanır. Santral damar yolu uygulanan hastaların polimer ilişkili infeksiyon sıklığı servislerde 4.5/1000 kateter günü, yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) ise 14.6/1000 kateter günü olduğu bildirilmektedir [14]. KNS'ler; hastanelerde özellikle damar içi kateterlerin sıklıkla kullanıldığı birimlerde nozokomiyal bakteriyemiye en sık sebep olan bakteri grubudur [41]. Kan kültürleri kontaminasyon oranının genel olarak % 1 – 3 olduğu bilinse de yapılan çalışmalarda KNS'lerin etken olduğu bakteriyemilerin % 25–74 oranında kontaminasyona bağlı olduğu gösterilmiştir [42]. Tek pozitif kan kültürü; çoğu zaman kontaminasyon olduğunu düşündürmektedir. Bu nedenle gerçek bakteriyemi göstermek için; gerçek bakteriyemi tanımında belirtildiği üzere; farklı damarlardan ya da damar yollarından çoklu kan kültür alınması gerekmektedir [43]. Flebotominin tekniğine uygun yapılması ve daha etkili deri antisepsisinin sağlanması hastanelerdeki kan kültürü kontaminasyonlarının azalmasını sağlayacaktır [44, 45].

Kullanılan tüm kateterlerin % 12 – 37'si infekte olmaktadır. *S.epidermidis* birçok makalede intravenöz kateter infeksiyonlarının açık ara önde giden etkeni olarak gösterilmektedir [4, 14, 15]. *S.epidermidis*'e bağlı kateter ilişkili infeksiyonların artışı bu mikroorganizmaya bağlı nozokomiyal KDI insidansını arttırmaktadır. Bu artış; geçmiş yıllarda nozokomiyal infeksiyon etkeni olarak önde giden Gram negatif bakterilerin, günümüzde nozokomiyal bakteriyemi sıklığının artmasından dolayı yerini Gram pozitif bakterilere bırakmasına neden olmuştur [14].

Kateter ilişkili infeksiyonlardan korunmanın başlıca yolu hastaya temastan önce ve sonra el yıkanması, kateter yerleştirirken uygun antiseptik yöntem, kateter yerleştirildikten sonra düzenli kateter bakımıdır [15]. Uygun antiseptik solüsyon seçiminde yapılan çalışmalar % 0.5 chlorhexidine'nin % 10 povidone-iodine'den daha etkili olduğunu göstermektedir [46]. Ayrıca antibiyotik emdirilmiş kateterlerin kateter infeksiyonu gelişmesini engellediği konusunda görüşler olsa da bu tür uygulamanın antibiyotik direncinde gereksiz artışlara neden olacağına dair görüşler de vardır [47].

S.epidermidis ile gelişen bir kateter infeksiyonunda öncelikle kateterin uzaklaştırılması düşünülmelidir. Eğer kateter uygulanacak başka bir damar bulunamıyorsa

aynı giriş yeri steril tel kılavuz ile sabitlendikten sonra kateterin çekilip yeni bir kateterin aynı giriş yerine kılavuz yardımıyla uygulanması önerilmektedir. Ayrıca tünel infeksiyonu varlığında giriş damara giriş yeri sabit kalarak tünel yerinin değiştirilmesi de düşünülebilir [14, 15]. Bunun yanı sıra kateter çıkarılamıyor ise bazı seçilmiş durumlarda kateteri kurtarmak amacı ile kateteri antibiyotikli solüsyonlar ile kilitleme tedavisinin (antibiotic lock therapy) başarılı olduğu gösterilmiştir [48-50]. Hastada birçok noktada damar yolu kateteri varsa antibiyotik infüzyonu rotasyonel olarak her seferinde farklı kateter yoluyla yapılmalıdır. Hastanenin ya da bölümün direnç paternleri biliniyorsa ampirik tedavi bu direnç paternine uygun bir antibiyotik ile yapılmalıdır. Kateter ilişkili bakteri izolatlarında metisilin direncinin yaygın olduğu merkezlerde tedaviye glikopeptid antibiyotiklerle başlanması önerilmektedir [14, 15].

2.4.2. Doğal ve Prostetik Kapak Endokarditi

KNS'ler ile oluşan doğal kapak endokarditi nadir görülür ve tüm endokardit olgularının % 5 – 8'ini oluşturur [51]. Endokardit oluşumu, viridan sterptokoklarda olduğu gibi geçici bakteriyemiler sırasında KNS'lerin hasar görmüş kalp kapaklarına ve endokarda tutunmaları ile gerçekleşmektedir. Doğal kapak endokarditinde nadir olarak etken olan KNS'ler diğer taraftan prostetik kapak endokarditlerinin sıklıkla saptanan etkenidir [52]. Yayınlanan olgu serilerinde *S.epidermidis*'in prostetik kapak endokarditlerinin yaklaşık % 40'ından sorumlu olduğu gözlenmektedir. Günümüzde damar içi araç kullanımının artması nedeniyle KNS'lerin doğal kapakta oluşturdukları endokardit sıklığı da giderek artmaktadır. Bunun yanında *S.epidermidis* dışındaki diğer KNS'lerin endokarditlerden nadir olarak soyutlandığı gözlenmektedir [53]. *S.epidermidis*'in sorumlu olduğu infeksiyonlarda komplikasyonların sıklıkla gözleendiği belirtilmektedir. Yine bu infeksiyonlardan izole edilen KNS'lerin metisilin direncinin % 87'lere çıktığı belirtilmiştir [54, 55]. Çoğu çalışmada elde edilen KNS izolatlarının çoklu dirençli olması nedeniyle, bunların hastane kaynaklı bakteriler olduğu kanısını doğurmaktadır. Günümüzde kullanılan moleküler epidemiyolojik tiplendirme yöntemleri ile bu bakterilerin hastane kaynaklı oldukları gösterilebilmiştir.

Prostetik kapak endokarditi için yapılan geleneksel sınıflamada; ilk iki ay içerisinde oluşan endokardit cerrahi ile ilgili olarak atfedilip “erken dönem endokarditi” olarak

nitelendirilmektedir. İlk iki aydan sonra meydana gelen endokarditi “geç dönem endokarditi” olarak adlandırılmaktadır ve cerrahi ile ilgili olmayan grup olduğu belirtilmektedir [56]. Ancak bu sınıflama *S.epidermidis* ile oluşan infeksiyonlara uymamaktadır. Çünkü *S.epidermidis*’e bağlı gelişen prostetik kapak endokarditlerinin çoğunluğunun bir yıl içerisinde sıklıkla da ilk iki aydan sonra geliştiği görülmektedir. Bu durumu destekleyecek birçok bulgu vardır. Özellikle *S.epidermidis*’e bağlı gelişen prostetik kapak endokarditinde cerrahi bölgeden (cerrahi iğnenin geçtiği yerlere yakın yerlerde) kaynaklanan infeksiyonlar gözlenmektedir. Bu bölgeye cerrahi sonrasında bakterilerin bakteriyemi ile ulaşması çok zor görünmekte ve bu da bakteriyel inokulumun ameliyat sırasında yapıldığını işaret etmektedir.

S.epidermidis ile oluşan prostetik kapak endokarditinin tedavisi çoğu zaman hem medikal hem de cerrahidir. Metisilin dirençli stafilokok (MRS) infeksiyonlarının tedavisinde çoğu zaman tek seçenek vankomisinidir. Bunun yanına gentamisin, rifampisin ya da her ikisinin birden eklenmesi tedavi başarısını arttırmaktadır [55]. Özellikle kapak disfonksiyonu olan ve doku invazyonu gelişen olgularda cerrahinin kritik önemi vardır [54, 55].

2.4.3. Serebrospinal Sıvı Şantı İnfeksiyonları

S.epidermidis; serebrospinal sıvı şant infeksiyonlarına en sık neden olan bakteridir. Schoenbaum ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; on yıllık süre boyunca hidrosefali tanısı alan ve şant uygulanan 289 hastanın % 27’sinde şant infeksiyonu gelişmiş ve bu infeksiyonların yarısından fazlasında etkenin *S.epidermidis* olduğu gösterilmiştir [57]. Daha yakın tarihli bir çalışmada ise; pediatrik yaş grubundaki ventrikülo-peritoneal şant uygulanan 820 hastanın %11’inde şant infeksiyonu gelişmiş ve bu infeksiyonların % 53’ünden KNS’ler izole edilmiştir. Elde edilen KNS’ler içerisinde en sık *S.epidermidis* saptanırken, *S.aureus*’un da tüm şant infeksiyonlarının % 26’sını oluşturduğu belirtilmiştir. İnfeksiyonların çoğunlukla implantasyonun ilk iki haftalık döneminde olduğu dikkati çekmektedir. Yine bu çalışmada; intraoperatif nöroendoskop kullanımının infeksiyon riskini arttırdığı gösterilmiştir [58]. Birçok olguda sıklıkla beklenen menenjit bulgularının olmadığı bunun yerine; şant disfonksiyonu, düşük derecede ateş yüksekliği, yara yeri infeksiyonu bulguları olduğu gözlenmektedir. Serebrospinal sıvıda pleositoz neredeyse daima bulunmakta ancak dikkat çekici sayıda olamamaktadır. Şant infeksiyonlarında

serebrospinal sıvı glukozu bir miktar düşük bulunabilir. Lumbal serebrospinal sıvı, ventriküler serebrospinal sıvıdan daha fazla normal görünebilir ve kültür negatif olabilir. Bu nedenle optimal tanı için her iki serebrospinal sıvıdan da kültür yapılmalıdır. Enfeksiyon sıklıkla hastane kaynaklı olduğundan hastadan izole edilen *S.epidermidis*'in metisiline dirençli olabileceği göz önünde tutulmalıdır. Antibiyotik tedavisi mutlaka kombinasyon şeklinde olmalı, sistemik ve intraventriküler antibiyotik uygulamalarını içermelidir. Vankomisin, gentamisin ve rifampisin seçilebilecek antibiyotikler arasındadır. Serebrospinal sıvıya geçişleri düşük olan vankomisin ve gentamisin intraventriküler olarak verilebilir. Rifampisin ise sistemik uygulamadan sonra yeterli serebrospinal sıvı konsantrasyonuna erişebilmektedir. Metisilin duyarlı *S.epidermidis* (MSSE) ile enfekte şantların mutlaka sistemik olarak verilen, penisilinaza dirençli penisilin grubu antibiyotiklerle tedavisi ön planda düşünülmelidir. Şantın çıkarılması diğer bir tedavi yöntemi olsa da bazı şant enfeksiyonları, şantın çıkarılmasına gerek kalmadan tedavi edilebilmektedir. Birçok çalışma şantlı hastalarda antibiyotik profilaksisinin şant enfeksiyonunu önlemede faydasının olmadığını gösterse de, bu konuda yayınlanmış meta-analizlerde profilaksinin faydalı olabileceği bildirilmiştir [59].

2.4.4. Peritoneal Diyaliz Kateteri İlişkili Peritonit

Son yıllarda “devamlı ayaktan peritoneal diyaliz” (CAPD); kronik böbrek yetmezliği hastalarının izleminde hemodiyalizden daha fazla taraf bulmaktadır. Buna karşın bu hastaların % 40'ında uygulamanın ilk yılında peritonit gelişmektedir [60]. Bu hastalarda peritonitin toplam insidansının hasta başına yıllık 0,5 – 6,3 atak arasında olduğu bilinmektedir. Tanı koyma kriterleri konusunda tam anlamıyla bir uzlaşma olmamakla beraber, karın ağrısının yanı sıra bulanık diyalizat sıvısı ve bu sıvıda polimorfonükleer lökosit hakimiyeti olan milimetreküpde 100 lökosit ve üstünün görülmesi tanıyı desteklemektedir. Bu sıvının Gram ile boyanmasında sıklıkla mikroorganizma gözlenmez. Peritonit gelişen hastalardan % 17 – 50 arasında soyutlanan bakteri *S.epidermidis*'dir [61]. Ancak az miktardaki diyaliz sıvısının rutin kültür yöntemleri ile ekilmesi çoklukla kültürlerde üremenin gözlenmemesi ile sonuçlanmaktadır. Bu nedenle daha duyarlı tekniklere ihtiyaç vardır. Bu teknikler; daha fazla miktarda peritoneal sıvının kültüre alınması (>100ml), filtrasyon ya da sıvı besiyerinin alt kültürlerle alınması şeklinde

sınıflandırılabilir. Ancak bu tür yöntemler az miktardaki *S.epidermidis*'in de üremesine neden olacağından kontaminasyon – infeksiyon ayırımı yapılması zorlaşacaktır.

CAPD hastalarında *S.epidermidis*'e bağlı gelişen peritonit atakları genellikle kateter çıkarılmasına gerek kalmadan tedavi edilebilmektedir. Ancak tekrarlayan ataklar ve dirençli bakteri durumlarında kateterin çıkarılması esastır. CAPD hastalarında gelişen peritonitte infeksiyon etkenlerinin antibiyotik duyarlılıklarını araştıran bir çalışmada; *S.epidermidis*'lerde metisilin direncinin 10 yıllık izlemde % 18'lerden % 40'lara çıktığı gözlenmiştir [62]. CAPD kateterlerinin genellikle hasta normal florasından kaynaklanan mikroorganizmalarca infekte olduğu göz önünde bulundurulacak olursa bu gruptaki hastaların deri floralarındaki MR-KNS'lerin gün geçtikçe yaygınlaştığı sonucu ortaya çıkmaktadır.

CAPD hastaları dışında, evde sağlık hizmeti alan hasta grubunda da dirençli mikroorganizmaların sıklığının arttığı bildirilmektedir. Nazal MR-KNS taşıyıcılığını araştıran bir çalışmada; evde hemşirelik hizmeti alan hastaların nazal sürüntü örneklerinden elde edilen KNS'lerin % 40'ında metisilin direnci saptanırken hastalara bakan personelde ise nazal MR-KNS taşıyıcılığının % 60'lara ulaştığı gözlenmiştir [63].

2.4.5. İdrar Yolu İnfeksiyonları

S.saprophyticus; genç kadınlardaki idrar yolu infeksiyonlarından nadir olarak soyutlanan bir KNS'dir. Bunun dışında daha nadir olarak *S.epidermidis*'in de idrar yolu infeksiyonlarından soyutlandığı görülmüştür [51]. Bu iki KNS rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında antibiyogramlarına 5 µg'lık novobiyosin diski konularak ayrılır. *S.saprophyticus* novobiyosine dirençlidir. *S.epidermidis* ve diğer KNS türleri ise novobiyosine duyarlıdır. Çoklu antibiyotik dirençli KNS türlerinin çok büyük kısmı bile novobiyosine duyarlı bulunmuştur. Bu nedenle idrar örneklerinden izole edilen novobiyosine dirençli KNS izolatları genellikle ek bir ayırım yapılmadan *S.saprophyticus* olarak rapor edilir [8]. *S.saprophyticus* kimi zaman üst üriner sistem infeksiyonu dahi yapan gerçek bir üro-patojendir. İdrar örneklerinden *S.saprophyticus* izole edilmiş kadınların % 90'ından fazlasında üriner sisteme ait semptomlar görülmekte ve bu kadınların % 70 – 85'inde piyüri saptanabilmektedir. Polikliniğe başvuran idrar yolu infeksiyonu yakınmaları olan genç kadınlarda, idrar yolu infeksiyonlarından izole edilmiş

KNS izolatlarının % 95'i *S.saprophyticus*'tur. *S.saprophyticus* ile oluşmuş bir infeksiyonu; hastaların yakınmaları, fizik bakı bulguları ile enterik bakterilerle oluşmuş olan infeksiyondan ayırmak olanaksızdır. *S.saprophyticus* sıklıkla cinsel olarak aktif genç kadınların idrar yollarından izole edilmektedir [51]. 2001 yılında farklı ülkeler ve 252 merkezden toplanmış verilerle yapılmış bir çalışmada; komplike olmayan 4734 toplum kökenli üriner sistem infeksiyonunun yalnızca % 4.6'sından *S.saprophyticus*'un sorumlu olduğu gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada; elde edilmiş olan 116 *S.saprophyticus* izolatının antibiyotik duyarlılıkları çalışılmış ve ampisilin direnci % 1.7, gentamisin direnci % 4.3 olarak saptanmıştır. Trimetoprim-sulfametoksazol, siprofloksasin ve nitrofurantoin direncine ise hiç rastlanılmamıştır [64]. Enterik bakterilerin aksine *S.saprophyticus* ile oluşmuş idrar yolu infeksiyonları ilginç olarak mevsimsel özellik gösterir. Yaz sonu ve sonbahar başı gibi sıklığı artar. Bunun dışında diğer enterik bakterilere göre kültür ortamlarında koloni sayısı az olduğundan ($<10^5$ CFU/ml) ya da üretilemediğinden akut üretral sendromun (disüri-piyuri sendromu, abakterik pyüri) bir etkeni olarak gösterilmektedir. *S.saprophyticus*'un etken olduğu idrar yolu infeksiyonlarında relaps, hastaların % 10'unda görülebilir [51].

S.saprophyticus dışı KNS'lerin idrar yolu infeksiyonlarından soyutlanmaları çok daha nadir bir durumdur. *S.saprophyticus* dışı KNS'lerin oluşturduğu idrar yolu infeksiyonlarından % 80 – 90 oranında *S.epidermidis* soyutlanmaktadır. *S.epidermidis* daha çok hastanede yatan ve idrar kateteri bulunan hasta grubunda etken olarak karşımıza çıkar. Hastaların çoğu yeni üriner sistem operasyonu olan, renal transplantasyon sonrası, nörolojik mesanesi olan, nefrolitiazis, ya da obstrüktif üropatisi olan komplike hastalardır [51].

2.4.6. Protez Eklem İnfeksiyonu ve Osteomyelit

KNS'lerin *S.aureus* kadar sık osteomyelit etkeni olduğu söylenemez. Ancak gün geçtikçe osteomyelit etkeni olarak öne çıktığı başlıca iki durum vardır. Bunlar; eklem protezi takılması sonrası gelişen protez infeksiyonu ve osteomyelitler ile açık kalp cerrahisi olmuş hastalarda gelişen sternal osteomyelitlerdir. Protez infeksiyonları cerrahiden sonra genellikle % 0.5 – 2 arasında görülen bir durumdur. Protezin tipinden bağımsız olarak bu infeksiyonların % 45 – 55'inden *S.epidermidis*'in başını çektiği KNS'ler soyutlanmaktadır. Yabancı cisim söz konusu olduğundan başarılı bir medikal

tedavinin zor olduğu bu olgularda derin cerrahi debridman ya da protezin çıkarılması söz konusu olmaktadır [65].

Sternal osteomyelit; kardiyotorasik cerrahi sonrası gelişen nadir bir komplikasyon olup, olguların % 1 – 4.5’inde gözlenir. *S.epidermidis*’in bu olguların % 16 – 57’sinden sorumlu olduğu belirtilmektedir. Sternum bölgesinde deri altı dokuların ince olmasından dolayı çok küçük bir lezyonun bile derin infeksiyon ve osteomyelit ile sonuçlanma olasılığı yüksektir. Bu nedenle dikkatli olunmalıdır. Yara yeri akıntısı, eritem ve kostokondral eklem hassasiyeti infeksiyon geliştiğinde gözlenebilen bulgulardır. Tanı için aksiyel tomografi yardımcı radyolojik tetkiktir. Alınabiliyorsa aspirasyon kültürü alınması önerilmektedir. Hastane kaynaklı patojenlerin direnç durumuna göre ampirik tedavinin önemi büyüktür [51].

2.5. KNS infeksiyonlarında Kullanılan Antibiyotikler ve Tedavi

Stafilokoklarca oluşmuş bir infeksiyonun tedavi seçenekleri öncelikle bu bakterinin metisilin direnci olup olmaması üzerine kurgulanmaktadır. Çünkü metisilin direnci; o bakterinin diğer tüm beta-laktam halkası içeren antibiyotiklere, hatta penisilinaza dirençli penisilinlere karşı bile dirençli olduğunun göstergesidir. Bu nedenle MR-KNS’lerce oluşmuş infeksiyon ile metisiline duyarlı KNS’lerce (MS-KNS) oluşmuş infeksiyonların tedavisi ayrı ayrı ele alınmıştır.

2.5.1. MS-KNS ile Oluşan İnfeksiyonlarda Tedavi

MS-KNS ile oluşmuş infeksiyonların başlıca tedavisi beta-laktam antibiyotik grubundan bir antibiyotik ile yapılmalıdır. Ancak stafilokoklarda penisilinaz üretimi sık olduğundan penisilinazlara nispeten daha dirençli olan birinci kuşak sefalosporinler, beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları, klindamisin ve sık kullanılırsa da eritromisin ve ko-trimoksazol seçilebilecek tercihlerdir [66]. 1960’larda birinci kuşak sefalosporinlerin bulunması, penisilinaza daha dirençli sentetik antibiyotik grubu olan nafsilin, oksasilin ve metisilinin geliştirilmesine öncülük etmiştir. Penisilinaza dirençli penisilinler olarak bilinen bu grup antibiyotiğin özelliği; büyük 6’ açıl grubu bulundurduklarından penisilinazın bu beta-laktam halkasına olan afinitesinin

engellenmesidir. Stafilocoklar beta-laktamazlarını hücre dışı ortama sekrete ettiklerinden daha potent beta-laktamaz salgılayan bir popülasyonun seçilmesi imkansız hale gelmektedir. Oysa Gram negatif bakterilerde; beta-laktamazlar hücre duvarı katlarında bulunduğundan daha potent beta-laktamaz üreten bakteriler, beta-laktam antibiyotikler karşısında doğal seçime uğrayarak çoğalmaktadır. Toplum kaynaklı KNS'lerde metisilin direnci % 20'lerde iken hastane kökenli infeksiyonlarda KNS direnci % 80'lerin üzerine çıkmış durumdadır. Hastane kaynaklı KNS infeksiyonlarda gün geçtikçe metisilin direncinin yaygınlaşması nedeniyle KNS'lerin etken olabileceği düşünülen infeksiyonlarda ampirik tedavide beta-laktam antibiyotiklerin kullanılması riskli bir durumdur [67].

2.5.2. Stafilocoklarda Penisilin Direnci

Livermoore'un yazdığı bir derlemede belirttiğine göre; 1940 yılında, İngiltere'nin Oxford kentinde bir polis memuru, dudak kenarından başlayan ve yüzüne doğru yayılan selülit tablosuyla hastaneye başvurdu. Lezyondan alınan örneklerde *S.aureus* ile birlikte *Streptococcus pyogenes* izole edildi. İzole edilen stafilocokun sülfonamide dirençli olması nedeniyle ilk defa penisilin deneysel olarak bir hastada kullanılması kararı alındı. Hastanın lezyonunda dramatik düzelme sağlanırken tedavi sırasında yeterli miktarda penisilin üretilemediğinden hasta kaybedildi. Bu tecrübe penisilin potansiyel etkinliğinin ispatı oldu ve penisilin üretimi hızlandırılarak 1944'te ilk kez piyasaya sürüldü. Yine aynı yıl, Kirby ve arkadaşları, stafilocokların, "penisilnaz" olarak adlandırılan, penisilini parçalayan bir enzim üretebildiğini bildirdiler. Penisilin üretildiği ilk yıllarda penisilnaz üreten stafilocoklar % 6 – 8 oranında görülürken, günümüzde *S.aureus* suşlarında % 80 – 90'lara ulaşmıştır. KNS'lerde de penisilnaz üretiminin buna paralellik gösterdiği bilinmektedir [67].

Penisilnazlar, penisilin ile beraber bazı beta-laktam antibiyotikleri de parçaladıkları için genel olarak beta-laktamaz olarak adlandırılırlar. Aktarılabılır bir gen olan beta-laktamaz geni; genelde diğer antibiyotik direnç genleri ile birlikte bir plazmid üzerinde taşınır. Stafilocoklarda tanımlanan beta-laktamaz; *blaZ* geni tarafından kodlanır. Bu gen bölgesinin ekspresyonu *blaR1*, *blaR2* (regulator) ve *blaI* (inhibitor) gibi düzenleyici genler ile sağlanır. Gram negatif bakterilerde olduğu gibi stafilocoklarda da beta-laktamaz üretiminin indüklenebilirlik özelliği vardır. İnhibisyondan sorumlu *blaI* geni ortamda beta-

laktam antibiyotik yokluğunda *blaZ* ve *blaR* gen bölgelerinin çalışmasını baskı altında tutarak düşük seviyede beta-laktamaz üretimine sebep olur. Ortamda beta-laktam antibiyotik varlığında ise *blaR1* tarafından *blaZ* geni uyarılarak artmış miktarda beta-laktamaz üretimi sağlanır [67].

2.5.3. Stafilocoklarda Metisilin Direnci

Metisilin direnci de penisilin direnci gibi hızla artarak yayılmıştır. İlk metisilin dirençli *S.aureus* (MRSA) izolatu, metisilin piyasa sürülmesinden sadece birkaç ay sonra bildirilmiştir (NCTC 10422; Jevons suşu – 1961) [67].

Antibiyotik direnci olmayan bir stafilocokta; başlıca dört tane PBP olduğu bilinmektedir. Bu proteinler; PBP1, PBP2, PBP3 ve PBP4 olarak adlandırılırlar. Bunların dışında metisiline dirençli suşlarda penisilin direncinden sorumlu olduğu gösterilmiş olan ve beta-laktamlara düşük afinite gösteren, 76 kDa ağırlığında, PBP 2' ya da PBP 2a olarak adlandırılan farklı bir PBP bulunmaktadır [68]. Beta-laktam antibiyotikler ile diğer PBP'ler inhibe olurken PBP2a etkilenmez ve bakterinin yaşamını sürdürmesini sağlar. Bakterinin PBP2a üretmesi; DNA'sında bulunan 32 – 60 kb büyüklüğündeki bir gen olan *mecA* sayesinde mümkün olmaktadır. Bu genin hemen komşuluğunda stafilocokal kaset kromozomu (staphylococcal cassette chromosome – SCC) bulunmaktadır. SCC; stafilocok türleri arasında genetik madde alışverişine aracılık eden yeni bir hareketli genetik elemandır. SCC elemanları, değişik KNS türlerinde ve metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA) izolatlarında da bulunmaktadır. *S.aureus*'da metisilin direncinden sorumlu olan *mecA* geni de SCC*mec* adı verilen ve SCC ailesinin metisilin direnci açısından özelleşmiş bir üyesinde bulunmaktadır. SCC*mec*; bakteriyofajlar, transpozonlar, konjugatif transpozonlar veya integre olabilen plazmidler gibi bilinen diğer hareketli genetik elemanlardan farklıdır. SCC; aslında stafilocok türleri arasında genetik değişim için aracılık eden genomik 'adalar'dır. SCC*mec* ise SCC'lerin metisilin direnci taşıyan özel bir tipidir. SCC*mec*'in KNS türlerinde *S.aureus*'a göre daha yüksek oranda saptandığı bilinmektedir. Bu nedenle KNS'lerin SCC*mec* için rezervuar olabileceği düşünülmektedir. *S.aureus*'taki *mecA* geni ile *S.sciuri*'nin *mecA* geni % 88 oranında homoloji göstermektedir. Bu bulgular SCC*mec* adasının KNS'lerden *S.aureus*'a aktarılabilmiş olacağını düşündürmektedir [69].

SCC; yapı olarak patojenite adasına benzemekle birlikte, hiç virulans geni içermemektedir. Bu eleman, 50 açık okuma parçası “open reading frame” (ORF) içerir. SCC*mec*, 21 – 67 kb büyüklüğünde bir DNA dizisi olup, kromozomda replikasyon başlangıcının (*oriC*) yakınındaki *orfX*’in 3’ ucunda *attB_{scc}* bölgesinde yer almaktadır. SCC*mec*, *mec* gen kompleksi (*mecA* ve düzenleyici genler) ve *ccr* kompleksinden oluşmuştur. *ccr*, SCC*mec*’in hareketinden sorumlu bölgeye özgül bir rekombinazı kodlamaktadır. *ccr* gen kompleksinde *ccrA*, *ccrB* ve yeni tanımlanan *ccrC* olmak üzere üç farklı rekombinaz bulunmaktadır. Rekombinazların ayrıca dörder allotipleri bulunmaktadır. Bunlar *ccrA* için; *ccrA1*, *ccrA2*, *ccrA3*, *ccrA4* ve *ccrB* için; *ccrB1*, *ccrB2*, *ccrB3*, *ccrB4*’tür. SCC*mec*, *ccr* gen kompleksi dışında *mecA*, *mecI* ve *mecR1*’den oluşan *mec* gen kompleksini içerir [69].

Günümüze kadar sınıf A – E olmak üzere toplam beş *mec* gen kompleksi tanımlanmıştır. SCC*mec* elemanının diğer kısımlarında ise, SCC*mec* tipleri arasında farklılık bulunan ve J bölgesi (“junkyard”) olarak adlandırılan çeşitli diziler bulunur. J dizileri arasında “insertion sequence” denilen IS elemanları, farklı antibiyotiklere dirençten sorumlu transpozonlar, beta-laktamaz geni yer almaktadır. SCC*mec* elemanına entegre olan transpozonlarda makrolidler ve tetrasiklinler gibi antibiyotiklerle, kadmiyum ve cıva gibi ağır metallerle direnç genleri bulunur. SCC*mec*, *ccr* gen kompleksi allotiplerine ve *mec* gen sınıfının farklı kombinasyonlarına göre adlandırılmaktadır. 1999’da ilk SCC*mec* elemanının bildirilmesinden bu yana beş farklı tip SCC*mec* tanımlanmıştır (Şekil 2) [69].

Tip I: SCC*mec*, sınıf B *mec* gen kompleksi ve tip 1 *ccr* gen kompleksi,

Tip II: SCC*mec*, sınıf A *mec* gen kompleksi ve tip 2 *ccr*,

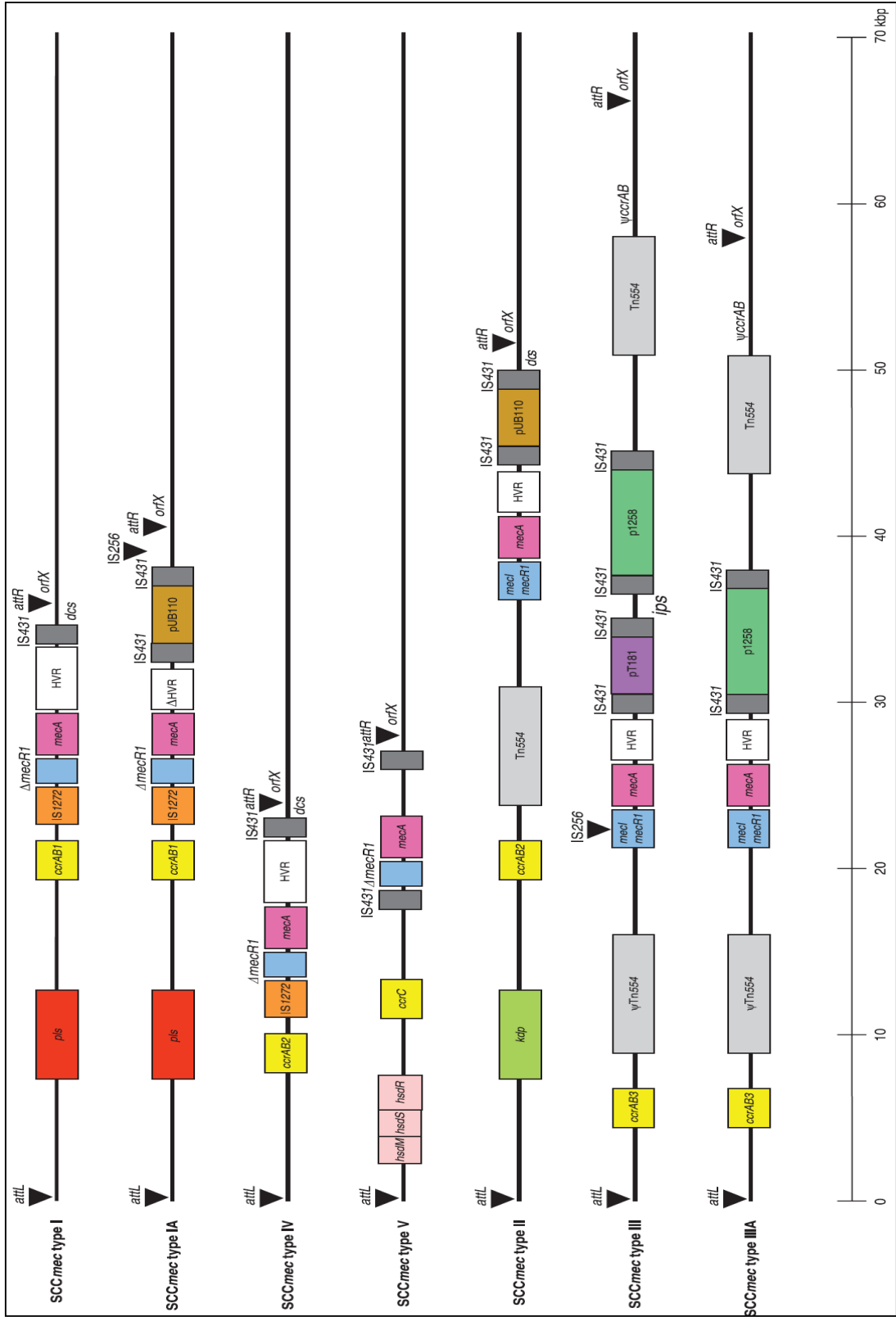
Tip III: sınıf A *mec* gen kompleksi ve tip 3 *ccr*,

Tip IV: sınıf B *mec* gen kompleksi ve tip 2 *ccr*,

Tip V: ise sınıf C *mec* gen kompleksi ile *ccrC* içermektedir.

SCC*mec* tiplerinden, Tip I, II ve III genellikle hastane kökenli, tip IV ve tip V ise toplum kökenli MRSA izolatlarında bulunmaktadır.

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesinde MRSA suşlarının SCC*mec* tiplerinin belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışma sonuçlarına göre, D.E.Ü. Hastanesi izolatlarında egemen olan klonal tipin SCC*mec* tip III varyantı olduğu bulunmuştur [70].



Şekil 2: Stafilokoklarda saptanan SCCmec tipleri [69]

SCC*mec* içerisinde bulunan *mecA* gen kompleksi ayrıca beş yapısal sınıfa (sınıf A, B, C, D, E) ayrılmaktadır (Şekil 3). Bu yapısal sınıfların en yaygın görüleni sınıf A *mecA* kompleksi olup içerisinde *mecA* dışında kontrol genleri *mecR* ve *mecI* genleri ve IS431 yer almaktadır. Bu IS431 sayesinde SCC*mec* IS431 ilişkili plazmid veya transpozonların rekombinasyonla entegre olabileceği bir direnç adası oluşturmaktadır [69].

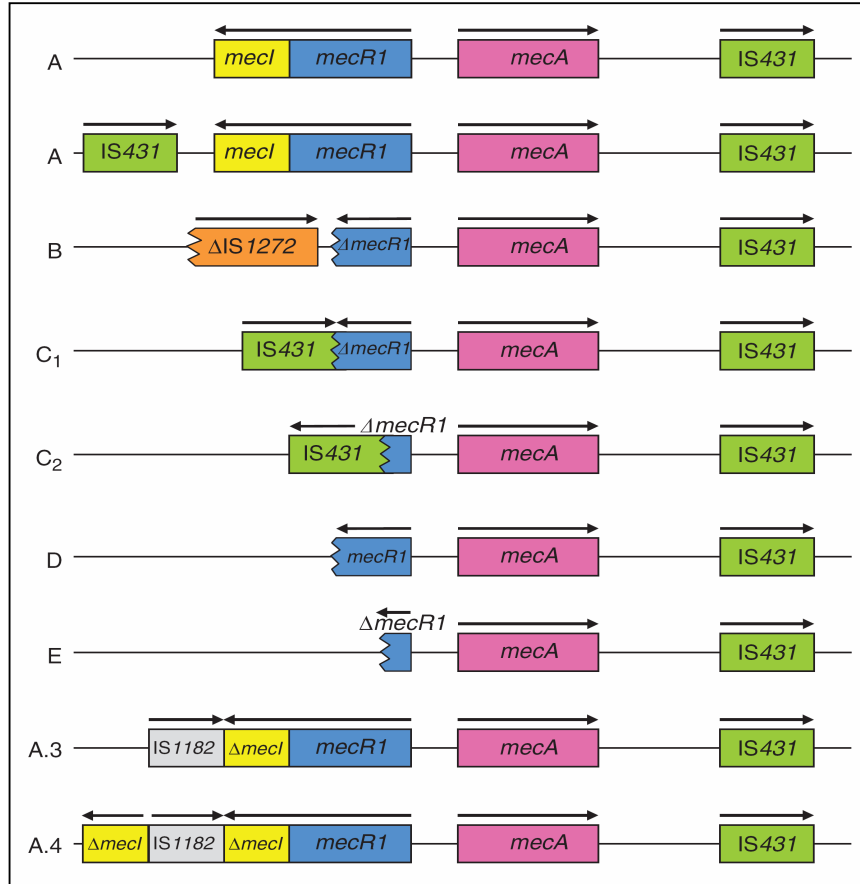
Sınıf A: IS431- *mecA*- *mecR1*- *mecI*

Sınıf B: IS431- *mecA*- Δ *mecR1*- IS1272 (*mecR1*'in penisilin bağlayan alanının IS1272 ile yer değiştirmesi)

Sınıf C₁ ve C₂: IS431- *mecA*- Δ *mecR1*- IS431 (C₂; C₁'e göre *mecR1* üzerinden daha büyük bir penisilin bağlayıcı alan delesyonu içermektedir)

Sınıf D: IS431- *mecA*- Δ *mecR1* (*mecR1*'in penisilin bağlayan alan delesyonu)

Sınıf E: IS431- *mecA*- Δ *mecR1* (*mecR1*'in 976 bp'lik membran-aralayıcı alanının delesyonu)



Şekil 3: Stafilokoklardaki *mec* geni sınıfları [69]

Stafilokoklarda metisilin direncine yol açan diğer mekanizmalar; PBP4'ün aşırı yapımı, PBP2 ve PBP4'te meydana gelen nokta mutasyonları ile aşırı beta-laktamaz üretimidir [68].

Stafilokoklarda metisilin direnci fenotipik olarak iki farklı biçimde karşımıza çıkabilmektedir:

Homojen direnç; kültür ortamındaki tüm bakterilerin direnç genini eksprese ettiği durumda görülen dirençtir.

Heterojen direnç; *mecA* geni taşıyıp metisiline dirençli olduğu halde fenotipik olarak metisiline duyarlı gibi görülen alt popülasyonun bulunduğu durumdur. Heterojen direnç 10^4 - 10^8 bakteriden birinde direncin olması durumudur. Üç ayrı sınıfı vardır:

Sınıf 1 heterojen direnç; 10^6 - 10^8 bakteriden birinde direnç bulunur.

Sınıf 2 heterojen direnç; 10^4 - 10^5 bakteriden birinde direnç vardır.

Sınıf 3 heterojen direnç; 10 - 10^3 bakteriden birinde direnç bulunur.

Stafilokoklarda metisilin heterojen direnci, homojen dirençten daha sık olarak görülmektedir. Saptanması ise daha güç olmaktadır. Bunun nedeninin; *mecA* dışındaki düzenleyici genetik elemanların mutasyonu olabileceği düşünülmektedir.

Heterojen suşlardaki bakterilerin büyük çoğunluğu düşük düzey beta-laktam konsantrasyonlarına duyarlıdır. Beta-laktam antibiyotik varlığında yüksek dirençli klonlar seçilir. Bu klonlar 50 – 100 µg/ml metisilin konsantrasyonlarında üreyebilen yüksek dirençli hücrelerin homojen popülasyonundan meydana gelir [71].

Rutin üretim koşullarında heterojen suşların ortaya konulması için besiyerine otolizinleri inhibe eden NaCl eklenebilir [72]. Ayrıca heterojen direnç ekspresyonu 30 – 35 °C'de daha fazladır. Ozmolarite, sıcaklık, besiyeri içeriği gibi dış faktörler metisilin direncinin düzeyini etkilemektedir.

Sonuçta hem genotipik özellikler hem de çevre şartları ile çok değişken olarak karşımıza çıkan heterojen direnç nedeniyle; dirençli bakterinin fenotipik olarak duyarlı bulunması tedavi başarısızlıklarıyla sonuçlanmaktadır [71].

2.5.3.1. Metisilin Direncinin Düzenlenmesi

Metisilin direnci *mecA* geni ile kazanılırken, bu gen bölgesinin düzenlenmesi *mecR1* ve *mecI* gen bölgeleri ile sağlanır. Bu düzenleme sistemi, beta-laktamaz gen ekspresyonu düzenleyici genleri olan *blaR1* ve *blaI* ile sekans homolojisi gösterir. Ancak beta-laktamaz üretiminden farklı olarak; indüklenabilirliği yok sayılacak kadar azdır. PBP2a'nın bu kadar sıkı bir biçimde düzenlenmesinin sebebi aşırı PBP2a üretiminin bakteri için öldürücü olmasıdır [73].

S.aureus'ta metisilin direncinin düzenlenmesinde ayrıca *fem* (factors essential for resistance to methicillin) gen serisinin de rolü büyüktür. Ancak bu düzenleyici gen bölgelerinin KNS'lerde bulunmadığı bilinmektedir [74].

2.5.3.2. Metisilin Direncinin Belirlenmesinde Kullanılan Laboratuvar Yöntemleri

2.5.3.2.1 Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında stafilokoklarda metisilin direnci; disk difüzyon ve antibiyotik dilüsyon yöntemleri kullanılarak belirlenebilir. Bu yöntemler, kolay yapılabilen ve ucuz yöntemler olması nedeniyle sıklıkla kullanılır. Ancak stafilokoklardaki metisilin direncinin heterojen niteliği nedeniyle saptanması zaman zaman yanlışlıklara neden olmaktadır [75]. Geçmişte beta-laktamazlara dayanıklı penisilinlere direnç saptanması için disk difüzyon yönteminde sıklıkla metisilin kullanılmaktaydı. Oysa günümüzde metisilin yerini oksasilin diskine (1 µg) bırakmıştır. Metisilin yerine oksasilin diskinin tercih nedeni, saklama sırasındaki koşullara daha dayanıklı olması ve heterojen dirençli stafilokok suşlarını belirleme olasılığının daha fazla olmasıdır. Bu nedenle günümüzde metisilin direncinin belirlenmesinde oksasilin kullanılsa da, tarihi değeri ve alışkanlıklar sonucunda oksasilin dirençli/duyarlı izolatlar için metisilin dirençli/duyarlı tanımları yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca CLSI; 2004 yılından bu yana önerilerinde sefoksitin (30 µg) disk difüzyon yönteminin, *mecA* geni ile bağlantılı stafilokokal metisilin direncini saptamak için kullanılabileceğini belirtmektedir [76].

S.aureus'larda metisilin direncinin belirlenmesinde hızlı olarak oksasilin agar tarama testi kullanılabilir. Oksasilin agar tarama testi ile MRSA izolatlarının % 98 – 100

oranlarında saptandığı belirtilmektedir [77]. Ancak KNS’lerde metisilin direncini göstermek için kullanılan hızlı bir tarama testi henüz bulunmamaktadır [76].

Bunların dışında MİK belirlenmesi için yapılan mikrodilüsyon ve agar dilüsyon yöntemleriyle de bakterilerin antimikrobiyallere karşı olan duyarlılığı saptanabilmektedir. Rutin laboratuvarlarda uygulanması emek yoğun olan bu yöntemlere, disk difüzyon sonuçlarının şüpheli olduğu ya da laboratuvar olarak duyarlı görünen antibiyotik ile tedaviye klinik yanıtın olmadığı durumlarda başvurulmaktadır.

KNS’lerde metisilin direnci saptanmasına yönelik CLSI’nin önerdiği standart uygulamalar Tablo 8’de yer almaktadır.

Tablo 8: CLSI’ye göre KNS’lerde metisilin direnci saptama yöntemleri [76]

YÖNTEM	TESTİN YAPILIŞI					DEĞERLENDİRME
	Besiyeri	Antibiyotik	İnokulum miktarı	İnkübasyon sıcaklığı ve süresi	NaCl içeriği	KNS’ler için
<i>Disk Difüzyon</i>	MHA	1 µg oksasilin diski	0.5 McFarland/direkt koloni süspansiyonu	35°C Normal atmosfer, 24 saat	Yok	≤ 17mm (Dirençli) ≥ 18mm (Duyarlı)
	MHA	30 µg sefoksitin diski	0.5 McFarland/direkt koloni süspansiyonu	35°C Normal atmosfer, 24 saat	Yok	≤ 24mm (Dirençli) ≥ 25mm (Duyarlı)
<i>Mikrodilüsyon</i>	Kasyon eklenmiş MHBY	Oksasilin seri dilüsyonları	5x10 ⁵ koloni/ml direkt koloni süspansiyonu	35°C Normal atmosfer, 24 saat	% 2	≥ 0.5 µg/ml (Dirençli) ≤ 0.25 µg/ml (Duyarlı)
<i>Agar Dilüsyon</i>	MHA	Oksasilin seri dilüsyonları	10 ⁴ koloni/ml direkt koloni süspansiyonu	35°C Normal atmosfer, 24 saat	% 2	≥ 0.5 µg/ml (Dirençli) ≤ 0.25 µg/ml (Duyarlı)
<i>Tuz agar tarama (sadece S.aureus için)</i>	MHA	6 µg/ml oksasilin	0.5 McFarland/direkt koloni süspansiyonu	35°C Normal atmosfer, 24 saat	% 4	KNS’ler için önerilmemektedir

MHA: Mueller Hinton Agar, MHBY: Mueller Hinton Besiyeri (sıvı)

2.5.3.2.2 Aglutinasyon Testleri

Son yıllarda PBP 2a’nın varlığını saptayarak MRSA’ların belirlendiği lateks aglutinasyon kitleri geliştirilmiştir [78, 79]. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile *mecA* varlığının tespiti ile karşılaştırıldığında bu testlerin MRSA saptaması açısından duyarlılığının % 98.5 ve seçiciliğin % 100 olduğu bildirilmektedir [80].

2.5.3.2.3 Moleküler Yöntemler

MRSA izolatlarını saptamada moleküler yöntemler en duyarlı yöntemlerdir. Bunlar içinde DNA hibridizasyonu ve PCR yer almaktadır. Her iki yöntemin *mecA*'yı saptama duyarlılığı ve seçiciliği % 100'dür. Uygulama kolaylığı açısından PCR günümüzde tercih edilen ve altın standart olarak kabul edilen yöntemdir [67, 73].

2.5.3.2.4 MR-KNS İnfeksiyonunda Kullanılabilecek Antibiyotikler

Stafilokoklarda metisilin direnci söz konusu olduğunda yaygın klinik yaklaşım bir glikopeptid antibiyotik seçimi olmaktadır. Oysa glikopeptid antibiyotikler dışında seçilebilecek antibiyotikler mevcuttur. Glikopeptid antibiyotikler, çoklu antibiyotik dirençli stafilokokal infeksiyonlarda tek seçenek gibi gözüktse de ideal bir antimikrobiyal ajan olmaktan uzaktır. Bunun birçok nedeni yapılan farmako-kinetik çalışmalarda gösterilmiştir. Bunlardan ilki; yapıcı büyük moleküller olan glikopeptidler stafilokoklara yavaş bakterisidal etki ederler. Bunun dışında serebrospinal sıvıya geçişleri, santral sinir sistemi infeksiyonu durumunda bile yeterli değildir. Bu nedenle menenjitli olgularda yüksek dozlar verilmek zorundadır. Bunun yanında glikopeptidler potansiyel nefrotoksik ajanlardır ve özellikle vankomisin hızlı infüzyonu semptomatik histamin salınımına neden olur ("kırmızı adam sendromu"). Bunca olumsuz yanlarına karşın glikopeptidler çoklu dirençli stafilokokal infeksiyonlarda günümüze kadar başarı ile kullanılagelmiştir [81].

Vankomisin, 1958 yılında kullanıma giren ilk glikopeptid antibiyotiktir. Bunu 1984 yılında teikoplaninin kullanıma girmesi izler. KNS'lerde vankomisin direnci; vankomisin dirençli *S.aureus*'tan çok önce, ilk kez 1983 yılında bildirilmiştir. Ancak bu güne kadar bildirilen olgu sayısı 10'u geçmemektedir. KNS'lerdeki vankomisin direnç mekanizması bu güne kadar tam olarak açıklanamamıştır. Bilindiği gibi *S.aureus*'larda vankomisin direnci iki mekanizma ile görülmektedir. Bunlardan ilki *agr* gen bölgesinin seri mutasyonları sonucu, hücre duvar öncüllerinin aşırı sentezlenip, duvar kalınlığını arttırması ve vankomisin de bu öncüllere bağlanıp tüketilmesi ile olur Bu mekanizma ile ilk vankomisine orta duyarlılıktaki *S.aureus* (VISA) suşları 1998'de tanımlanmıştır [82]. Diğer bir mekanizma ise enterokoklarda vankomisin direncini sağlayan *vanA* geninin *S.aureus*'a aktarılması ile oluşan vankomisin direncidir. Bu direnç tipi 2002 yılında

bildirilmiş olup yüksek düzey vankomisin direncinden sorumludur [83]. KNS'lerde ise henüz *vanA* ile ilgili bir direnç gösterilmemiştir.

Türkiye'de tezin yazıldığı tarih itibarıyla henüz VRSA tanımlanmamıştır. Ancak 2005 yılında Torun ve arkadaşları, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahpaşa Hastanesinde iki VISA suşunun klinik izolatlardan elde edildiğini bildirilmişlerdir [84].

KNS'lerde glikopeptid direncinin; değişmiş duvar öncüllerinin üretilmesi, ayrıca peptidoglikan tabakadaki çapraz bağlantıların duyarlı suşlara göre farklı olması ve bu durumda vankomisinin hedef bölgesine bağlanmasının engellenmesi ile geliştiği öne sürülmektedir [85].

Stafilokoklarda glikopeptid direnci de heterojenite göstermektedir. Özellikle teikoplanine karşı dirençli suşların vankomisine karşı duyarlı olabilecekleri bildirilmektedir. Ayrıca KNS'ler arasında glikopeptid direnci türe özgü özellik göstermektedir. Glikopeptid direnci gösteren başlıca iki tür *S.epidermidis* ve *S.haemolyticus*'tur. Yapılan in vitro prevalans çalışmalarında *S.epidermidis* için vankomisin direnci % 0.03 – 0.5 arasında bulunmakta iken, *S.haemolyticus* için ise bu oran % 5 – 42'lere kadar ulaşmaktadır [85].

Fusidik asit, rifampisin, kloramfenikol ve siprofloksasin gibi antibiyotiklerin MRSA infeksiyonlarında potansiyel etkinlikleri bilinmektedir [86, 87]. Ancak metisilin direnci çoklu antimikrobiyal direncinin bir işareti olarak kabul edilmektedir. Bu bir bakıma direnç genlerinin suşlar arasında genetik materyaller ile yayıldığını ve bu genetik materyalin birden fazla antibiyotiğe karşı direnç genleri taşıdığı düşüncesini ortaya koymaktadır. Hastane kökenli infeksiyonlardan sıklıkla çoklu antibiyotik direnci olan stafilokoklar izole edilmektedir [88].

1997–1999 yılları arasında yapılan çok merkezli antimikrobiyal surveyans çalışmasında içlerinde Türkiye'nin de bulunduğu 13 Avrupa ülkesinden toplanmış 1512 MR-KNS izolatında yapılan mikrodilüsyon ile direnç saptama yöntemine göre elde edilen sonuçlar Tablo 9'da özetlenmiştir [89].

Tablo 9: MR-KNS suşlarının diğer antibiyotiklere karşı duyarlılık durumu [89].

<i>Antibiyotikler</i>	<i>Gentamisin</i>	<i>Siprofloksasin</i>	<i>Gatifloksasin</i>	<i>Eritromisin</i>	<i>Klindamisin</i>	<i>Kloramfenikol</i>	<i>Rifampisin</i>	<i>Tetrasiklin</i>	<i>Teikoplanin</i>	<i>Vankomisin</i>
KNS suşlarının uygulanan antibiyotiklere duyarlılık durumu (%)	37,9	44,9	92,1	26,7	51,3	73,9	81,9	76,5	97,9	100

Bu çalışmada MR-KNS izolatlarının yarısından fazlası klindamisine, yaklaşık dörtte üçü kloramfenikole ve tetrasikline, beşte dördünden fazlası da rifampisine duyarlı bulunmuştur. Yeni bir florokinolon olan gatifloksasinde ise duyarlılık neredeyse glikopeptid antibiyotiklere yakın ve % 92 olarak bulunmuştur. Bu bulgular özellikle rifampisin ve gatifloksasinin MR-KNS infeksiyonlarında kullanılabileceğinin bir göstergesidir [89].

Bunlar dışında tetrasiklinin semi-sentetik türevleri olan ve yeni bir antibiyotik grubu olarak gösterilen oksazolidonlardan linezolid; MRSA infeksiyonlarında seçilebilecek diğer bir antibiyotiktir. Genel olarak bakteriyostatik ajanlar olan oksazolidonların KNS suşları için etkileri vankomisin ile benzer bulunmuştur [87].

Streptogramin olarak adlandırılan quinupristin/dalfopristin kombinasyonu da MR-S infeksiyonlarında seçilebilecek bir ajandır. Bu kombinasyon stafilokoklar için bakterisidal olup vankomisin ile kombinasyon tedavilerinin sinerjistik etki gösterdiği belirtilmektedir [81].

Yeni bir glikopeptid antibiyotik olan vankomisin analogu oritavancin; MR-S infeksiyonları için yeni bir umut olmuştur. MİK değerleri vankomisine benzese de, vankomisine göre daha hızlı bakterisidal olduğu bildirilmektedir [87].

Bunların dışında yeni kinolonlardan travofloxacin, clinafloxacin ve olamufloxacin MR-S infeksiyonlarında kullanılabilmektedir. Hızlı bakterisidal olan ve tüm vücut dokularına iyi dağılan bu grup antibiyotiklerin stafilokokal bakteriyemi, endokardit ve osteomyelit gibi infeksiyonlarda kullanılabileceği bildirilmektedir [87].

Stafilokoklarda antimikrobiyal direnç mekanizmaları ve ilgili oldukları genler Tablo 10’da özetlenmiştir.

Tablo 10: Stafilokoklarda antibiyotik direnç mekanizmaları [90]

Antibakteriyel sınıf	Direnç mekanizması ve ilgili gen(ler)
β-laktamlar	β -laktamaz; Düşük afiniteli PBP 2', <i>mecA</i> (bir çok metisilin dirençli suşta); Diğer PBP’lerde değişiklikler
Glikopeptid	D-alanil-Dalaninin fazla üretimi (nadir GISA* fenotipinde); D-alanil-D-laktat içeren peptidoglikan öncülleri, <i>vanA</i> (çok nadir)
Aminoglikozit	Aminoglikozit modifiye edici enzim, <i>aac</i> , <i>aph</i> , <i>ant</i> gen ailesi
Makrolitler, Linkosamidler, Streptogramin B ve Ketolidler	23S rRNA metilaz, <i>erm(A)</i> , <i>erm(C)</i> , ve diğer <i>erm</i> ’ler (MLS _B fenotipi); Aktif dışarı atım pompası, <i>msr(A)</i> ; Makrolit fosfotransferaz <i>mph(C)</i> ; Linkozamid nükleotidil transferaz <i>lnu(A)</i>
Streptogramin kombinasyonları	Streptogramin A asetiltransferaz, <i>vat(A)</i> , <i>vat(B)</i> , <i>vat(C)</i> ; Streptogramin A dışarı atım pompası, <i>vga(A)</i> , <i>vga(B)</i> ; Streptogramin B liyaz <i>vgb(A)</i> , <i>vgb(B)</i> (hepsi çok nadir)
Florokinolonlar	Topoizomeraz IV (<i>perC-perE</i>) ve DNA giraz’da (<i>gryA-gryB</i>) mutasyonlar; Aktif dışarı atım pompası, <i>norA</i>
Oksazolidonlar	G2576T 23S rDNA mutasyonu (nadir)
Kloramfenikol	Kloramfenikol asetiltransferaz, <i>cat</i>
Tetrasiklin	Aktif dışarı atım pompası, <i>tet (K)</i> , <i>tat (L)</i> Ribozomal koruma <i>tet (M)</i> , <i>tet (O)</i>
Rifampisin	Kromozomal mutasyonlar, <i>rpoB</i>
Trimetoprim	Kromozomal mutasyonlar, <i>dfrA</i> , <i>dfrD</i>
Fusidik asit	Kromozomal mutasyonlar <i>fusA</i> ; Geçirgenlikte azalma; inaktivasyon; effluks pompası
Mupirosin	Kazanılmış izölösil tRNA sentaz, <i>mupA</i> (yüksek düzey direnç) Kromozomal mutasyonlar, <i>ileS</i> (düşük düzey direnç)

*GISA: Glikopeptid orta duyarlı *S.aureus*.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Nisan 2005 ile Eylül 2005 tarihleri arasında hastanemizde yatan hastaların kan kültürlerinden soyutlanan 183 adet KNS izolatu çalışmaya alındı. Alınan bu KNS izolatlarının elde edildiği hastaların kayıtları incelendi. Hastanın yatışından 72 saat sonra alınan kültürlerden elde edilen izolatlar hastane kökenli olarak kabul edildi. Buna göre 183 KNS izolatının 156'sı hastane kaynaklı olduğu belirlendi. Ayrıca aynı hastanın birden fazla örneği olması nedeniyle farklı izolatlarla çalışmak amacı ile toplam 51 izolat aynı hastadan elde edildikleri için çalışma dışı bırakıldı. Sonuç olarak istenilen ölçütlere uygun 105 izolat çalışmaya uygun kabul edildi. Tüm bakteriler testlerin çalışılacağı tarihe kadar -70°C'de gliserollü beyin-kalp infüzyon sıvı besiyerinde saklandı.

3.1. Koagülaz Negatif Stafilokokların Eldesi ve Tanımlanması

Dokuz Eylül Üniversite Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda kan kültürü şişeleri, rutin olarak Bactec 9240 otomatize kan kültürü cihazına (Becton-Dickinson) konulmakta ve cihaz pozitif uyarısını verene kadar en fazla 7 gün olacak şekilde inkübe edilmektedir. Pozitif kan kültürleri Gram boyama ile değerlendirildikten sonra % 5'lik koyun kanlı agar ekimi yapılmakta ve 35°C'de 24 saat inkübe edilmektedir. KNS tanımı; koloni morfolojisi, Gram boyama özellikleri, pozitif katalaz testi ve negatif tüp koagülaz testi ile yapılır. Antibiyotik duyarlık testleri CLSI önerilerine uyularak disk difüzyon tekniği ile belirlenmektedir.

Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan yukarıda belirtildiği şekilde tanımlanan KNS'ler alındı. Gram boyaları, katalaz testi, tüp ve lam koagülaz testleri tekrarlandı.

3.2. Kullanılan Standart Suşlar

Yapılan tüm çalışma boyunca sonuçlar standart suşlar ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. MS-KNS'leri karşılaştırmak için; *S.epidermidis*-ATTC 12228, MR-KNS'lerdeki metisilin direncini karşılaştırmak için ise; *S.aureus*-ATTC 43300 (MRSA) standart suşları kullanılmıştır. *S.aureus*-ATTC 43300 suşu ayrıca koagülaz testi için pozitif kontrol suş olarak kullanılmıştır.

3.3. Antibiyotik duyarlılık testleri

Metisiline dirençli ve duyarlı KNS suşlarının saptanması; standart suşlar ile karşılaştırmalı olarak aşağıda belirtilen yöntemlerle sağlanmıştır:

3.4 Disk difüzyon testi: oksasilin diski (1 µg) ile ve sefoksitin diski (30 µg) ile.

3.5. Agar dilüsyon ile oksasilin MİK değeri belirlenmesi.

3.6. PCR ile metisilin direncini oluşturan *mecA* geni saptanması.

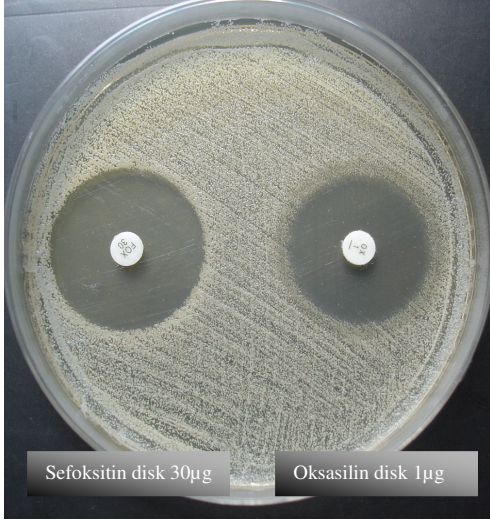
3.4. Disk difüzyon testi

Bakteri kültüründen alınan koloniler ile serum fizyolojik içerisine 0,5 McFarland bulanıklığına eşit olacak şekilde direkt koloni süspansiyonu yapıldı. Bu süspansiyon MHA besiyeri üzerine eküvyon yardımı ile yayılarak ekildi. Besiyeri kuruduktan sonra plağa aralarında en az 2 cm kalacak şekilde 1 µg'lık oksasilin ve 30 µg'lık sefoksitin diski yerleştirildi. Plaklar 35°C'de 24 saat süre ile inkübasyondan sonra zon çapları değerlendirildi (Resim 4-5). Bu değerlendirilmeye göre izolatların dirençlilik durumları CLSI'nin referans değerlerine göre gruplandırıldı. CLSI'nin stafilokoklarda kabul ettiği, sefoksitin ve oksasilin için zon çapları Tablo 11'de belirtilmiştir. Buna göre oksasilin disk zon çapı ≤ 17 mm olan izolatlar oksasiline dirençli, ≥ 18 mm olan izolatlar ise duyarlı kabul edildi. Sefoksitin diski için zon çapı ≤ 24 mm olan izolatlar sefoksitine dirençli, ≥ 25 mm olanlar ise duyarlı kabul edildi [76].

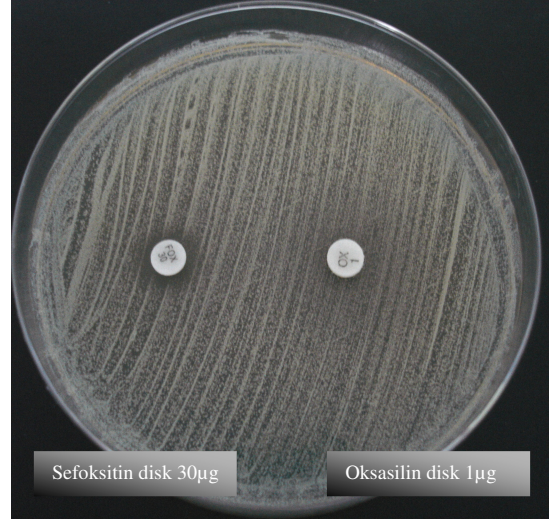
Tablo 11: KNS'lerde disk difüzyon yöntemleri ile metisilin direnci saptanması için CLSI önerileri

Bakteriler	Antibiyotik	Zon çapı (mm)			Eşdeğer MİK Sınır Değeri (µg/ml)	
		Dirençli	Orta Duyarlı	Duyarlı	Dirençli	Duyarlı
KNS'ler (<i>S.lugdunensis</i> dışında)	Oksasilin	≤ 17	-	≥ 18	$\geq 0,5$	$\leq 0,25$
	Sefoksitin	≤ 24	-	≥ 25	*	*
<i>S.aureus</i> ve <i>S.lugdunensis</i>	Oksasilin	≤ 10	11-12	≥ 13	≥ 4	≤ 2
	Sefoksitin	≤ 19	-	≥ 20	*	*

* Sefoksitin için MİK değeri saptanması önerilmemektedir



Resim 4: Oksasiline ve sefoksitine duyarlı KNS izolatu



Resim 5: Oksasiline ve sefoksitine dirençli KNS izolatu

3.5. Agar Dilüsyon Testi ile Oksasilin MİK Değerinin Saptanması

Agar dilüsyon ile MİK değerlendirilmesi CLSI'nin agar dilüsyon yöntemine uygun olarak gerçekleştirildi [76].

3.5.1. Agar Dilüsyon Plaklarının Hazırlanması

% 100 potense sahip Oksasilin toz (Fluka 28221) CLSI önerileri doğrultusunda steril distile su ile sulandırıldı. Sulandırma şeması Tablo 12'de belirtilmiştir.

Tablo 12: Agar dilüsyon testinde kullanılacak oksasilinin sulandırım şeması [91]

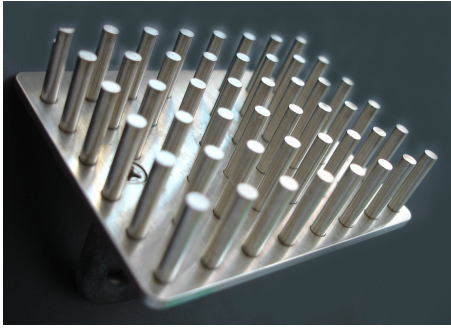
Adım	Kaynak	Konsantrasyon (µg/ml)	Hacim (ml)	KAMHA* hacim (ml)	Son konsantrasyon (µg/ml)
Stok	-	5120	10	-	-
1	Stok	5120	2	18	512
2	Adım 1	2560	2	18	256
3	Adım 2	1280	2	18	128
4	Adım 3	640	2	18	64
5	Adım 4	320	2	18	32
6	Adım 5	160	2	18	16
7	Adım 6	80	2	18	8
8	Adım 7	40	2	18	4
9	Adım 8	20	2	18	2
10	Adım 9	10	2	18	1
11	Adım 10	5	2	18	0.5
12	Adım 11	2.5	2	18	0.25
13	Adım 12	1.25	2	18	0.125
14	Adım 13	0.625	2	18	0.0625

* KAMHA: Katyonu ayarlanmış MHA

Öneriler doğrultusunda hazırlanacak olan agara % 2 NaCl (% 2: ağırlık/hacim) eklenildi [72]. MHA besiyeri otoklavdan alındıktan sonra 45°C'lik su banyosunda antimikrobik ilaç eklenmek üzere bekletildi. Agarın pH'ı, pH ölçer ile değerlendirilerek 7.2–7.4 arasında olduğu belirlendi. Antibiyotik sulandırmaları dağıtılmadan önce ana besiyerinden ayrılmak üzere birkaç adet kontrol plağı döküldü. Su banyosunda bekletilen MHA besiyeri 45°C sıcaklığa gelince Tablo 12'de belirtildiği şekilde hazırlanmış steril antibiyotik sulandırmalarından antibiyotikli solüsyon/besiyeri oranı 1/10 olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan karışım petri kutularına iyice karıştırılarak ve agar derinliği 3-4mm olacak şekilde döküldü. Böylece plaklardaki antibiyotik dilüsyonu Tablo 12'de belirtildiği gibi sağlanmış oldu. Agar oda ısısında donmaya bırakıldı ve tamamen donduktan sonra aynı gün içerisinde kullanılmayacak olanlar +8°C olan buzdolabında saklandı. Tüm plaklar 48 saat içerisinde kullanıldı. Buzdolabında saklanan plaklar çalışılmaya alınmadan önce kuruması için 35°C'lik etüv içerisinde 30 dakika kapakları aralanmış olarak bekletildi.

3.5.2. İnokulum Hazırlanması

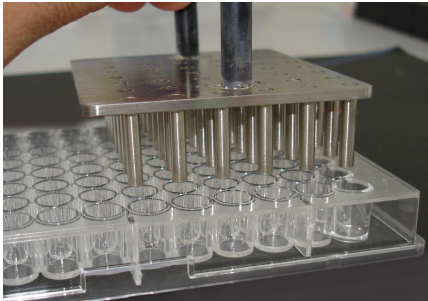
Agar dilüsyon yöntemi için standardize inokulum; steril cam tüplerde 0,5 McFarland bulanıklığına eşit olacak şekilde serum fizyolojik içerisine doğrudan koloniden süspansiyon yöntemi ile hazırlandı. Kullanılacak replikatörün besiyerine değme çapı 3mm olduğundan, önerildiği üzere; agar yüzeyindeki son inokulum 10^4 CFU olacak şekilde hazırlanan süspansiyon 1/10 oranında steril serum fizyolojik ile sulandırıldı. Bu süspansiyon 3 mm çaplı replikatör (Sigma Aldrich R2383-1EA) (Resim 6) ile plaklara dağıtıldı.



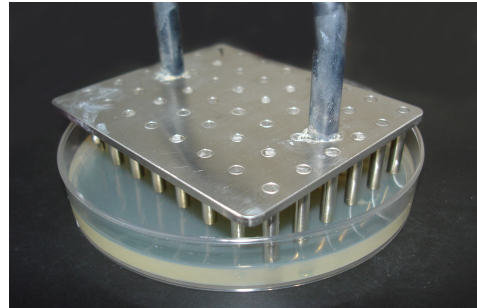
Resim 6. Sigma Aldrich R2383-1EA 3mm çaplı bakteri replikatörü (8x6 sıralı)

3.5.3. Agar Dilüsyon Plaklarının İnokülasyonu

Elde edilen süspansiyonlar Resim 7’de gösterilen mikrodilüsyon kuyucuklarına dağıtıldı. Steril edilmiş replikatör kuyucuklara uyacak şekilde plağın üzerine bırakıldı. Önce üreme kontrol plağına (antibiyotik içermeyen plak) inoküle edildi. En düşük konsantrasyondaki ($0,0625\mu\text{g/ml}$) plaktan başlanmak üzere giderek artan konsantrasyondaki plaklara sırası ile inokülasyon yapıldı (Resim 8). En son, önemli bir miktar antibiyotiğin taşınıp taşınmadığından emin olmak için, ikinci bir kontrol plağına inokülasyon yapıldı.



Resim 7: Mikrodilüsyon plağından bakterilerin alınması



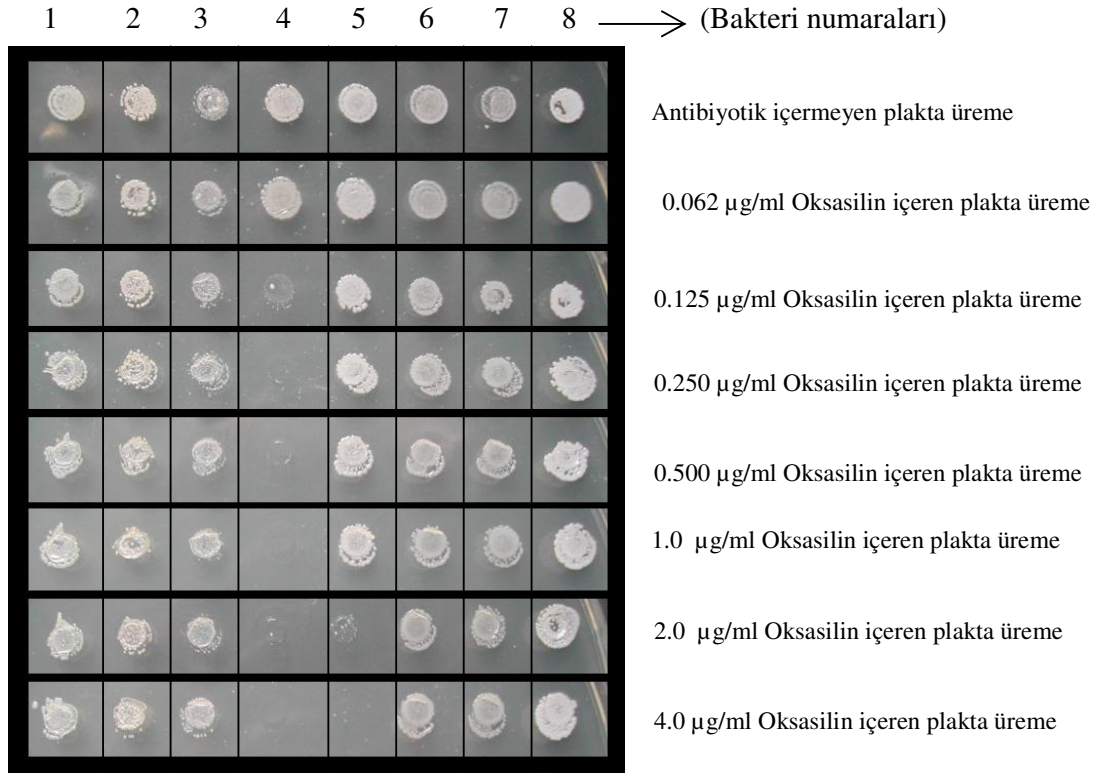
Resim 8: Antibiyotikli agarlara bakterilerin ekilmesi

3.5.4. Agar Dilüsyon Plaklarının İnkübasyonu

İnoküle edilen plaklar oda sıcaklığında inokulum noktaları agara absorbe olana kadar 20 dakika bekletildi. Plaklar ters döndürülerek 35°C’de 24 saat inkübe edildi.

3.5.5. Agar Dilüsyon Son Noktaların (MİK) Belirlenmesi (Resim 9)

Plaklar son noktaların belirlenmesi amacı ile siyah zemin üzerine yerleştirildi. Üremenin gözlenmediği en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK olarak kaydedildi. Tek bir koloni ya da inokulumun neden olduğu üreme benzeri izler dikkate alınmadı. Belirlenen MİK değerinden daha yüksek konsantrasyonlarda üreme gözlenildiğinde test tekrarlandı.



Resim 9: Agar dilüsyon yöntemi ile MİK değerlerinin belirlenmesi

Açıklama: MİK değerlendirilmesinin nasıl yapıldığını örneklemek üzere 8 KNS izolatu fotoğraflanarak tablollaştırılmıştır. Her bir sütun bir bakterinin değişik dilüsyonlardaki üreme durumunu gösterir. Dört numaralı sütundaki bakterinin 0.125 µg/ml oksasilin içeren plakta sadece tek koloni üremesi gözlenmektedir. Tek koloni üremesi ihmal edildiği için bu bakterinin oksasilin için MİK değeri 0.125 µg/ml olarak kabul edilmiştir. Beşinci sütunda görülen bakterinin 2.0 µg/ml oksasilin içeren plakta az da olsa üremesi mevcuttur. Ancak 4.0 µg/ml oksasilin içeren plakta üremesi tamamen kaybolmuştur. Bu nedenle 5. bakterinin oksasilin için MİK değeri 4.0 µg/ml olarak değerlendirilmiştir.

3.6. PCR ile Metisilin Dirençli KNS Saptanması

PCR uygulayabilmek için öncelikle bakteri kolonilerinden DNA eldesi için akromopeptidaz yöntemiyle DNA ekstraksiyonu yapıldı.

3.6.1. Akromopeptidaz Yöntemi ile DNA Ekstraksiyonu [92]

Kullanılacak çözeltiler:

- i. Akromopeptidaz (Sigma A 3547): 10 U/ μ l olacak şekilde sulandırıldı ve -20°C’de saklandı.
- ii. NET tamponu: 10 mM NaCl + 1 mM EDTA +10 mM Tris tamponu oda sıcaklığında saklandı.

100 μ l net tamponu, 10 μ l akromopeptidaz çözeltisi (10U/ μ l) ile mikrosantrifüj tüpünde karıştırıldı. İçerisine iki-üç KNS kolonisi ezilerek karıştırıldı. Tüpler 50°C’ye ayarlanmış su banyosunda 30 dakika bekletildi. Oda sıcaklığına gelen karışım doğrudan amplifikasyon için kullanıldı.

3.6.2. *mecA* PCR için Gerekli Malzemeler

Tamponlar:

10X TBE:

108 gr Tris (Applichem A 2264) ile 55 gr borik asit (Sigma B 6768) 900 ml distile su içinde çözüldü. 40 ml 0.5 M Na₂EDTA (pH 8.0) eklendi ve hacim bir litreye su ile tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

Jel Yükleme Tamponu (6X):

% 0.25 bromfenol mavisi (Sigma B 5525- % 10’luk stok)	0.75 ml
% 0.25 xylene cyanol FF (Sigma X 4126 - % 5’lik stok)	1.5 ml
% 30 gliserol (Su içindeki karışım)	9 ml
Distile su	18.75 ml

Diğer Malzemeler:Etidyum Bromid (1000 X, 5 mg/ ml):

Etidyum bromid (Sigma E 8751)	0.5 gr
Distile su	100 ml

dNTP Karışımı (Fermentas – 100mM):

10 µl dATP, 10 µl dGTP, 10 µl dCTP, 10 µl dTTP, 160 µl TE buffer içinde karıştırıldı. dNTP karışım son dilüsyon her birinden 5mM olacak şekilde hazırlandı.

10X Taq Buffer (Fermentas EPO 402)25 mM MgCl₂ (Fermentas EPO 402)Taq Polimeraz (Fermentas EPO 402)50 bp DNA ladder (Fermentas SM 0371)Agaroz (Sigma A 9539)

Primerler: *mecA* PCR işlemi için *mecA* genine özgü Tablo 13'te gösterilen forward ve revers primerler [93] kullanılmıştır (İontek Moleküler Biyoloji Sentez Laboratuvarı, İstanbul).

Tablo 13: *mecA* primerleri [93]

Primerler	Primer dizgileri (5' - 3')	Hazırlanan stok konsantrasyonları	Beklenen ürün büyüklüğü (bp)
<i>mecA</i> -1	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C	32 pmol/µl	533
<i>mecA</i> -2	AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C	27.4 pmol/µl	

3.6.3. *mecA* PCR Uygulanması

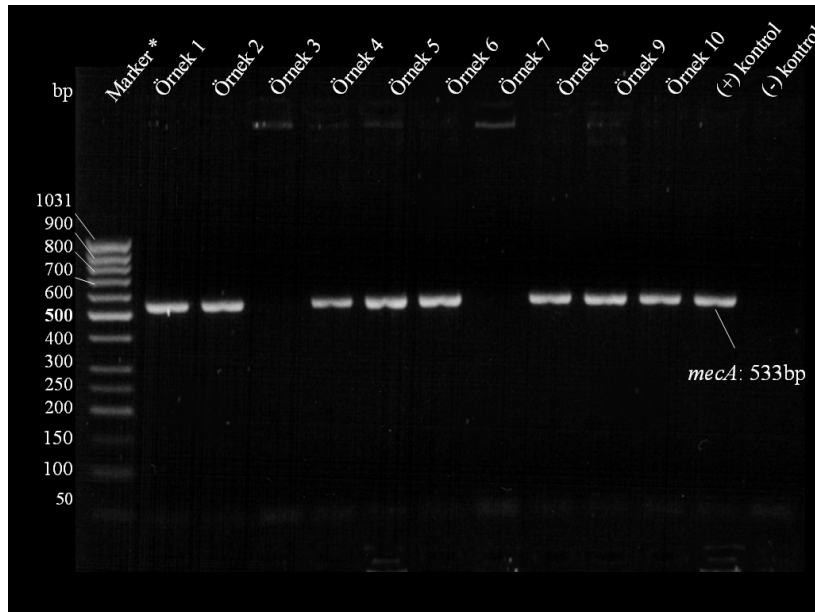
Çalışılacak her suş için ana karışım (master mix): 3mM MgCl₂, 200mM dNTP, 2,5 ünite Taq polimeraz enzimi, 12 µl steril distile su, 54,8 pmol *mecA*1 ve 64 pmol *mecA*2 primerlerinden oluşturuldu. Buz içerisinde bekletilen bu karışıma 2 µl DNA ekstraktı eklenerek *mecA* için seçilen ısı-döngü (thermal cycler) programı ile PCR işlemi başlatıldı.

Kullanılan PCR Programı

Ön denatürasyon	94°C	2 dakika	
Denatürasyon	94°C	30 saniye	} Toplam 25 döngü olacak şekilde
Birleşme	55°C	30 saniye	
Uzama	72°C	1 dakika	
Son uzama	72°C	5 dakika	
	+4°C	∞	

3.6.4. Agaroz Jelin Hazırlanması ve Sonuçların Değerlendirilmesi

TBE tamponu (1X) içinde % 2'lik 50 ml agaroz jel hazırlandı. İçine 5 mg/ml konsantrasyondaki etidyum bromid çözeltisinden 2.5 µl eklendi. Karışım jel kalıbına döküldü. İki mikrolitre yükleme tamponu ile 10 µl PCR ürünü mikrosantrifüj tüplerinde karıştırıldı. Jelin ilk kuyucuğa belirleyici (marker) olarak DNA ladder (50 bp) ve sırasıyla diğer kuyucuklara ürünler aktarıldı. Elektroforez tankı 1X TBE tamponu ile dolduruldu. Jel, bu tank içinde 120 voltta 30 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Ardından sonuçlar ultraviyole aydınlatıcıda incelendi. Fotoğrafları çekilerek belgelendi. *mecA* için 533 bp ürün varlığı pozitif olarak değerlendirildi. Resim 10'da çalışılan ilk on örneğin *mecA* PCR sonuçları gözlenmektedir.



Açıklama: On örneğin çalışıldığı işlemde 3, 7 ve negatif kontrol örneklerinde *mecA* saptanmamış olup negatif olarak bulunmuştur.

Diğer örnekler pozitif kontrolde görüldüğü gibi *mecA* pozitifdir.

Resim 10: *mecA* PCR sonuçları:

4. BULGULAR

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Bakteriyoloji Laboratuvarına Nisan 2005 ile Eylül 2005 tarihleri arasında gönderilmiş kan kültürlerinden elde edilen 183 adet KNS izolatının istenilen kriterlere uygun olan 105 tanesi çalışmaya alındı. Bu 105 KNS izolatının 56 tanesi YBÜ'lerden, 27 tanesi dahili birimlerden 22 tanesi ise cerrahi birimlerden gönderilen kan kültürlerinden elde edildiği dosya bilgilerinden belirlendi. Tablo 14'te KNS izolatlarının geldikleri birimlere göre dağılımları görülmektedir.

Tablo 14: KNS'lerin geldiği kliniklere göre dağılımı

	<i>Yoğun bakımlar</i>	<i>Dahili Birimler</i>	<i>Cerrahi Birimler</i>	<i>Toplam</i>
Sayı	56	27	22	105
Yüzde	% 53,3	% 25,7	% 21	% 100

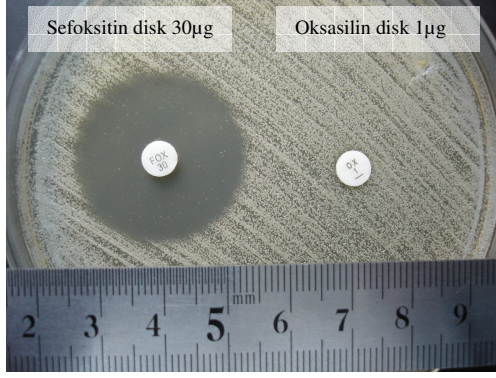
4.1. Oksasilin ve Sefoksitin Disk Difüzyon Testi Sonuçları

CLSI'nin önerileri doğrultusunda metisilin direncini göstermek için 1 µg oksasilin ve 30 µg sefoksitin disk difüzyon testleri uygulandı. Oksasilin ile yapılan disk difüzyon testine göre; 105 KNS izolatının 82'si (% 78.1) oksasilin dirençli, 23'ü (% 21.9) oksasilin duyarlı olarak bulundu. Sefoksitin ile yapılan disk difüzyonuna göre ise 105 KNS izolatının 80'i (% 76.2) sefoksitin dirençli, 25'i (% 23.8) sefoksitin duyarlı olarak bulundu. Disk difüzyon testi sonuçları Tablo 15'te özetlenmiştir.

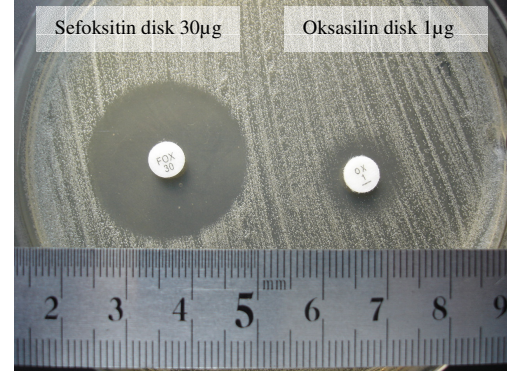
Tablo 15: Oksasilin ve Sefoksitin ile yapılan disk difüzyon sonuçları

<i>Uygulanan test</i>			
Oksasilin disk		Sefoksitin disk	
<u>Dirençli</u>	<u>Duyarlı</u>	<u>Dirençli</u>	<u>Duyarlı</u>
Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)
82 (78.1)	23 (21.9)	80 (76.2)	25 (23.8)

Bu iki disk difüzyon yöntemi ile çalışılan suşların iki tanesi sefoksitine duyarlı iken, oksasiline dirençli bulunmuştur. Bu iki örneğin disk difüzyon testi sonuçları Resim 11 ve 12’de gösterilmektedir.



Resim 11: On iki numaralı örneğin disk difüzyon testi sonucu



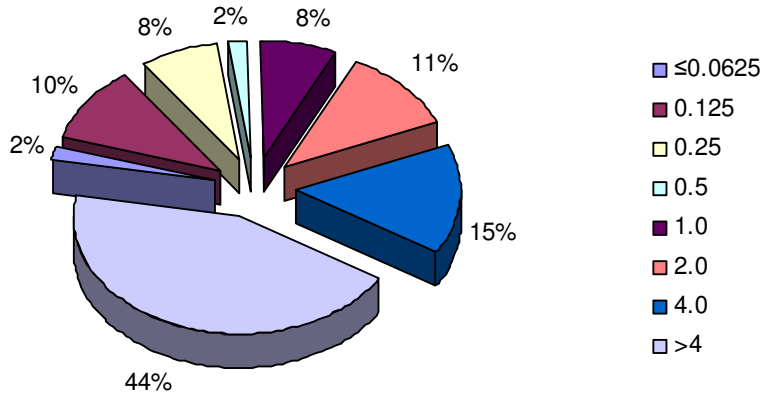
Resim 12: Seksen dört numaralı örneğin disk difüzyon testi sonucu

4.2. Agar Dilüsyon ile Oksasilin MİK Değeri Sonuçları

Çalışmaya alınan 105 KNS izolatının CLSI önerileri doğrultusunda agar dilüsyon yöntemi ile MİK değerleri saptanmıştır. Buna göre 46 izolatın MİK değeri $> 4 \mu\text{g/ml}$, 16 izolatın MİK değeri $4 \mu\text{g/ml}$, 12 izolatın MİK değeri $2 \mu\text{g/ml}$, sekiz izolatın MİK değeri $1 \mu\text{g/ml}$, iki izolatın MİK değeri $0.5 \mu\text{g/ml}$, sekiz izolatın MİK değeri $0.25 \mu\text{g/ml}$, on bir izolatın MİK değeri $0.125 \mu\text{g/ml}$ ve iki izolatın MİK değeri ise $\leq 0.0625 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. MİK değerlerinin sayısal dağılımları Tablo 16’da ve yüzde dağılımları Şekil 4’te izlenmektedir.

Tablo 16: KNS izolatlarının MİK değerlerine göre sayısal dağılımları

<i>MİK değerleri ($\mu\text{g/ml}$)</i>							
≤ 0.0625	0.125	0.25	0.5	1	2	4	>4
2	11	8	2	8	12	16	46
Metisiline duyarlı grup n:21 % 20				Metisiline dirençli grup n:84 % 80			



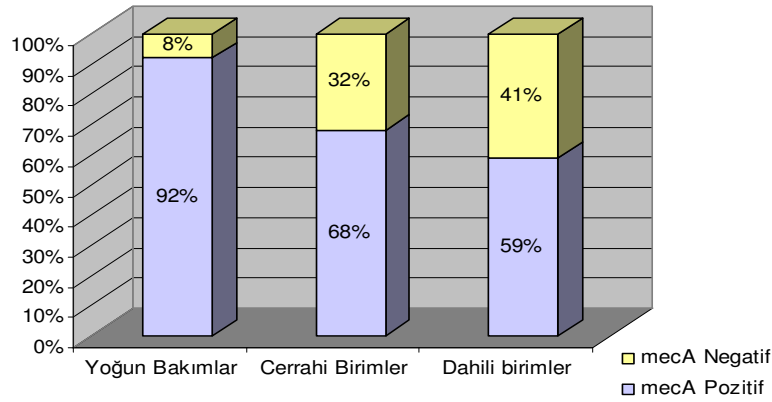
Şekil 4: KNS izolatlarının MİK değerlerine göre yüzdesel dağılımları

4.3. *mecA* PCR Sonuçları

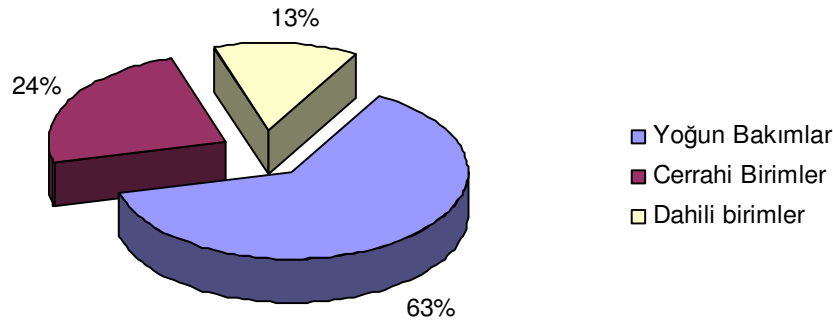
Çalışmaya alınan 105 KNS izolatının 83'ünde (% 79) PCR ile 533 baz çiftlik *mecA* geni saptanırken, 22 izolatta (% 21) saptanmamıştır. KNS izolatlarının *mecA* varlıklarının servislere göre dağılımları Tablo 17'de gösterilmiştir. YBÜ'lerden gelen 56 KNS izolatının 52'sinde (% 92), cerrahi birimlerden gelen 22 KNS izolatının 15'inde (% 62), ve dahili birimlerden gelen 27 KNS izolatının 16'sında (% 59) *mecA* geni saptanmıştır. Buna göre toplam MR-KNS'lerin % 63'ünün YBÜ'lerden, % 24'ünün Cerrahi birimlerden ve % 13'ünün dahili birimlerden gönderilen kan kültürlerinden izole edildiği belirlenmiştir. Birimler içerisindeki *mecA* pozitifliğinin yüzdesel dağılımları Şekil 5'te, MR-KNS'lerin birimlere göre dağılımı ise Şekil 6'da gösterilmiştir. Her bir izolatın *mecA* PCR sonuçları diğer bulgularla beraber Tablo 18'de özetlenmiştir.

Tablo 17: KNS izolatlarının *mecA* varlıklarının servislere göre dağılımları

		<i>mecA</i>		Toplam
		Pozitif (%)	Negatif (%)	
KNS'lerin izole edildiği klinikler	Yoğun Bakımlar	52 (92)	4 (8)	56
	Dahili Birimler	16 (59)	11 (41)	27
	Cerrahi Birimler	15 (62)	7 (38)	22
	Toplam	83 (79)	22 (21)	105



Şekil 5: KNS'lerin birimler içerisindeki *mecA* pozitifliği yüzdesi



Şekil 6: *mecA* geni varlığına göre MR-KNS'lerin servislere göre dağılımı

Oksasilin disk difüzyon yöntemi ve oksasilin agar mikrodilüsyon ile metisiline dirençli saptanan bir KNS izolatında (84 numaralı örnek) *mecA* geni saptanamazken diğer üç yöntemle metisiline duyarlı olarak bulunan iki KNS izolatında *mecA* geni varlığı gösterilmiştir (19 ve 61 numaralı örnekler, bkz. Tablo 18). Aynı şekilde sefoksitin disk difüzyon yöntemi ile sefoksitine duyarlı olarak bulunan üç KNS izolatında (12, 19 ve 61 numaralı örnekler, bkz. Tablo 18) *mecA* varlığı gösterilmiştir. Sefoksitin disk difüzyon yöntemi ile sefoksitine dirençli olan grubun tamamında *mecA* varlığı gösterilmiştir.

Birbiriyle çelişen bu sonuçların varlığı nedeniyle farklılıkların işlemsel hatalardan kaynaklanmadığını göstermek için bu izolatların tüm testleri ikişer kez tekrarlanmıştır.

Tablo 18: KNS izolatlarının disk difüzyon, MİK ve *mecA* PCR toplu sonuçları

Örnek No	Oksasilin disk difüzyon sonucuna göre direnç durumu	Sefoksitin disk difüzyon sonucuna göre direnç durumu	Agar mikrodilüsyon ile MİK sonucu µg/ml	<i>mecA</i> PCR sonucu
1	Dirençli	Dirençli	2.0	(+)
2	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
3	Duyarlı	Duyarlı	0.25	(-)
4	Dirençli	Dirençli	2.0	(+)
5	Dirençli	Dirençli	4.0	(+)
6	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
7	Duyarlı	Duyarlı	0.125	(-)
8	Dirençli	Dirençli	4.0	(+)
9	Dirençli	Dirençli	4.0	(+)
10	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
11	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
12	Dirençli	Duyarlı	2.0	(+)
13	Duyarlı	Duyarlı	0.125	(-)
14	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
15	Dirençli	Dirençli	4.0	(+)
16	Dirençli	Dirençli	4.0	(+)
17	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
18	Duyarlı	Duyarlı	<0.0625	(-)
19	Duyarlı	Duyarlı	1.0	(+)
20	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
21	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
22	Dirençli	Dirençli	1.0	(+)
23	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
24	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
25	Duyarlı	Duyarlı	0,25	(-)
26	Duyarlı	Duyarlı	0.125	(-)
27	Duyarlı	Duyarlı	0.25	(-)
28	Duyarlı	Duyarlı	0.125	(-)
29	Duyarlı	Duyarlı	0.125	(-)
30	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
31	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
32	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
33	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
34	Dirençli	Dirençli	1.0	(+)
35	Dirençli	Dirençli	4.0	(+)
36	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
37	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
38	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
39	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
40	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
41	Duyarlı	Duyarlı	0.25	(-)
42	Dirençli	Dirençli	2.0	(+)
43	Dirençli	Dirençli	0.5	(+)

Tablo18'nin devamı

Örnek No	Oksasilin disk difüzyon sonucuna göre direnç durumu	Sefoksitin disk difüzyon sonucuna göre direnç durumu	Agar mikrodilüsyon ile MİK sonucu µg/ml	mecA PCR sonucu
44	Dirençli	Dirençli	0.5	(+)
45	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
46	Dirençli	Dirençli	4.0	(+)
47	Duyarlı	Duyarlı	0.25	(-)
48	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
49	Dirençli	Dirençli	4.0	(+)
50	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
51	Duyarlı	Duyarlı	0.125	(-)
52	Duyarlı	Duyarlı	0.125	(-)
53	Dirençli	Dirençli	2.0	(+)
54	Duyarlı	Duyarlı	0.125	(-)
55	Dirençli	Dirençli	4.0	(+)
56	Duyarlı	Duyarlı	0.125	(-)
57	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
58	Dirençli	Dirençli	1.0	(+)
59	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
60	Dirençli	Dirençli	4.0	(+)
61	Duyarlı	Duyarlı	1.0	(+)
62	Dirençli	Dirençli	4.0	(+)
63	Dirençli	Dirençli	4.0	(+)
64	Duyarlı	Duyarlı	0.25	(-)
65	Dirençli	Dirençli	2.0	(+)
66	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
67	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
68	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
69	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
70	Dirençli	Dirençli	1.0	(+)
71	Dirençli	Dirençli	4.0	(+)
72	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
73	Duyarlı	Duyarlı	0.25	(-)
74	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
75	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
76	Dirençli	Dirençli	1.0	(+)
77	Dirençli	Dirençli	2.0	(+)
78	Dirençli	Dirençli	4.0	(+)
79	Dirençli	Dirençli	2.0	(+)
80	Dirençli	Dirençli	4.0	(+)
81	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
82	Dirençli	Dirençli	2.0	(+)
83	Dirençli	Dirençli	2.0	(+)
84	Dirençli	Duyarlı	>4	(-)
85	Duyarlı	Duyarlı	0.125	(-)
86	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
87	Dirençli	Dirençli	2.0	(+)

Tablo18'nin devamı

Örnek No	Oksasilin disk difüzyon sonucuna göre direnç durumu	Sefoksitin disk difüzyon sonucuna göre direnç durumu	Agar mikrodilüsyon ile MİK sonucu µg/ml	mecA PCR sonucu
88	Duyarlı	Duyarlı	0.25	(-)
89	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
90	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
91	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
92	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
93	Duyarlı	Duyarlı	0.125	(-)
94	Dirençli	Dirençli	1.0	(+)
95	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
96	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
97	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
98	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
99	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
100	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
101	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
102	Dirençli	Dirençli	>4	(+)
103	Duyarlı	Duyarlı	<0.625	(-)
104	Dirençli	Dirençli	2.0	(+)
105	Dirençli	Dirençli	4.0	(+)

Açıklama: 105 KNS izolatının belirtilen yöntemlerle metisilin direnci aranması yapılmış ve sonuçlar tabloda özetlenmiştir. Koyu olarak belirtilen izolatların yöntemsel farklılıklar nedeniyle sonuçları birbirlerinden farklı bulunmuştur. Bunun gerçek bir farklılık olduğunu kanıtlamak için bu izolatların tüm testleri ikişer kez daha tekrarlanmış ve aynı sonuçlar elde edilmiştir.

5. SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ ve İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizler için SPSS 11.0 paket programı kullanıldı. Grupların karşılaştırılması ROC analizine göre yapıldı. Testlerin, ROC eğrisi altında kalan alanlara göre elde edilen kappa (κ) değerleri hesaplandı. Bunların yanında Tablo 19’da görülen dört gözlü tablo kullanılarak; duyarlık, seçicilik, olumlu öngörü (positive predictivity) ve olumsuz öngörü (negative predictivity) değerleri, olabilirlik oranları (likelihood ratio) hesaplandı [94].

Tablo 19: İstatistiksel hesaplamalar için kullanılan dört gözlü tablo [94]

		Kaynak Test		
		Gerçek olumlu	Gerçek olumsuz	
Kullanılan Test	Olumlu	Doğru olumlu <i>a</i>	Yalancı olumlu <i>b</i>	<i>a + b</i>
	Olumsuz	Yalancı olumsuz <i>c</i>	Doğru olumsuz <i>d</i>	<i>c + d</i>
		<i>a + c</i>	<i>b + d</i>	

$$\text{Duyarlık} = 100 \frac{a}{a + c}$$

$$\text{Olumlu öngörü} = 100 \frac{a}{a + b}$$

$$\text{Seçicilik} = 100 \frac{d}{b + d}$$

$$\text{Olumsuz öngörü} = 100 \frac{d}{c + d}$$

Olabilirlik oranı (likelihood ratio) = Duyarlık / (1-Seçicilik)

Oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon, oksasilin MİK ve *mecA* gen varlığı arasındaki ilişki Tablo 20’de gösterilmiştir.

Tablo 20: Oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon; oksasilin MİK ve *mecA* gen varlığı arasındaki ilişki

		Kaynak Test			
		<i>mecA</i>			
		+		-	Toplam
Oksasilin Disk Difüzyon	Dirençli	81	a	b 1	82
	Duyarlı	2	c	d 21	23
	Toplam	83		22	105

Sefoksitin Disk Difüzyon	Dirençli	80	a	b -	80
	Duyarlı	3	c	d 22	25
	Toplam	83		22	105

Agar dilüsyon ile oksasilin MİK belirlenmesi	≥ 0.5	83	a	b 1	84
	≤ 0.25	-	c	d 21	21
	Toplam	83		22	105

Yukarıdaki dört gözlü tablo ve belirtilen hesaplamalara göre çalışılan yöntemlerin duyarlılık, seçilim, olumlu öngörü, olumsuz öngörü ve olabilirlik oranları Tablo 21’de belirtilmiştir.

Tablo 21: Kullanılan testlerin istatistiksel anlamları

Kullanılan test	Duyarlılık (%)	Seçicilik (%)	Olumlu öngörü (%)	Olumsuz öngörü (%)	Olabilirlik oranı
Oksasilin disk difüzyon	97.59	95.45	98.78	91.30	1.03
Sefoksitin disk difüzyon	96.38	100	100	88	0.97
Agar dilüsyon ile oksasilin MİK değerinin belirlenmesi	100	95.45	98.81	100	1.06

Buna göre; oksasilin agar dilüsyon duyarlılığı en yüksek test (% 100), sefoksitin disk difüzyon ise seçiciliği en yüksek test (% 100) olarak bulunmuştur. Bunun yanında sefoksitin disk difüzyon testinin olumlu öngörü değeri % 100 olarak bulunurken oksasilin agar dilüsyon yönteminin olumsuz öngörü değeri yine % 100 olarak bulunmuştur.

Burada dikkat çekici olan sefoksitin disk difüzyon ile yanlış negatifliğin gözlenmemiş olmasıdır. Bir başka deyişle PCR ile *mecA* geni saptanmış tüm suşlar sefoksitin disk difüzyon yöntemi ile de sefoksitine dirençli bulunmuştur. Bu nedenle bu testin olumlu öngörü değeri % 100 bulunmuştur. Bunun yanında sefoksitin disk difüzyon ile üç adet yanlış pozitif sonuç elde edilmiştir. Bu sonuç ile testin olumsuz öngörü değeri % 88 olarak bulunmuştur (Tablo 20).

Oksasilin disk difüzyon ile iki yanlış pozitif sonuç elde edilirken, bir tane de yanlış negatif sonuç elde edilmiştir. Buna bağlı olarak oksasilin disk difüzyon testinin olumlu öngörü değeri % 98.78, olumsuz öngörü değeri % 91.30 olarak bulunmuştur.

Oksasilin agar dilüsyon yöntemi ile hiç yanlış pozitif değer elde edilmezken, yalnızca bir adet yanlış negatif sonuç elde edilmiştir. Bu da bu testin olumsuz öngörü değerinin % 100 olmasını ve de olumlu öngörü değerinin % 98.81 olmasını sağlamıştır.

Bir gerçeği ortaya koymak için uygulanan farklı testlerin istatistiksel karşılaştırılmasında ROC eğrisi altında kalan alan ile elde edilen “ κ ” değeri kullanılmaktadır. Burada κ değeri, “bir” değerine ne kadar yakınsa elde edilen sonuç gerçeğe o kadar yakın kabul edilir. Çalışmamızda farklı testlerden elde edilen κ değerleri karşılaştırılacak olursa sefoksitin disk difüzyon testinin κ değeri (0.982) bire en yakın değerdir. Bu durumda; metisilin direncini göstermede sefoksitin disk difüzyon yöntemi, referans yöntemimize (*mecA* PCR) en yakın sonucu veren test olarak kabul edilmiştir (Tablo 22).

Tablo 22: Kullanılan testlerin ROC eğrisi ile elde edilen kappa değerlerinin karşılaştırılması

<i>Kullanılan test</i>	<i>ROC eğrisi altında kalan alan (κ)</i>	<i>Standart hata</i>
Oksasilin disk difüzyon	0.965	0.28
Sefoksitin disk difüzyon	0.982	0.12
Agar dilüsyon ile oksasilin MİK değerinin belirlenmesi	0.977	0.26

Diğer yandan, oksasilin disk difüzyon ile oksasilin agar dilüsyon yöntemleri karşılaştırıldığında; referans yöntemimize göre agar dilüsyon yönteminin (κ : 0.977) oksasilin disk difüzyon yönteminden (κ : 0.965) daha iyi bir yöntem olduğu gözlenmektedir.

Yine de bulunan κ değerlerinin birbirine çok yakın değerler olması nedeniyle kesin yargıya varmak güçtür.

ROC eğrisi altında kalan alan hesaplanırken elde edilen standart hata oranlarına bakılacak olursa yine sefoksitin disk difüzyon yönteminin standart hata oranının en düşük olduğu görülmektedir.

6. TARTIŞMA

Stafilokoklar; günümüzde hem toplum kökenli hem de hastane kökenli patojenler arasında ilk sıralarda yer almaktadır. KNS'ler de *S.aureus* gibi, *mecA* geni tarafından kodlanan, beta-laktam antibiyotiklere düşük afiniteli bir penisilin bağlayıcı protein olan PBP2a üretmeleri nedeniyle metisiline ve dolayısıyla diğer beta-laktam antibiyotiklere dirençlidirler. Özel bir protein olan ve *mecA* geni tarafından kodlanan PBP2a; stafilokoklara, semisentetik penisilinlerin yanı sıra, sefalosporinler ve karbapenemlere de direnç kazandırır [95]. Metisilin dirençli suşlar; genetik direnç aktarımı sırasında diğer antibiyotik direnç genlerinin de beraber aktarımı nedeniyle çoğunlukla makrolidler, klindamisin, aminoglikozitler, kloramfenikol, florokinolon ve ko-trimoksazol gibi birçok antibiyotiğe de dirençli suşlardır.

Önceki yıllarda, stafilokokların antibiyotik duyarlılık testlerinde çeşitli penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler ve beta-laktam – beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonlu antibiyotikler kullanılmaktaydı. Oysa stafilokoklar bu antibiyotiklere in-vitro duyarlı görünse bile metisilin direnci varlığında tüm beta-laktam antibiyotiklere dirençli kabul edilmelidirler [96].

Metisilin direncinin en doğru şekilde saptanması her laboratuvarın görevidir. Standart fenotipik antibiyotik duyarlılık testleri hem maliyet/etkin olmaları, hem de kolay uygulanabilirlikleri nedeniyle rutin laboratuvarlarda tercih edilir. Ancak stafilokoklarda özellikle yüksek düzey heterojen direncin varlığı nedeniyle dirençli suşlar sıklıkla gözden kaçabilir. Fenotipik yöntemlerle metisilin direnci saptanması, uygulanan test koşullarından oldukça etkilenmektedir. İnkübasyonun 37°C yerine 30°C'de yapılması, kullanılan besiyerinin NaCl miktarı ve inkübasyon süresinin 24-48 saate uzatılması gibi faktörler fenotipik oksasilin direncinin ortaya çıkmasında etkilidir [71]. Heterojen suşlarla yapılan çalışmalar bu suşlarda disk difüzyon testinin duyarlılığının düşük olduğunu göstermektedir [78]. Bu nedenle günümüzde metisilin direncinin saptanması için *mecA* gen bölgesinin gösterilmesi, gerçek direnci en iyi ortaya koyan yöntem olarak kabul edilmektedir [97]. Bu gen bölgesi, tanımlanmış primerler aracılığı ile PCR ya da “DNA probe” yöntemleri ile saptanabilmektedir. En önemli avantajları hızlı sonuç alınması olan bu yöntemlerin, günümüz şartlarında her laboratuvarda yapılabilmesi mümkün görülmemektedir. Bunun nedeni birim test başına maliyetlilerinin yüksek olması ve eğitimli personel gerektirmesidir.

MRSA saptanması için CLSI tarafından önerilen ve ABD Yiyecek ve İlaç Kurumu FDA (U.S. Food and Drug Administration) tarafından kabul görmüş tarama amaçlı agar testi mevcuttur. İçerisinde 6 µg/ml oksasilin içeren MHA tarama plakları, MRSA saptanması için ideal ve ucuz bir yöntemdir. Oysa bu kolaylaştırılmış tarama plakları *mecA* geni taşıyan KNS'lerde fenotipik direnci göstermede başarısız bulunmuştur [41]. Bu nedenle tarama plaklarının KNS'lerde kullanılması CLSI tarafından önerilmemektedir. KNS'lerde metisilin direncinin fenotipik yöntemlerle saptanması *S.aureus*'a göre daha zor bir durumdur. Bunun yanında *S.aureus* için daha standardize olarak belirlenmiş MİK ve disk difüzyon duyarlılık zon çapları KNS'lerde farklılık göstermektedir [98].

Aslında bu zorluğun nedeni açıktır. KNS tanımı en az 60 kadar stafilokok türünü içerdiğinden bunların hepsine birden tek bir MİK ve disk difüzyon duyarlılık zon çapı tanımlanmaya çalışılması sorunu doğurmaktadır. Bu noktada KNS'lerin türlerinin tanımlanmasının önemi ortaya çıkmaktadır. Daha önceki önerilerinde bulunmazken, CLSI 2005 yılı Ocak ayından itibaren *S.lugdunensis*'i diğer KNS'lerden ayırmış, bu bakteriye özel MİK ve disk difüzyon duyarlılık zon çapı tanımlamıştır (Tablo 11) [76]. Bu gelişme ileride diğer KNS türlerinin de tür düzeyinde tanımlanması gereğinin işareti olmaktadır.

KNS türlerinin kendi aralarında ayrımı maliyet/etkin olmayan, zaman alıcı ve zor bir işlem gerektirir. Kloos ve arkadaşlarının 1975 yılında KNS türlerinin tanımlanması için önerdikleri işlem akış şeması çok fazla test içerdiğinden rutin laboratuvarlar için kullanılabilir değildir [7]. Bunu 2003 yılında De Paulis ve arkadaşları tekrar gözden geçirmiş ve rutin kullanıma uygun beş basit kimyasal temele dayanan testi seçerek, aslında KNS'lerin rutin laboratuvarlarda da tip ayrımı yapılabileceğine dikkat çekmişlerdir [99]. Bunlar dışında ticari olarak geliştirilmiş tip ayrımı yapabilen yöntemler de bulunmaktadır. En sık kullanılan API-Staph (Biomerieux, Fransa) yönteminin türleri doğru olarak tanımlama duyarlılığı % 80 – 85'dir [99].

Çalışmamızda Nisan – Eylül 2005 tarihleri arasında gönderilen kan kültürlerinden elde edilen KNS'lerin yarısından fazlasının (% 53) YBÜ'lerden gönderilmiş örneklerden elde edildiği dikkati çekmektedir. Bunun sebebi YBÜ'de santral venöz/arteriyel kateterlerin daha sıklıkla kullanılması ve buna bağlı olarak KDI'ler diğer yatan hasta bölümlerine göre daha sık izlenmesidir [14, 15].

KDİ'ler YBÜ'lerde nozokomiyal pnömonilerden sonra ikinci olarak en sık karşılaşılan infeksiyonlardır [3, 100]. Bu infeksiyonlardan en sık stafilokoklar izole edilmektedirler. Çok merkezli ve en büyük antimikrobiyal sürveyans çalışmalarından biri olan SENTRY çalışmasının 1997 – 2002 yılları arası elde edilen sonuçlarına göre KNS'ler; KDİ'lerde *S.aureus* ve *E.coli*'den sonra üçüncü sırada yer almaktadır [101].

ABD'de sürdürülen bir başka çok merkezli sürveyans çalışması olan SCOPE (Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance) verilerine göre; 1995 – 2002 arasındaki yedi yıllık dönemde, 49 hastanede 24.179 nozokomiyal KDİ saptanmıştır. KDİ etkenlerinin % 65'inin gram pozitif bakteriler olduğu ve en sık karşılaşılan bakterinin KNS'ler olduğu (% 31) belirtilmiştir. KNS'leri % 20 sıklıkla *S.aureus* izlemektedir [102].

KNS'ler giderek artan sıklıkla karşılaşılan bir nozokomiyal patojendir. Hastane kökenli KNS'lerin metisilin direnci oranı dünya ile paralel olarak Türkiye'de de yüksek seyretmektedir.

Çalışmamızda oksasilin disk difüzyonu sonuçlarına göre tüm suşların % 78.1'i metisilin dirençli bulunmuştur. Bu bulgu Türkiye (% 54 – 83) ve Dünya (% 73 – 76) literatürüyle uyum göstermektedir.

Ege Üniversitesinden Çavuşoğlu ve arkadaşlarının 1998 yılında yaptıkları bir çalışmada; kan kültürlerinden elde edilmiş 293 stafilokok izolatının 96'sı (% 32) KNS olarak saptanmış ve bu KNS'lerin % 82.3'ünün oksasilin disk difüzyon yöntemi ile metisiline dirençli olduğu bulunmuştur [103].

Gazi Üniversitesinden Doğruman ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptığı bir çalışmada; kan kültürlerinden elde edilmiş 234 stafilokok suşunun 214'ünün KNS olarak saptandığı (% 93) ve bu 214 KNS izolatlarının metisilin direnci oranının da % 61.5 olduğu bulunmuştur [104]. Bu çalışmada kan kültürlerinde KNS'lerin tüm izolatların % 93'ünü oluşturması dikkat çekicidir.

Yine Gazi Üniversitesinden Doğan ve arkadaşlarının aynı yıl yaptığı çalışmada; kan kültürünün yanına diğer klinik örneklerden de elde edilen stafilokokların eklenmesiyle toplam 403 stafilokok izolatının 336'sı (% 83.3) KNS olarak saptanmış, bu 336 KNS izolatının 182 tanesinde (% 54.2) metisilin direnci saptanmıştır [105]. Bu çalışmada da

görüldüğü gibi KDI'den sorumlu KNS'lerde, diğer klinik örneklerden alınan KNS'lere göre metisilin direnci daha yüksek bulunmaktadır.

Fırat Üniversitesinden Yüce ve arkadaşlarının 3,5 yıllık kan kültürü sonuçlarının değerlendirildiği ve 2005 yılında yayınlanan çalışmalarında elde edilen KNS izolatlarının metisilin direnci % 56 olarak saptanmıştır [106]. Bu çalışmalarda görüldüğü üzere KNS'lerdeki metisilin direnci hastaneden hastaneye ve bölgeden bölgeye değişmektedir. Doğu ve Güneydoğu Anadolu'dan çok fazla bildirim olmasa bile bu makaleler eşliğinde oradaki hastanelerde KNS'lerin metisilin direnci sıklığının düşük olabileceği düşünülmektedir.

Amerika Birleşik Devletleri'nin (ABD) 2004 nozokomiyal infeksiyon sürveyans sistemi (NNIS – National Nosocomial Infections Surveillance Report System) verilerine göre; 2004 yılı boyunca elde edilen KNS izolatlarının oksasilin disk difüzyon ile metisilin dirençliliği YBÜ'de % 76.6, YBÜ dışındaki servislerde ise % 65.7 bulunmuştur. Toplum kökenli KNS izolatlarında ise metisilin direncinin % 50.2 olduğu bildirilmektedir * [107]. Bu verilerle ABD'de toplum kökenli KNS'lerin yarısının metisilin dirençli olduğu dikkati çekmektedir.

Türkiye'de toplum kökenli metisilin dirençli KNS sıklığının araştırıldığı epidemiyolojik bir çalışma, tezin yazıldığı tarih itibariyle henüz yapılmamıştır. Ancak toplumda *S.aureus* taşıyıcılığını araştırarak, Erdenizmenli ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptığı ve 2004 yılında yayınlanan çalışmalarında; 500 toplum kökenli olgunun aksiller ve nazal bölgelerinden alınan sürüntü kültürleri değerlendirilmiştir. Bu olguların % 11'inde *S.aureus* taşıyıcılığı tespit edilmiştir. Sadece nazal taşıyıcılık ise % 9.4 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada dikkat çekici bulgu; taşıyıcılığın çocuk popülasyonda istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek oluşudur. Çocuk grubunda nazal *S.aureus* taşıyıcılığı % 19.1 gibi yüksek bir düzeyde iken; erişkin yaş grubunda bu oran % 6.5 olarak bulunmuştur. Çalışmada elde edilen verilere göre toplum kökenli hastaların hiçbirinde MRSA'ya rastlanmamıştır [108].

Hastane kökenli KNS'lerde metisilin direnci tüm dünyada % 70 gibi yüksek bir değer üzerinde seyretmesine karşın sevindirici olan, direncin yıllık artışının yavaş seyretmesidir. Yine 2004 yılı NNIS verilerine göre, KNS'lerde metisilin direnci artışı, önceki beş yılın direnç ortalamasına göre % 1 oranında olmuştur * [107].

* Tezin son gözden geçirildiği Mayıs 2006 tarihi itibariyle NNIS 2005 verileri yayınlanmadığı için 2004 verileri değerlendirilmiştir.

Metisilin direnci saptamada karşılaşılan 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 birçok yayın bulunmaktadır [109-111]. Bunun sebebi Sefoksitin PBP2a üretimini güçlü bir şekilde indüklemesidir. Bunun yanında sefoksitin stafilokokal PBP4'e de yüksek afinite gösterir. Yapılan çalışmalarla stafilokoklarda metisilin direnci gelişmesinde PBP2 ile PBP4'ün arasında yakın ilişki olduğu gösterilmiştir [109, 110]. Birçok çalışmada, sefoksitin disklerinin stafilokoklarda heterojen metisilin direncini ortaya koymada yüksek duyarlılık (% 97 – 100) ve seçicilik (% 99 – 100) gösterdiği belirtilmiştir [109, 111-115]. Bu nedenle CLSI 2004 yılından bu yana stafilokoklarda metisilin direncini göstermede oksasilin disk difüzyon ile birlikte sefoksitin disk difüzyon yönteminin de kullanılmasını önermektedir. Ancak bu çalışmaların çoğunluğu *S.aureus* ile yapılmış olup, KNS'lerde sonuçların farklı olabileceğine yönelik yorumlar vardır [114, 116].

Çalışmamızda 105 KNS izolatının sefoksitin disk difüzyon yöntemi ile 80 izolat (% 76.2) sefoksitine dirençli bulunurken, 25'i (% 23.8) duyarlı bulunmuştur.

CLSI standartlarına göre uyguladığımız sefoksitin disk difüzyon yöntemi ile oksasilin disk difüzyon yöntemi arasında iki adet uyumsuz sonuç bulunmuştur (12 ve 84 numaralı örnekler, Resim 11, 12 ve Tablo 18). Her iki örnekte de oksasilin dirençli bulunurken, sefoksitin duyarlı bulunmuştur. Bunlardan 12 numaralı örnekte oksasilin disk difüzyon sonucu referans yöntem (*mecA* PCR) ile uyumluyken, 84 numaralı örnekte ise sefoksitin disk difüzyon testi referans yöntemle uyumlu bulunmuştur. Bu açıdan her iki yöntem de birbirlerine referans yöntemle göre birer kez üstünlük sağlamıştır. Bu sonuca bakılarak her iki disk difüzyon yöntemi arasında fark olduğu söylenemez. Çalışılan 105 örnekte 2 farklı sonuç olması bu iki yöntemin sonuçlarının % 98.1 uyumlu olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda sefoksitin disk difüzyon testine göre duyarlı olup *mecA* geni negatif bulunan 84 numaralı örnek; yapılan oksasilin disk difüzyon ve oksasilin agar dilüsyon testlerine göre dirençli bulunmuştur. Bu örnekte sefoksitin referans yöntemle aynı yönde sonuç verirken, her iki oksasilin bazlı yöntem tam tersi sonuç vermiştir. Bu izolatta oksasilin direncini sağlayacak PBP2a bulunmadığından bu direncin sebebi PBP2a dışı bir mekanizma ile gerçekleşebilir. Yüksek düzey beta-laktamaz üretimi olan suşların oksasilini

de hidrolize edebildiği bilinmektedir. Bu nedenle 84 numaralı izolatta – eğer var ise – yüksek düzey beta-laktamaz varlığı bu uyumsuz sonucu açıklayabilir. Nitekim Gal ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada sınırda metisilin dirençli (MİK 0,5 – 2.0 µg/ml) *S.aureus* izolatlarında yüksek düzey beta-laktamaz üretiminin oksasilini hidrolize ettiği bildirilmiştir [117]. Ancak çalışmamızdaki 84 numaralı örneğin oksasilin MİK değeri > 4 µg/ml olduğu dikkati çekmektedir. Beta-laktamazlara karşı sefoksitin oksasilinden daha dirençli olduğu bilinmektedir [112].

KNS’lerde beta-laktamaz üretimi uzun yıllardır yüksek düzeylerde bulunmaktadır. Baldwin ve arkadaşlarının 1969 yılında yaptığı çalışmada; toplum kökenli 200 hastanın nazal sürüntü örneklerinden elde ettikleri *S.epidermidis* izolatında plazmid aracılı beta-laktamaz üretiminin % 83 olduğu belirtilmiştir [118].

Narayani ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise hem sağlıklı kişilerden hem de hastane kaynaklı kültürlerden elde edilmiş 200 KNS izolatında betalaktamaz varlığı % 75 olarak bulunmuştur [119]. Günümüzde beta-laktamaz bulunduran suşların sıklığının özellikle hastane kaynaklı KNS’lerde daha yüksek oranda olacağı öngörülebilir. Bu nedenle rutin laboratuvar KNS’lerde beta-laktamaz araştırılması önerilmez.

Çalışmamızda sefoksitin disk difüzyon testi duyarlı bulunup, *mecA* gen pozitifliği saptanan üç izolat bulunmaktadır (12, 19 ve 61 numaralı izolatlar). Bir bakıma yanlış negatiflik olarak değerlendirebileceğimiz bu sonuçların mekanizması şöyle açıklanabilir: Mevcut *mecA* geni ile düşük düzeyde PBP2a üretilirken sefoksitin bakterisidal etkisini hücre duvarında daha fazla miktarda bulunabilen PBP4’ler aracılığı ile yaptığı düşünülebilir. Bu durum suşların yüksek oksasilin MİK değerlerine neden olurken sefoksitine duyarlı olmalarını açıklar. Çalışmamızda sefoksitin disk difüzyon yöntemiyle üç yanlış negatiflik elde edilmesinin dışında, sefoksitini ön plana çıkaran dikkat çekici nokta; sefoksitin disk difüzyon ile hiç yanlış pozitifliğin olmamasıdır. Bu da testin seçiciliğinin % 100 olmasını sağlar.

Laboratuvar verilerinin değerlendirilebilir olması için uygulanan testlerin standardizasyonun ve kalite kontrollerinin iyi yapılması gerekmektedir. Ülkemizde antibiyotik duyarlılık testleri için CLSI’nin önerdiği standartlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak başka bir ülkeden alınan standartların ülke verileri ile tekrar gözden geçirilerek uygulanması gerekmektedir.

Avrupa’da antibiyotik duyarlılık testleri standartlarını oluşturmuş, ulusal düzeyde altı ayrı kuruluş bulunmaktadır. Bunlar; İngiltere’de BSCA (British Society of Antimicrobial Chemotherapy), Fransa’da CASFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie), Danimarka’da CRG (Commissie Richtlijnen Gevoeligheidsbepalingen), Almanya’da DIN (Deutsches Institut für Normung), Norveç’te NWGA (Norwegian Working Group on Antibiotics) ve İsveç’te SRGA’dır (The Swedish Reference Group for Antibiotics). Bunlar dışındaki Avrupa ülkeleri daha çok ABD kaynaklı CLSI tarafından kabul edilen standartları kullanmaktadır. Bu altı komite 1996’da birleşerek Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (European Society of Clinical Microbiology and Infectious disease – ESCMID) çatısı altında Avrupa Antibiyotik Duyarlılık Testleri Komitesi’ni (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST) kurmuşlardır [120]. Daha sonra gelişen komite bugün itibarıyla içerisinde Türkiye’nin de yer aldığı 33 Avrupa ülkesinden temsilciler barındırmaktadır. Ancak bugüne kadar EUCAST tarafından antibiyotik duyarlılık testlerinin standardizasyonu için ortak bir standart önerilmemiştir. Bu nedenle Avrupa’da bile hala antibiyotik duyarlılık sınırları konusunda ortak bir dil konuşulamamaktadır. Bunun dışında, EUCAST ile ABD’deki eşdeğeri olan CLSI arasında da yeterli bilgi akışı sağlanamamaktadır [121].

Ülkemizde antibiyotik duyarlılık testlerinin standardizasyonu için Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti’nin (TMC) çalışma alt gruplarından birisi olan Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu “ADTS” grubu 1994 yılında kurulmuştur. Bugün için ülkemizde antibiyotik duyarlılık testlerinde en sık temel alınan standart, CLSI standartlarıdır [122]. CLSI tarafından yayınlanan kaynaklar ADTS komitesince Türkçeleştirilerek yayınlanmaktadır. Böylelikle ülke çapındaki laboratuvarların CLSI standartlarını kullanması kolaylaşmıştır.

Tablo 23’te dört Avrupa ülkesinin ulusal komitelerinin stafilokoklar için kabul ettiği antibiyotik duyarlılık standartları görülmektedir.

Tablo 23: Farklı Avrupa ülkelerinde kabul edilen oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon zon çapları ve MİK değerleri [76, 123-125]

Ülke	Bakteri	Oksasilin disk R	S	Oksasilin MİK R	S	Sefoksitin Disk R	S	Yorum
Türkiye (ADTS - CLSI)	<i>S.aureus</i> ve <i>S.lugdunensis</i>	≤ 10 º	≥ 13 º	≥ 4	≤ 2	≤ 24 º	≥ 25 º	Türkiye’de TMC - ADTS Çalışma grubu CLSI standartlarının kullanılmasını öneriyor.
	KNS (<i>S.lugdunensis</i> dışındakiler)	≤ 17 º	≥ 18 º	≥ 0.5	≤ 0.25	≤ 19 º	≥ 20 º	
İngiltere (BSAC)	<i>S.aureus</i>	≤ 14 º	≥ 15 º	> 2	≤ 2	≤ 21 Δ	≥ 22 Δ	KNS ve <i>S.aureus</i> için aynı oksasilin MİK ve zon çapı kullanılması öneriliyor. Sefoksitin KNS’ler için önerilmiyor
	KNS	≤ 14 º	≥ 15 º	> 2	≤ 2	KNS için önerilmiyor		
Fransa (CASFM)	<i>S.aureus</i>	< 20 *	≥20 *	> 2	≤ 2	< 25 º	≥27 º	Fransa’da KNS ve <i>S.aureus</i> için aynı oksasilin zon çapı kullanılması öneriliyor. Ancak KNS ve <i>S.aureus</i> için oksasilin MİK değerleri farklıdır
	KNS	< 20 *	≥20 *	> 2	≤ 0.25	< 25 º	≥27 º	
İsveç (SRGA)	<i>S.aureus</i>	Önerilmiyor		Önerilmiyor		< 21 Δ	≥22 Δ	İsveç’te stafilocoklar için oksasilin hem disk difüzyon hem de MİK değeri saptanması önerilmiyor.
	KNS	Önerilmiyor		Önerilmiyor		< 21 Δ	≥27 Δ	

* 5 µg Oksasilin diski kullanılmıştır

¥ 1 µg Oksasilin diski kullanılmıştır

Δ 10 µg Sefoksitin diski kullanılmıştır

§ 30 µg Sefoksitin diski kullanılmıştır

Oksasilin disk difüzyon yöntemi için ADTS ve BSAC komiteleri 1 µg’lık oksasilin diski kullanılmasını önerirken, CASFM komitesi 5 µg oksasilin diskini önermektedir. İsveç komitesi SRGA ise hem *S.aureus* hem de KNS’ler için oksasilin disk difüzyon ya da oksasilin MİK saptanmasını artık önermemektedir.

Sefoksitin disk difüzyon yöntemi için ise; ADTS ve CASFM komiteleri 30 µg’lık sefoksitin diskini önerirken, SRGA 10 µg’lık sefoksitin diskinin kullanılmasını önermektedir. İngiliz BSAC komitesi ise 10 µg’lık sefoksitin diskinin sadece *S.aureus* için kullanılabileceğini önerirken, sefoksitin KNS’lerde kullanımını önermemektedir.

Bu farklılıkların yanı sıra disk difüzyon testlerinin yapılması için önerilen besiyerleri de ülkeler arasında farklılıklar göstermektedir. Fransa ve Türkiye’de MHA

besiyeri kullanılması önerilirken, İngiltere ve İsveç rehberlerini uygulayan ülkelerde Iso-Sensitest Agar (ISA, CM471, Oxoid, Basingstoke, UK) kullanılması önerilmektedir.

Görüldüğü üzere Avrupa ülkelerinin bile kendi aralarında antibiyotik duyarlılık testleri standartları için görüş ayrılıkları bulunmaktadır. Oldukça heterojenite gösteren stafilokoklarda metisilin direncinin fenotipik yöntemlerle gösterilmesi için komitelerin farklı önerilerde bulunması hem laboratuvarları hem de klinisyenleri zor durumda bırakmaktadır.

Önerileri CLSI önerilerinden farklı olan İsveç'ten Skov ve arkadaşlarının yaptığı ve sefoksitin disk içeriğinin değişik miktardaki konsantrasyonunu inceleyen çalışmada 5 µg ve 10 µg'lık sefoksitin disklerinin 30 µg'lık sefoksitin diski kadar duyarlı ve seçici olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışmada, disk difüzyonunun uygulanacağı MHA ve ISA besiyerleri de karşılaştırılmış ve anlamlı farklılık bulunmamıştır. Daha düşük konsantrasyonlardaki sefoksitin diskinin daha az inhibisyon zonu açmasının pratik kullanımda faydalı olabileceğini belirtmişlerdir [115].

Diğer ülkelerde önerilirken BSAC'ın sefoksitin diskinin KNS'lerde kullanımını önermemesi, CLSI'nin *S.lugdunensis*'i diğer KNS'lerden ayırması gibi farklı uygulamalar KNS'lerin antibiyogramlarının değerlendirilmesinin problemli olabileceğinin işaretidir. Bu konuda Arya ve arkadaşları, sefoksitin diskinin *S.aureus*'ta KNS'lerden daha iyi sonuçlar verdiğini belirtmişlerdir [114].

Frigatto ve arkadaşları da bu konuya dikkat çekmiş ve CLSI'nin sefoksitin KNS'ler için belirlediği inhibisyon zon çaplarının yeniden değerlendirilmesi gerektiğini belirtmişlerdir [116].

Çalışmamızda metisilin direncini göstermek için üç farklı fenotipik yöntem ve altın standart yöntem olarak *mecA*-PCR kullanılmıştır. Oksasilin ile yapılan disk difüzyon testinde duyarlılık % 97.59 ve seçicilik % 95.45 bulunmuştur. Sefoksitin ile yapılan testler de ise duyarlılık % 96.38 bulunurken, seçicilik % 100 bulunmuştur (Tablo 21). Görüldüğü gibi çalışılan testlerin duyarlılık ve seçiciliklerinin yüksek olması nedeniyle karşılaştırılması güçtür. Bu nedenle testlerin karşılaştırılması ROC eğrisi altında kalan alan ile elde edilen κ değeri ile yapılmıştır. Buna göre altın standart yöntemle en yakın yöntemin sefoksitin disk difüzyon yöntemi olduğu bulunmuştur (κ :0.982).

Ancak bu tür duyarlılık ve seçilim değerleri yüksek olan testlerin karşılaştırılmasında örnek büyüklüğünün önemi vardır. Çalışmamızın eksikliklerinden biri de kısıtlı sayıda örnek içermesidir. Bu konuda çok merkezli geniş sayılara ulaşabilen çalışmalara ihtiyaç vardır.

Stafilokoklardaki heterojen oksasilin direncinin tedavi kararı verme zorlukları yanında hasta izolasyon önlemlerinin alınması açısından da önemi vardır. Burada dikkat edilmesi gereken konu ABD hastalık korunma ve kontrol merkezi – CDC (Centers for Disease Control and Prevention) alt komitelerinden biri olan hastane infeksiyonları kontrol komitesi – HICPAC (Hospital Infection Control Practices Advisory Committee) MRSA’larca infekte olan hastalara izolasyon önerilirken, deri flora üyesi olması nedeniyle MR-KNS’lerce infekte hastalarda henüz izolasyon önermemektedir [126]. MR-KNS’ler MRSA’lar kadar önemli patojenler olmasalar da direnç genlerini horizontal gen transferi ile *S.aureus*’a aktarmaları söz konusudur. Bu da MR-KNS’lerin MRSA’lar için önemli bir kaynak olduğunu ortaya koymaktadır [74].

Çalışmamızda oksasilin agar dilüsyon yöntemiyle elde edilen MİK değerlerine göre 46 izolatın (% 44) MİK değeri $> 4 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. Bu bulgu izolatların yarıya yakınının yüksek düzey oksasilin MİK değerine sahip olduğunu göstermektedir. Benzer çok merkezli bir çalışma Hussain ve arkadaşlarınca yapılmış ve klinik olarak anlamlı 493 KNS izolatının MİK değerleri *mecA* ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada, izolatların % 38.5’inin MİK değeri $>4 \mu\text{g/ml}$ olarak bulunmuştur. Bu sonuç çalışmamız sonuçları ile uyumludur. Araştırmacı yazısında oksasilin MİK değerlerinin bazı KNS türlerinde referans yöntem ile uyumsuz olduğunu belirtmiştir [127].

Bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları coğrafi ve epidemiyolojik farklılıklar gösterebildiğinden ülkelerin kendi ulusal rehberlerini hazırlanması gerekmektedir. Ancak diğer bakterilerde olanın aksine stafilokokların beta-laktam antibiyotiklere olan heterojen direnci nedeniyle olsa gerek; ülkelerin ulusal rehberleri çok farklılık göstermektedir. Örneğin bir KNS izolatı farklı standartlar kullanılması nedeniyle Türkiye’de metisiline dirençli olarak kabul edildiği halde diğer ülkelerin standartlarına göre duyarlı olarak kabul edilebilecektir. Bunun sonucunda yayınlarda bahsedilen dirençlilik/duyarlılık durumlarının hangi standartlara göre olduğunun dikkatlice irdelenmesi gerekmektedir.

EUCAST tarafından tüm Avrupa ülkelerinde uygulanmak üzere standart antimikrobiyal duyarlılık testi rehberinin yakın zamanda hazırlanması planlanmaktadır [121].

MR-KNS'lere yüksek oranda karşılaşılmamasından dolayı, bazı çalışmacılar, antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılmadan ampirik olarak antibiyotik başlanabileceğine yönelik çalışmalar yapmaktadır.

Chandran ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada kan kültürlerinden izole edilen KNS'lerde, rutin antimikrobiyal duyarlılık testi uygulanmasının gerekli olup olmadığı sorgulanmıştır. Bu çalışma iki fazlı bir çalışma olup, birinci dönemde kan kültürlerinde üreyen tüm KNS izolatlarına antibiyotik duyarlılıkları çalışılmış, ikinci dönemde ise antibiyotik duyarlılıkları eğer klinisyen antibiyograma ihtiyaç duyduğunu belirtirse çalışılmıştır. Çalışmada ilk dönem ile ikinci dönem arasında hasta özellikleri benzer olduğu belirtilmiş olup, ikinci dönemde epizotların % 45.9'unda antibiyotik kullanılmasını gerektirecek bir klinik durum bulunmamıştır. Tüm epizotların % 21.3'ünde beta-laktam antibiyotik kullanılırken, % 32.8'inde vankomisin kullanılmıştır. İkinci dönemde elde edilen 189 izolatın sadece 54'ünde (% 29.1) klinisyen tarafından antibiyograma gerekçeli olarak ihtiyaç duyulmuştur. İlk dönem ile ikinci dönemde elde edilip antibiyogramları çalışılan stafilokokların metisilin direnci oranı benzerdir ve dirençli izolatların oranı yüzde yetmişlerin üzerindedir. Ayrıca iki dönem arasında ampirik vankomisin kullanımı açısından da istatistiksel anlamlılık saptanmamıştır (p 0.77). En önemlisi gereksiz antibiyotik duyarlılık testi uygulamasından kaçınılarak laboratuvar maliyetlerinde % 75'lik bir azalma sağlandığı belirtilmektedir [128]. İzolatların yüzde yetmişinden fazlasının metisilin direnci gösterdiği düşünülecek olursa Chandran ve arkadaşlarının önerileri dikkate almaya değerdir. Ancak bu çalışmada, her iki dönem arasında olguların mortalite ve morbiditesinin değerlendirilmediği dikkati çekmektedir. Cilt kontaminasyon olasılığının sık olduğu bu grupta mikroorganizmalarca oluşan infeksiyonlarda doğru tanı koymanın zor olacağı ve antibiyotik duyarlılığı olmaksızın etken/kontaminasyon ayırımının daha da zorlaşacağı kanısındayız.

Çalışmamızda elde edilen 105 KNS izolatının 83'ünde *mecA* pozitifliği saptanmıştır. Bu 83 *mecA* pozitif izolatının % 63'ü (n:52/83) YBÜ'den gönderilen kan kültürlerinden izole edilmiştir. YBÜ'den gelen örneklerin kendi içerisinde *mecA* geni

pozitifliği % 92 (n:52/56) olarak bulunmuştur. Yani bir başka deyişle DEUTF YBÜ'lerinden gelen kan kültüründen izole edilen her 10 KNS'den 9'unda *mecA* geni bulunmaktadır. Cerrahi birimlerden gelen KNS'lerin % 68'i (n:16/27), ve dahili birimlerden gelen KNS'lerin % 59'u (n:15/22) *mecA* geni içermektedir.

Çalışılan 105 KNS izolatının *mecA* geni bulunma oranı % 79 olarak bulunmuştur. Bu açıdan çalışmamızda elde edilen KNS'lerdeki metisilin direnci sıklığı Türk literatürü (% 55–85) ile uyum göstermektedir. Ancak çalışmamızda elde edilen KNS suşlarının tamamının hastane kökenli olduğu dikkate alınacak olursa bu değerin toplum kökenli suşların eklenmesiyle aşağılara düşeceği öngörülebilir.

İnfeksiyonlarda etken olan KNS'lerdeki metisilin direncinin maliyete olan etkisi üzerinde bir çalışma bulunamamıştır. Ancak Lodise ve arkadaşlarının MRSA'lar üzerine yaptıkları ve 2005 yılında yayınlanan bir çalışmaya göre; MRSA'ların MSSA'lara göre hastane kalış süresini 1.5 kat, ve hastane maliyetlerini de 2 kat artırdığı belirtilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada metisilin direncinin mortalitenin bağımsız öngörücüsü (independent predictor) olduğu bulunmuştur [129].

Çalışmamızın bir başka kısıtlayıcı noktası ise KNS türlerinin tanımlanmamış olmasıdır. Ancak bilindiği üzere KNS'ler içerisinde infeksiyon etkeni olarak sıklıkla (> % 70) *S.epidermidis* soyutlanmaktadır [9]. Diğer türlerin toplam KNS içerisindeki sıklığı çok azdır. Ülkemizdeki çoğu bakteriyoloji laboratuvarlarında KNS'ler için tür ayrımı yapılmamaktadır. Hem emek yoğun olması hem de maliyet/etkin olmaması nedeniyle tercih edilmez. Ancak bölümümüzden yapılan bir tez çalışmasında yine hastane kökenli KNS'lerin tür ayrımı API-Staph kiti (bioMérieux, Fransa) ile yapılmış olup KNS'lerin % 68.4'ünün *S.epidermidis*, % 13'ünün *S.haemolyticus* olduğu bulunmuştur. Toplam yedi farklı tür tespit edilen tez çalışmasında diğer türlerin sıklığı yüzde onun altındadır. Aynı tez çalışmasında tüm KNS'lerin metisilin direnci; oksasilin disk difüzyon yöntemi ile % 85 olarak bulunmuştur [130]. Bu bulgu çalışmamız sonuçlarıyla uyumludur.

S.aureus'larda sadece *S.aureus*'a özgü korunmuş genetik bölgelerin bulunması bu bakterinin genetik yöntemlerle daha kolay tanınmasını sağlamaktadır. *S.aureus*'a özgü olup KNS'lerde olmayan *femB* [74] ya da *nuc* [131] gibi DNA bölgelerinin *mecA* ile beraber amplifiye edilmesi (multiplex PCR) MRSA tanımlanmasını kolaylaştırmaktadır. *S.aureus*'lar için özel tanımlanmış bu korunmuş genetik bölgeler sayesinde, kan

kültürlerinin plaklara ekilmesine gerek kalmadan, daha hızlı bir biçimde MRSA tanımlanması sağlanmıştır [132]. Kan kültürü şişelerinde üreme sinyali alınır alınmaz plaklara ekim yapılmadan, direk kan kültürü şişelerinden alınan örneklerde PCR ile *mecA*'nın yanında *S.aureus* için korunmuş bölgelerden (*nuc*, *femB*, *femA*, *coa*) birinin de beraber saptanması sonuçların 36 – 48 saat erken raporlanmasını sağlayacaktır. Bu sonuç ile hem bakteri hem de direnç durumu 3 – 4 saatlik bir çalışma ile saptanabildiği için çok avantajlıdır. Ancak tüm KNS türlerinin hepsine birden özgü, korunmuş bir genetik dizi henüz bulunamamış olması çalışmamızda sadece *mecA* bakılabilmesine neden olmuştur.

Sonuç olarak stafilokoklarda heterojen dirençli suşlar nedeniyle metisilin direncinin fenotipik yöntemlerle gösterilmesi sık olmasa da yanlışlıklara neden olmaktadır. Bu sorunun özellikle KNS'lerde, *S.aures*'a göre daha da belirgin olduğu gözlenmektedir. Fenotipik yöntemlerin çevre şartlarından çok etkilendiği gözden önünde tutulmalı ve önerilen standartlar dışında uygulamalardan kaçınılmalıdır. Sefoksitin disk difüzyon yönteminin oksasiline göre metisilin direncini göstermedeki üstünlüğü bizim çalışmamızda da belgelenmiştir. Hem oksasilin hem sefoksitin diskinin antibiyogram plaklarına beraber konulup farklılıkların değerlendirilmesi bir yöntem olabilir. Yanlış pozitifliğin sefoksitin diskinde daha az olabileceği akılda tutulmalıdır. Disk difüzyon zon çapları azalmış izolatlarda MİK değerlendirilmelidir. Yoğun bakımlarındaki KNS'lerin metisilin direnci % 90'ları bulan merkezlerdeki KNS infeksiyonlarında (eğer KNS infeksiyonun gerçek etkeni olarak kabul edildiyse) glikopeptid antibiyotikler ampirik tedavide tercih olabilir. Ancak en ideali hem KNS'lerde hem de *S.aureus*'ta metisilin direncinin belirlenmesinde altın standart olarak kabul edilen PCR ile *mecA* geni saptanması yönteminin giderek rutin laboratuvarlarda da kullanıma girmesidir. Tüm olgularda olmasa da tedaviye klinik yanıtın olmadığı ya da direnç sonuçlarının çıkması için 36 – 48 saat bekleyemeyecek hastalar gibi seçilmiş olgularda moleküler yöntemlerin kullanılması bir tercih olabilir. Gelişmekte olan ülkeler için duyarlılık ve seçiciliğin her bir testte % 95'lerin üzerinde olması nedeniyle fenotipik yöntemler bu ülkelerde kullanılabilir. Bu konuda farklı ülkelerdeki farklı kuruluşların bilgilerini paylaşarak ortak bir standardın kabul edilmesinin gereği vardır. Aksi halde farklı standartları kabul eden ülkelerin antibiyotik dirençliliği konusunda aynı dilde konuşmaları, büyük karışıklıklara neden olacaktır.

7. KAYNAKLAR

- 1 Bannerman TL. *Staphylococcus, Micrococcus, and other catalase positive cocci that grow aerobically*. In Manual of Clinical Microbiology, Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover BC, eds. 8th ed. 2003, Washington, DC: ASM Press. p. 384-404.
- 2 Pfaller MA, Herwaldt LA. *Laboratory, clinical, and epidemiological aspects of coagulase-negative staphylococci*. Clin Microbiol Rev, 1988. **1**(3): p. 281-99.
- 3 Platt R, Goodman DA, Hopkins CC. *Epidemiology of nosocomial infections*. In Infectious Diseases, ed. B.J. Gorbach SL, Blacklow NR, 2nd ed. 1998, Philadelphia: W.B Saunders Comp. p. 108-122.
- 4 Kloos WE, Bannerman TL. *Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci*. Clin Microbiol Rev, 1994. **7**(1): p. 117-40.
- 5 Todar K. *Todar's Online Textbook of Bacteriology, The Bacterial Flora of Humans*, T. K, Editor. 2002, <http://textbookofbacteriology.net/normalflora.html>.
- 6 Bilgehan H. *Gram olumlu koklar*. Klinik mikrobiyoloji: özel bakteriyoloji ve bakteri enfeksiyonları, ed. H. Bilgehan. 2000, İzmir: Şafak Matbaası. p. 239-316.
- 7 Kloos WE, Schleifer KH. *Simplified scheme for routine identification of human Staphylococcus species*. J Clin Microbiol, 1975. **1**(1): p. 82-8.
- 8 *The gram-positive cocci: Part I: Staphylococci and related organisms*. In Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, Alen S, Koneman E, Janda W, Schreckenberger P, Winn W, Woods G, Procop G. eds. 5th ed. 2006, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p. 539-576.
- 9 Kawamura Y, Hou XD, Sultana F, et al. *Distribution of Staphylococcus species among human clinical specimens and emended description of Staphylococcus caprae*. J Clin Microbiol, 1998. **36**(7): p. 2038-42.
- 10 *Bacterial Nomenclature Up - To Date*, electronic document, available at: <http://www.dsmz.de/download/bactnom/bactname.pdf>
- 11 Carretto E, Barbarini D, Couto I, et al. *Identification of coagulase-negative staphylococci other than Staphylococcus epidermidis by automated ribotyping*. Clin Microbiol Infect, 2005. **11**(3): p. 177-84.
- 12 Kennedy HF, Morrison D, Kaufmann ME, et al. *Origins of Staphylococcus epidermidis and Streptococcus oralis causing bacteraemia in a bone marrow transplant patient*. J Med Microbiol, 2000. **49**(4): p. 367-70.

- 13 Greig JM, Wood MJ. *Staphylococcus lugdunensis* vertebral osteomyelitis. Clin Microbiol Infect, 2003. **9**(11): p. 1139-41.
- 14 Mermel LA, Farr BM, Sherertz RJ, et al. *Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections*. Clin Infect Dis, 2001. **32**(9): p. 1249-72.
- 15 O'Grady NP, Alexander M, Dellinger EP, et al. *Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections*. Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep, 2002. **51**(RR-10): p. 1-29.
- 16 Raad I, Alrahwani A, Rolston K. *Staphylococcus epidermidis: emerging resistance and need for alternative agents*. Clin Infect Dis, 1998. **26**(5): p. 1182-7.
- 17 Veenstra GJ, Cremers FF, van Dijk H, et al. *Ultrastructural organization and regulation of a biomaterial adhesin of Staphylococcus epidermidis*. J Bacteriol, 1996. **178**(2): p. 537-41.
- 18 Cucarella C, Solano C, Valle J, et al. *Bap, a Staphylococcus aureus surface protein involved in biofilm formation*. J Bacteriol, 2001. **183**(9): p. 2888-96.
- 19 Tormo MA, Knecht E, Gotz F, et al. *Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of Staphylococcus: evidence of horizontal gene transfer?* Microbiology, 2005. **151**(Pt 7): p. 2465-75.
- 20 Shiro H, Muller E, Gutierrez N, et al. *Transposon mutants of Staphylococcus epidermidis deficient in elaboration of capsular polysaccharide/adhesin and slime are avirulent in a rabbit model of endocarditis*. J Infect Dis, 1994. **169**(5): p. 1042-9.
- 21 Herrmann M, Hartleib J, Kehrel B, et al. *Interaction of von Willebrand factor with Staphylococcus aureus*. J Infect Dis, 1997. **176**(4): p. 984-91.
- 22 Rupp ME, Fey PD, Heilmann C, et al. *Characterization of the importance of Staphylococcus epidermidis autolysin and polysaccharide intercellular adhesin in the pathogenesis of intravascular catheter-associated infection in a rat model*. J Infect Dis, 2001. **183**(7): p. 1038-42.
- 23 Nilsson M, Frykberg N, Flock JI, Götz F. *A fibrinogen-binding protein of Staphylococcus epidermidis*. Infect Immun, 1998. **66**(6): p. 2666-73.
- 24 McCrea KW, Hartford O, Davis S, et al. *The serine-aspartate repeat (Sdr) protein family in Staphylococcus epidermidis*. Microbiology, 2000. **146** (Pt 7): p. 1535-46.
- 25 Hussain M, Heilmann C, Petters G, Herrmann N. *Teichoic acid enhances adhesion of Staphylococcus epidermidis to immobilized fibronectin*. Microb Pathog, 2001. **31**(6): p. 261-70.

- 26 Heilmann C, Gerke C, Perdreau-Remington F, Götz F. *Characterization of Tn917 insertion mutants of Staphylococcus epidermidis affected in biofilm formation*. Infect Immun, 1996. **64**(1): p. 277-82.
- 27 Fey PD, Joseph S, Götz F, et al. *Characterization of the relationship between polysaccharide intercellular adhesin and hemagglutination in Staphylococcus epidermidis*. J Infect Dis, 1999. **179**(6): p. 1561-4.
- 28 McKenney D, Hubner J, Muller E, et al. *The ica locus of Staphylococcus epidermidis encodes production of the capsular polysaccharide/adhesin*. Infect Immun, 1998. **66**(10): p. 4711-20.
- 29 Baldassarri L, Donelli G, Gelosia A, et al. *Purification and characterization of the staphylococcal slime-associated antigen and its occurrence among Staphylococcus epidermidis clinical isolates*. Infect Immun, 1996. **64**(8): p. 3410-5.
- 30 Hussain M, Herrmann M, von Eiff C, et al. *A 140-kilodalton extracellular protein is essential for the accumulation of Staphylococcus epidermidis strains on surfaces*. Infect Immun, 1997. **65**(2): p. 519-24.
- 31 von Eiff C, Peters G, Heilmann C. *Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci*. Lancet Infect Dis, 2002. **2**(11): p. 677-85.
- 32 Lindsay JA, Riley TV. *Staphylococcal iron requirements, siderophore production, and iron-regulated protein expression*. Infect Immun, 1994. **62**(6): p. 2309-14.
- 33 Gattermann S, Meyer HG, Wanner G. *Staphylococcus saprophyticus hemagglutinin is a 160-kilodalton surface polypeptide*. Infect Immun, 1992. **60**(10): p. 4127-32.
- 34 Gattermann S, Burkhard K, Marre R, Wanner G. *Identification and characterization of a surface-associated protein (Ssp) of Staphylococcus saprophyticus*. Infect Immun, 1992. **60**(3): p. 1055-60.
- 35 Gattermann S, John J, Marre R. *Staphylococcus saprophyticus urease: characterization and contribution to uropathogenicity in unobstructed urinary tract infection of rats*. Infect Immun, 1989. **57**(1): p. 110-6.
- 36 Patel R, Piper KE, Rouse MS, et al. *Frequency of isolation of Staphylococcus lugdunensis among staphylococcal isolates causing endocarditis: a 20-year experience*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(11): p. 4262-3.
- 37 Bellamy R, Barkham T. *Staphylococcus lugdunensis infection sites: predominance of abscesses in the pelvic girdle region*. Clin Infect Dis, 2002. **35**(3): p. E32-4.
- 38 Kaabia N, Scauarda D, Lenna G, Drancourt M. *Molecular identification of Staphylococcus lugdunensis in a patient with meningitis*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(5): p. 1824-5.

- 39 Haile DT, Hughes J, Vetter E, et al. *Frequency of isolation of Staphylococcus lugdunensis in consecutive urine cultures and relationship to urinary tract infection*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(2): p. 654-6.
- 40 Stout RD, Li Y, Miller AR, Lambe DW Jr. *Staphylococcal glycocalyx activates macrophage prostaglandin E2 and interleukin 1 production and modulates tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production*. Infect Immun, 1994. **62**(10): p. 4160-6.
- 41 Marshall SA, Wilke WW, Pfaller MA, Jones RN. *Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci from blood stream infections: frequency of occurrence, antimicrobial susceptibility, and molecular (mecA) characterization of oxacillin resistance in the SCOPE program*. Diagn Microbiol Infect Dis, 1998. **30**(3): p. 205-14.
- 42 Souvenir D, Donald E, Anderson JR, et al. *Blood cultures positive for coagulase-negative staphylococci: antisepsis, pseudobacteremia, and therapy of patients*. J Clin Microbiol, 1998. **36**(7): p. 1923-6.
- 43 Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, et al. *CDC definitions for nosocomial infections, 1988*. Am J Infect Control, 1988. **16**(3): p. 128-40.
- 44 Calfee DP, Farr BM. *Comparison of four antiseptic preparations for skin in the prevention of contamination of percutaneously drawn blood cultures: a randomized trial*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(5): p. 1660-5.
- 45 Richter SS, Beekmann SE, Croco JL, et al. *Minimizing the workup of blood culture contaminants: implementation and evaluation of a laboratory-based algorithm*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(7): p. 2437-44.
- 46 Humar A, Ostromecki A, Direnfeld J, et al. *Prospective randomized trial of 10% povidone-iodine versus 0.5% tincture of chlorhexidine as cutaneous antisepsis for prevention of central venous catheter infection*. Clin Infect Dis, 2000. **31**(4): p. 1001-7.
- 47 Cicalini S, Palmieri F, Petrosillo N. *Clinical review: new technologies for prevention of intravascular catheter-related infections*. Crit Care, 2004. **8**(3): p. 157-62.
- 48 Carratala J, Niubo J, Fernandez-Sevilla A, et al. *Randomized, double-blind trial of an antibiotic-lock technique for prevention of gram-positive central venous catheter-related infection in neutropenic patients with cancer*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(9): p. 2200-4.
- 49 Anthony TU, Rubin LG. *Stability of antibiotics used for antibiotic-lock treatment of infections of implantable venous devices (ports)*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(8): p. 2074-6.

- 50 Vercaigne LM, Zelenitsky SA, Findlay I, et al. *An in vitro evaluation of the antibiotic/heparin lock to sterilize central venous haemodialysis catheters.* J Antimicrob Chemother, 2002. **49**(4): p. 693-6.
- 51 Archer GL, Climo MW. *Staphylococcus epidermidis and other coagulase-negative Staphylococci.* In Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, ed. Gerald L. Mandell; John E. Bennett; Raphael Dolin. 6th ed. 2005, Philadelphia, Pennsylvania: Churchill Livingstone. p. 2352-2360.
- 52 Wolff M, Witchitz S, Chastang C, et al. *Prosthetic valve endocarditis in the ICU. Prognostic factors of overall survival in a series of 122 cases and consequences for treatment decision.* Chest, 1995. **108**(3): p. 688-94.
- 53 Sandoe JA, Kerr KG, Reynolds GW, Jain S. *Staphylococcus capitis endocarditis: two cases and review of the literature.* Heart, 1999. **82**(3): p. e1.
- 54 Karchmer AW, Archer GL, Dismukes WE. *Staphylococcus epidermidis causing prosthetic valve endocarditis: microbiologic and clinical observations as guides to therapy.* Ann Intern Med, 1983. **98**(4): p. 447-55.
- 55 Bille J. *Medical treatment of staphylococcal infective endocarditis.* Eur Heart J, 1995. **16 Suppl B**: p. 80-3.
- 56 Piper C, Korfer R, Horstkotte D. *Prosthetic valve endocarditis.* Heart, 2001. **85**(5):p.590-3.
- 57 Schoenbaum SC, Gardner P, Shillito J. *Infections of cerebrospinal fluid shunts: epidemiology, clinical manifestations, and therapy.* J Infect Dis, 1975. **131**(5): p. 543-52.
- 58 McGirt MJ, Zaas A, Fuchs HE, et al. *Risk factors for pediatric ventriculoperitoneal shunt infection and predictors of infectious pathogens.* Clin Infect Dis, 2003. **36**(7): p. 858-62.
- 59 Langley JM, LeBlanc JC, Drake J, Milner R. *Efficacy of antimicrobial prophylaxis in placement of cerebrospinal fluid shunts: meta-analysis.* Clin Infect Dis, 1993. **17**(1): p. 98-103.
- 60 Gokal R. *Long term peritoneal dialysis--is it a reality?* J Nephrol, 1999. **12**(6): p. 362-70.
- 61 von Graevenitz A, Amsterdam D. *Microbiological aspects of peritonitis associated with continuous ambulatory peritoneal dialysis.* Clin Microbiol Rev, 1992. **5**(1): p. 36-48.
- 62 Kim DK, Yoo TH, Ryu DR, et al. *Changes in causative organisms and their antimicrobial susceptibilities in CAPD peritonitis: a single center's experience over one decade.* Perit Dial Int, 2004. **24**(5): p. 424-32.

- 63 Lee YL, Casario T, Tran C, et al. *Nasal colonization by methicillin-resistant coagulase-negative staphylococcus in community skilled nursing facility patients.* Am J Infect Control, 2000. **28**(3): p. 269-72.
- 64 Kahlmeter G. *An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO.SENS Project.* J Antimicrob Chemother, 2003. **51**(1): p. 69-76.
- 65 Pavoni GL, Giannella M, Falcone M, et al. *Conservative medical therapy of prosthetic joint infections: retrospective analysis of an 8-year experience.* Clin Microbiol Infect, 2004. **10**(9): p. 831-7.
- 66 Turnidge J, Grayson ML. *Optimum treatment of staphylococcal infections.* Drugs, 1993. **45**(3): p. 353-66.
- 67 Livermore DM. *Antibiotic resistance in staphylococci.* Int J Antimicrob Agents, 2000. **16 Suppl 1**: p. S3-10.
- 68 Hartman BJ, Tomasz A. *Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in Staphylococcus aureus.* J Bacteriol, 1984. **158**(2): p. 513-6.
- 69 Hanssen AM, Ericson Sollid JU. *SCCmec in staphylococci: genes on the move.* FEMS Immunol Med Microbiol, 2006. **46**(1): p. 8-20.
- 70 Gülay Z, Vilken T, Morrison D. *Metisiline dirençli Staphylococcus aureus suşlarının SCCmec tiplerinin incelenmesi.* in XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi. 2004. 19-23 Eylül Kuşadası- Aydın.
- 71 Ryffel C, Strassle A, Kayser FH, Berger-Bachi B. *Mechanisms of heteroresistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus.* Antimicrob Agents Chemother, 1994. **38**(4): p. 724-8.
- 72 Huang MB, Gay TE, Baker CN, et al. *Two percent sodium chloride is required for susceptibility testing of staphylococci with oxacillin when using agar-based dilution methods.* J Clin Microbiol, 1993. **31**(10): p. 2683-8.
- 73 Chambers HF. *Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications.* Clin Microbiol Rev, 1997. **10**(4): p. 781-91.
- 74 Moore JE, Millar BC, Crowe M, et al. *Molecular determination of carriage of the mecA locus in coagulase negative staphylococci in screening swabs from patients in an intensive care unit.* Mol Pathol, 2003. **56**(1): p. 63.
- 75 Garcia de Viedma D, Rabadan PM, Diaz M, et al. *Heterogeneous antimicrobial resistance patterns in polyclonal populations of coagulase-negative staphylococci isolated from catheters.* J Clin Microbiol, 2000. **38**(4): p. 1359-63.

- 76 *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. National Committee for Clinical Laboratory Standards (M100- S15) NCCLS/CLSI. Vol. 15th Informational Supplement. 2005, Pennsylvania Wayne.
- 77 Mir N, Sanches M, Baquero F, et al. *Soft salt-mannitol agar-cloxacillin test: a highly specific bedside screening test for detection of colonization with methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol, 1998. **36**(4): p. 986-9.
- 78 Cavassini M, Wenger A, Jaton K, et al. *Evaluation of MRSA-Screen, a simple anti-PBP 2a slide latex agglutination kit, for rapid detection of methicillin resistance in Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol, 1999. **37**(5): p. 1591-4.
- 79 Brown DF, Walpole E. *Evaluation of the Mastalex latex agglutination test for methicillin resistance in Staphylococcus aureus grown on different screening media*. J Antimicrob Chemother, 2001. **47**(2): p. 187-9.
- 80 Chapin KC, Musgnug MC. *Evaluation of penicillin binding protein 2a latex agglutination assay for identification of methicillin-resistant Staphylococcus aureus directly from blood cultures*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(3): p. 1283-4.
- 81 Pechere JC. *Current and future management of infections due to methicillin-resistant staphylococci infections: the role of quinupristin/dalfopristin*. J Antimicrob Chemother, 1999. **44 Suppl A**: p. 11-8.
- 82 Hiramatsu K. *The emergence of Staphylococcus aureus with reduced susceptibility to vancomycin in Japan*. Am J Med, 1998. 104(5A): p. 7S-10S.
- 83 *Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus--Pennsylvania, 2002*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2002. **51**(40): p. 902.
- 84 Torun MM, Bahar H, Demirci M, et al. *Two heterogeneously vancomycin-intermediate clinical isolates of methicillin-sensitive and methicillin-resistant Staphylococcus aureus in a Turkish university hospital: brief report of a surveillance study*. Int J Antimicrob Agents, 2005. **26**(6): p. 508-10.
- 85 Srinivasan A, Dick JD, Perl TM. *Vancomycin resistance in staphylococci*. Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(3): p. 430-8.
- 86 Erdenizmenli M, Yapar N, Şengönül A, et al. *In-vitro activity of fusidic acid against methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. J Chemother, 2004. **16**(3): p. 310-1.
- 87 Rahman M. *Alternatives to vancomycin in treating methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections*. J Antimicrob Chemother, 1998. **41**(3): p. 325-8.
- 88 Agvald-Ohman C, Lund B, Edlund C. *Multiresistant coagulase-negative staphylococci disseminate frequently between intubated patients in a multidisciplinary intensive care unit*. Crit Care, 2004. **8**(1): p. R42-7.

- 89 Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, et al. *Survey of infections due to Staphylococcus species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999*. Clin Infect Dis, 2001. **32 Suppl 2**: p. S114-32.
- 90 Woodford N. *Biological counterstrike: antibiotic resistance mechanisms of Gram-positive cocci*. Clin Microbiol Infect, 2005. **11 Suppl 3**: p. 2-21.
- 91 Gür D. *Tablo6: Sıvı dilüsyon duyarlılık testlerinde kullanılacak antimikrobik ilaçların sulandırım şeması*. . NCCLS MİK testleri ek tablolar. M100-S13 (M7), ed. D. Gür. Ocak 2003, Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi. p. 62.
- 92 Morrison D. *Scottish MRSA Reference Laboratory Standard Operating Procedure: Achromopeptidase Solution Preparation*. 2004.
- 93 Murakami K, Minamide W, Wada K, et al. *Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction*. J Clin Microbiol, 1991. **29**(10): p. 2240-4.
- 94 Aksakoğlu G. *Sağlıkta Araştırma Teknikleri ve Analiz Yöntemleri*. 2001, İzmir: DEÜ Rektörlük Matbaası.
- 95 Rice LB, Sahm D, Bonomo RA. *Mechanisms of resistance to antimicrobial agents*. 8th ed. Manual of Clinical Microbiology, ed. B.E. Murray PR, Jorgensen JH, Pfaller MA, Yorken RH. 2003, Washington, DC: ASM Press. p. 1074-1101.
- 96 Gür D. *Aerop üreyen bakteriler için dilüsyon yöntemi ile antimikrobik duyarlılık testleri; Onaylanmış standart (NCCLS M7-A6 cilt 23 sayı 2)*. 6th ed. Ocak 2003, Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi. p. 1-34.
- 97 Rasheed JK, Tenover FC. *Detection and characterization of antimicrobial resistance genes in bacteria*. In Manual of Clinical Microbiology, ed. B.E. Murray PR, Jorgensen JH, Pfaller MA, Yorken RH. 8th ed. 2003, Washington, DC: ASM Press. p. 1196-1212.
- 98 McDonald CL, Maher WE, Fass RJ. *Revised interpretation of oxacillin MICs for Staphylococcus epidermidis based on mecA detection*. Antimicrob Agents Chemother, 1995. **39**(4): p. 982-4.
- 99 De Paulis AN, Predari SC, Chazarreta CD, Santoianni JE. *Five-test simple scheme for species-level identification of clinically significant coagulase-negative staphylococci*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(3): p. 1219-24.
- 100 Meriç M, Wilke A, Çağlayan C, Toker K. *Intensive care unit-acquired infections: incidence, risk factors and associated mortality in a Turkish university hospital*. Jpn J Infect Dis, 2005. **58**(5): p. 297-302.

- 101 Biedenbach DJ, Moet GJ, Jones RN. *Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002)*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2004. **50**(1): p. 59-69.
- 102 Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, et al. *Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study*. Clin Infect Dis, 2004. **39**(3): p. 309-17.
- 103 Çavuşoğlu C, Badak Z, Tünger A, et al. *Kan kültürlerinden soyutlanan staphylococcus aureus ve koagülaz negatif stafilokok izolatlarının fusidik aside in vitro duyarlılıkları*. Enfeksiyon Dergisi / Turkish Journal of Infection, 1998. **12**(4): p. 467-470.
- 104 Doğruman F, Akça G, Sipahi B, Sultan N. *Kan örneklerinden soyutlanan stafilokok suşlarının antibiyotiklere direnç durumları*. ANKEM dergisi, 2005. **19**(1): p. 14-16.
- 105 Doğan Ö, Çırak M, Engin D, Türet S. *Klinik örneklerden izole edilen stafilokoklarda metisilin direnci ve çeşitli antibiyotiklere in-vitro duyarlılıkları / Methicillin resistance and in-vitro susceptibility to various antibiotics of staphylococci isolated from clinical samples*. ANKEM Dergisi, 2005. **19**(1): p. 39-42
- 106 Yüce P, Demirdağ K, Kalkan A, et al. *Kan kültürlerinde izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları / The microorganisms isolated from blood samples and their susceptibility to antibiotics*. ANKEM Dergisi, 2005. **19**(1): p. 17-21.
- 107 *National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004*. Am J Infect Control, 2004. **32**(8): p. 470-85.
- 108 Erdenizmenli M, Yapar N, Senger SS, et al. *Investigation of colonization with methicillin-resistant and methicillin-susceptible Staphylococcus aureus in an outpatient population in Turkey*. Jpn J Infect Dis, 2004. **57**(4): p. 172-5.
- 109 Cauwelier B, Gordts B, Descheemaecker P, Van Landuyt H. *Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30 microg) for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2004. **23**(5): p. 389-92.
- 110 Felten A, Grandry B, Lagrange PH, Casin I. *Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(8): p. 2766-71.
- 111 Skov R, Smyth R, Clausen M, et al. *Evaluation of a cefoxitin 30 µg disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother, 2003. **52**(2): p. 204-7.

- 112 Velasco D, del Mar Tomas M, Cartelle M, et al. *Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother, 2005. **55**(3): p. 379-82.
- 113 Sharp SE, Warren JA, Thomson RB Jr. *Cefoxitin disk diffusion screen for confirmation of oxacillin-resistant Staphylococcus aureus isolates and utility in the clinical laboratory*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2005. **51**(1): p. 69-71.
- 114 Arya SC, Kapoor S, Agarwal N et al. *Comments on use of a disk diffusion method with cefoxitin (30 microg) to detect methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2004. **23**(11): p. 867-8.
- 115 Skov R, Smyth R, Larsen AR, et al. *Evaluation of cefoxitin 5 and 10 µg discs for the detection of methicillin resistance in staphylococci*. J Antimicrob Chemother, 2005. **55**(2): p. 157-61.
- 116 Frigatto EA, Machado AM, Pignatari AC, Gales AC. *Is the cefoxitin disk test reliable enough to detect oxacillin resistance in coagulase-negative staphylococci?* J Clin Microbiol, 2005. **43**(4): p. 2028-9.
- 117 Gal Z, Kovacs P, Hernadi F, et al. *Investigation of oxacillin-hydrolyzing beta-lactamase in borderline methicillin-resistant clinical isolates of Staphylococcus aureus*. Chemotherapy, 2001. **47**(4): p. 233-8.
- 118 Baldwin JN, Strickland RH, Cox MF. *Some properties of the beta-lactamase genes in Staphylococcus epidermidis*. Appl Microbiol, 1969. **18**(4): p. 628-30.
- 119 Narayani TV, Shanmugam J, Naseema K, et al. *Correlation between beta-lactamase production and MIC values against penicillin with coagulase negative staphylococci*. J Postgrad Med, 1989. **35**(3): p. 147-51.
- 120 *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST web sites*: http://www.escmid.org/sites/index_f.aspx?par=2.4
- 121 Kahlmeter G, Brown DFJ, Goldstein FW, et al *European antimicrobial MIC breakpoints through EUCAST and the National Breakpoint Committees*, electronic document. available at <http://www.srga.org/Eucastwt/bpsetting.htm>
- 122 *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti "Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu" (ADTS) Çalışma Grubu web sayfası*: <http://www.tmc-adts.org/indexalt.htm>.
- 123 *British Society of Antimicrobial Chemotherapy – BSAC: Methods for antimicrobial susceptibility testing*. http://www.bsac.org.uk/_db/_documents/version_5_.pdf.
- 124 *Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie recommendations for antimicrobial susceptibility testing* http://www.sfm.asso.fr/doc/download.php?doc=DiU8C&fic=casfm_vet_2006.pdf.

- 125 The Swedish Reference Group for Antibiotics (SRGA) and its subcommittee on methodology, recommendations for antimicrobial susceptibility testing. <http://www.srga.org/ZONTAB/zontab2b.htm>.
- 126 CDC, *Guideline for Isolation Precautions in Hospitals* 12/2005. Electronic document. available at http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/gl_isolation_ptI.html.
- 127 Hussain Z, Stoakes L, Massey V, et al. *Correlation of oxacillin MIC with mecA gene carriage in coagulase-negative staphylococci*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(2): p. 752-4.
- 128 Chandran AU, Rennie R. *Routine antimicrobial susceptibility testing of coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures: is it necessary?* Clin Microbiol Infect, 2005. **11**(12): p. 1037-40.
- 129 Lodise TP, McKinnon PS. *Clinical and economic impact of methicillin resistance in patients with Staphylococcus aureus bacteremia*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2005. **52**(2): p. 113-22.
- 130 Serin Senger S. *Hastanede yatan hastalarda kan kültürlerinden ardaşık olarak üreyen koagülaz negatif stafilokokların tiplendirilmesi ve infeksiyon ile ilişkisinin belirlenmesi*, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Tezi, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir, 2004.
- 131 Costa AM, Kay I, Palladino S. *Rapid detection of mecA and nuc genes in staphylococci by real-time multiplex polymerase chain reaction*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2005. **51**(1): p. 13-7.
- 132 Louie L, Goodfellow J, Mathieu P, et al. *Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci from blood culture bottles by using a multiplex PCR assay*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(8): p. 2786-90.

**T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI**

TEZ ONAY FORMU

TEZ SAHİBİNİN	
Adı Soyadı	: Hasan PEKSEL
Anabilim Dalı	: İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji
T.C. Kimlik Numarası	: 46294186280
E-Posta adresi	: hasanpeksel@yahoo.com
Tezin Adı	: Hastane Kökenli Koagülaz Negatif Stafilokok Suşlarında Oksasilin Direncinin Moleküler ve Geleneksel Yöntemlerle Araştırılması
Tez Danışmanları	: Prof. Dr. Ayşe YÜCE, Doç. Dr. Nur YAPAR
Tez Savunma ve Onay Tarihi	: 05.07.06 / 05.07.06

JÜRİ ÜYELERİNİN		
	ÜNVANI	ADI SOYADI
1	Prof. Dr.	Ayşe YÜCE
2	Prof. Dr.	Nedim ÇAKIR
3	Prof. Dr.	İ. Hakkı BAHAR
4	Prof. Dr.	Ekin ERTEM
5	Doç. Dr.	Nur YAPAR

**UYGUNDUR
05/07/2006**

**Prof.Dr. Şebnem Özkan
Dekan**