

T.C.
Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

**Kan Kültüründe Üreyen Gram Pozitif Koklarda
İdentifikasyon, *mecA* ve *van* Genlerinin Hızlı
Yöntemle Belirlenmesi**

UZMANLIK TEZİ

Hazırlayan: Dr. Barış GÜLHAN

Danışman: Prof. Dr. Adnan SUAY

DİYARBAKIR–2009

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL LİSTESİ	3
TABLO LİSTESİ	4
KISALTMALAR	5
1. GİRİŞ	6
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. Metisilin Direncinin Düzenlenmesi	12
2.1.1. Metisilin Direncini Etkileyen İnternal Faktörler	12
2.1.2. Metisilin Direncini Etkileyen Eksternal Faktörler	13
2.2. Vankomisin Direnci	13
2.2.1. Peptidoglikan Biyosentezindeki Değişiklik	15
2.2.2. vanA Operonunun Konjugal Transferi	15
2.3. vanA Tipi Direnç	19
2.4. vanB Tipi Direnç	20
2.5. vanC Tipi Direnç	20
2.6. vanD Tipi Direnç	21
2.7. vanE Tipi Direnç	21
2.8. vanG Tipi Direnç	21
2.9. Vankomisine Bağımlı Enterokoklar (VDE)	21
3. MATERYAL VE METOD	23
4. BULGULAR	26
5. TARTIŞMA	29
ÖZET	45
SUMMARY	47
KAYNAKLAR	49

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Stafilokokal beta-lataamaz sentezinin indüklenmesi ^a, *Staphylococcus aureus*'ta metisilin direncinin düzenlenmesi ^b. **sayfa 4**

Şekil 2: Stafilokokal Kaset Kromozom *mec* (SCC*mec*) tipleri **sayfa 5**

Şekil 3: Hibridizasyon Örnekleri **sayfa 23**

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: 55 örnekten Genotype®BC grampositive testi ve PHOENIX PMIC/ID Panel ile yapılan identifikasyonların karşılaştırılması **sayfa 22**

KISALTMALAR

- MRSA:** metisiline dirençli *S.aureus*
PBP2a: penisilin bağlayan protein 2a
MİK: minimum inhibitör konsantrasyon
MSSA: metisiline duyarlı *S.aureus*
SCC*mec*: Stafilokokal Kaset Kromozom *mec*
KNS: koagülaz negatif stafilokok
MRKNS: metisiline dirençli KNS
PVL: Panton-Valentin Lökosidin
MLST: multilokus sekans tipleme
fem: factors essential for resistance to methicillin
VISA: vancomycin intermediate *S.aureus*
GISA: glikopeptidlere orta dirençli *S.aureus*
VRSA: vankomisine dirençli *S.aureus*
VRE: vankomisine dirençli enterokok
GİS: gastrointestinal sistem
D-ala-D-ala: D-alanil-D-alanin
D-ala-D-Ser: D-alanin-D-Serin
VDE: Vankomisine Bağımlı Enterokok
PFGE: pulsed-field jel elektroforez
AP: alkalın fosfataz
UC: Universal kontrol
CC: Konjugat kontrol
HPA: hybridization protection assay
TRF: terminal restriksiyon fragman
T-RFLP: terminal restriksiyon fragman uzunluk polimorfizmi
ITS: internal transcribed spacer
MGE: mikroçip jel elektroforez
PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu
RT-PCR: real-time PCR
FISH: floresan in situ hibridizasyon
GSPBRT-PCR: Gram stain-specific-probe-based real-time PCR
PNA: peptid nükleik asit problemleri

1. GİRİŞ

Kan kültürlerinden mikroorganizmaların hızlı identifikasyonları antimikrobiyal tedavinin erken başlaması ve tedavi başarısı için çok önemlidir.

Sepsis hastalarında mortalite %30-70 arasında değişmektedir (1). Septisemik hastaların kan kültürlerinden bakteriyel izolatların tespiti tanısal mikrobiyolojide hasta morbidite ve mortalitesi açısından önemli bir role sahiptir. Hastalardaki bakteriyel patojenlerin hızlı rapor edilmesinin sonuçlar ve hastane maliyetleri açısından pozitif etkisi bir çok çalışmada ifade edilmiştir (2-5). Sepsisin nedeni olan patojenin erken tespiti tedaviye erken başlamayı sağlamakta ve mortaliteyi azaltmaktadır. Ayrıca hastanede kalış süresini ve hastane maliyetlerini de azaltmaktadır. Olası kontaminant etkenlerin erkenden tespiti gereksiz antibiyotik kullanımının önüne geçmekte, dolayısıyla ileride gelişebilecek antimikrobiyal direnç de engellenmektedir.

Kullandığımız otomatize ve devamlı monitörize edilen kan kültür sistemleri bakterilerin tespit edilme zamanında önemli bir kısalma sağlamıştır.(2,6). Bir çok laboratuvar da standart laboratuvar tekniği olarak genellikle sürekli okuma yapan bu sistemler kullanılmaktadır. Bu otomatize sistemler mikroorganizmanın ürettiği CO₂'yi monitörize eden sistemlerdir. Pozitif sinyal alındıktan sonra subkültürler, daha sonra identifikasyon ve antibiyogram yapılmaktadır. Bu süre pozitif sinyalden sonra 2 günlük bir zaman almaktadır. Ancak optimum tedaviye yönelmek için daha da hızlı identifikasyon sistemleri gerekmektedir.

Bu amaçla pozitif BACTEC™ PLUS+ Aerobic/F ve BACTEC™ PEDS PLUS/F kan kültür şişelerinden (aerobic ve pediatrik şişeler) etkenlerin hızlı identifikasyonu için yeni geliştirilen bir teknoloji kullanılmıştır. Test ile en çok saptanan bakteriyel sepsis etkenleri tespit edilebilmekte, ayrıca metisilin ve vankomisin direncinin terapötik rejimler üzerindeki etkisi nedeniyle *mecA* ve *van* genlerinin tespiti de aynı panellerde yapılabilmektedir. Genotype® BC grampositive testi, DNA• STRIP® teknolojisine dayalı, 17 Gram pozitif bakteri türünü, aynı zamanda metisilin ve vankomisin direncini (*mecA*, *vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *van C2/C3* genleri) tespit eden problemlerin olduğu bir paneli içermektedir. Genotype teknolojisi biotinlenmiş primerlerle DNA'nın multiplex amplifikasyonunu takiben membrana bağlı problemler kullanılarak hibridizasyona dayalı, sepsis etkeninin hızlı tanısı için kullanılan genetik bir testtir.

Bu çalışmada Genotype® BC grampositive test kitleri kullanılarak hızlı tanı yapılması amaçlanmış, testin değerlendirilmesi yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Gram pozitif bakterilerin antibiyotik dirençleri günümüz bilim dünyasının en çok uğraş verdiği konulardan biridir. *Staphylococcus aureus* ağır infeksiyonlara neden olması, çevresel koşullara iyi uyum sağlaması nedeniyle en çok ilgi çeken patojendir. Etkin antibiyotiklere rağmen *S.aureus* bakteriyemisindeki mortalite %20-40 arasındadır (7). Davis ve Fuller (8) laboratuvarlarında kandan en sık izole ettikleri mikroorganizmaları sırayla koagülaz negatif stafilocoklar, *S.aureus*, *Escherichia coli*, enterokoklar ve *Streptococcus pneumoniae* olarak bildirmişlerdir.

Gram pozitif bakteriler, özellikle de stafilocoklar ve enterokoklar hastane kökenli kan ve dolaşım infeksiyonlarının çoğundan sorumlu olan patojenlerdir. Son yıllarda bu bakteri türlerinin direnç özelliklerinde belirgin bir artış meydana gelmesi tedavi seçeneklerini kısıtlamıştır (9). Dünyada ve ülkemizde hastane kökenli *Staphylococcus aureus* izolatlarının % 40-60'ı metisiline dirençlidir (10,11). Enterokok türlerinde glikopeptid direnci bu bakterilerle gelişen infeksiyonların tedavisinde sorun oluşturmakta, aynı zamanda stafilocoklar gibi diğer Gram pozitif türlere direnç genlerinin aktarılabilmesi nedeniyle de önem taşımaktadır (9).

Stafilocoklarda 1941'de penisilin G'nin tedaviye girmesi ile beta-laktamaz üretimine bağlı direnç gelişmesi başlamış, bundan sonra da kullanıma giren her yeni antibiyotiğe karşı direnç gelişimi olmuştur (9). 1959 yılında penisilinazın amid bağa ulaşmasını engellemek amacıyla benzil penisilindeki fenoksi grubu yerine metoksi grubunun eklenmesiyle metisilin elde edilmiştir. Fakat klinik kullanımdan kısa bir süre sonra 1961 yılında ilk metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) suşu tespit edilmiştir (7). İlk MRSA olguları metisilin kullanıma girmesinden iki yıl sonra 1961 yılında İngiltere'den bildirilmiştir. O zamandan günümüze MRSA klonları tüm dünyada, bu arada ülkemizde de yayılmıştır (9). Ülkemizden 11 laboratuvarın katıldığı ve Akdeniz ülkelerinde antibiyotik direncini izlemeyi hedefleyen ARMed çalışmasına göre kan kültürlerinden izole edilen *S.aureus* izolatları arasında MRSA oranı 2003, 2004 ve 2005 yılları için sırası ile % 43, % 40 ve % 35'tir (10). Metisilin direncinden sorumlu mekanizmalar başta *mecA* geni varlığına bağlı penisiline bağlanan protein 2a (PBP 2a) yapımı olmak üzere PBP'lerin beta-laktam antibiyotiklere afinitelerinde azalma ve beta-laktamazların aşırı yapımıdır (7).

Stafilocoklarda metisilin direnci tüm beta-laktamlara afinitesi düşük olan, bu ajanların varlığında hücre duvar sentezini sürdürülebildiği yeni bir PBP olan PBP 2a (PBP 2') yapımına bağlıdır (12-14). Beta-laktam antibiyotikler duyarlı suşlarda hücre duvarındaki PBP'lere

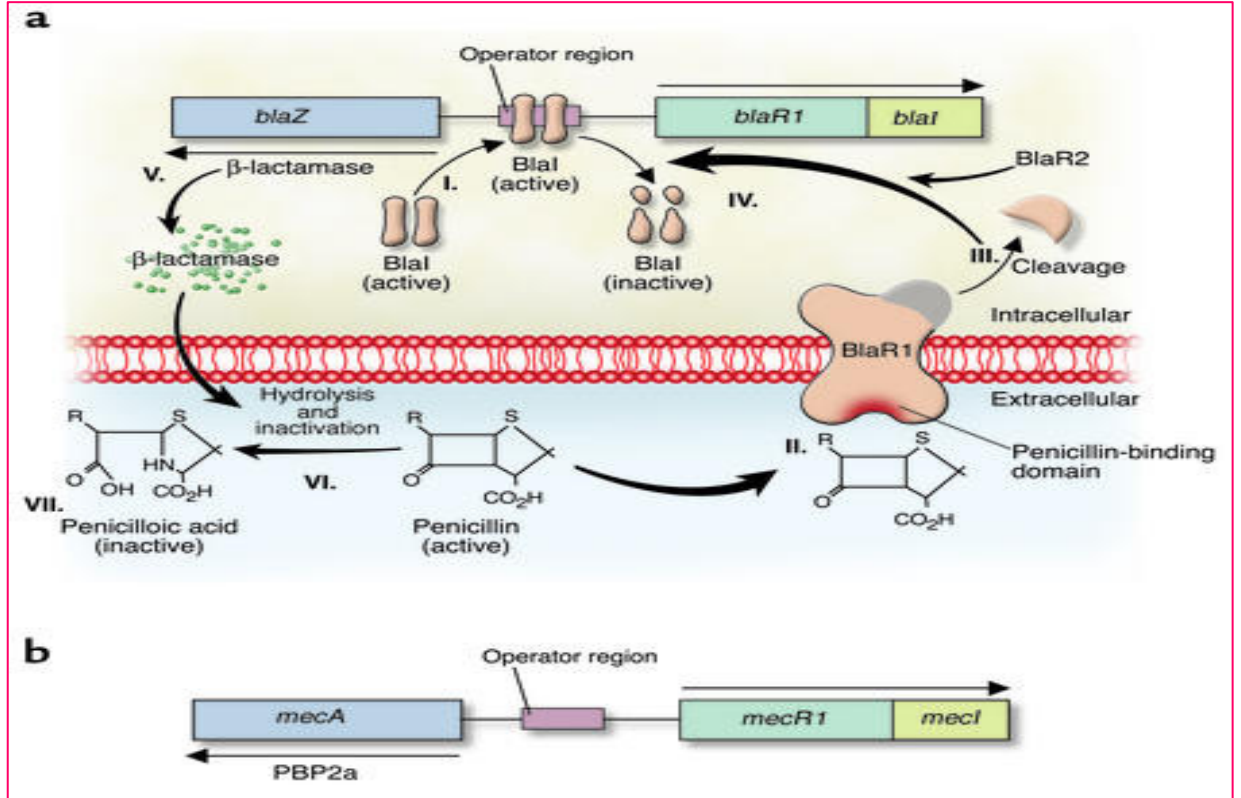
(transpeptidaz ve karboksipeptidaz enzimleri) bağlanarak, peptidoglikanı sağlamlaştıracak çapraz bağların oluşumunu engellerler. Aynı zamanda otolizinleri uyararak hücre ölümünü sağlarlar. Ancak metisiline dirençli suşlarda beta-laktam antibiyotikler PBP 2a'ya bağlanamadığı için, tüm beta-laktam ajanlara karşı direnç görülür. PBP2a varlığında metisilin, nafsilin ve oksasilin gibi semisentetik penisilinazlara dirençli beta-laktamlara ve tüm sefalosporinlere direnç kazanılır. Stafilokoklarda PBP 2a, *mecA* adı verilen bir gen tarafından kodlanır.

mecA ekspresyonu, baskılayıcı bir gen olan transkripsiyonun regülatörü *mecI* ve membranda yer alan ve beta-laktam varlığını saptayan bir sinyal iletilici olan *mecR1*'in kontrolü altındadır. *mecA* ve *mecR1* arasında bu genlerin promoterleri ve *mecA* geninin -10 sekansı ile *mecR1*'in -35 sekansı arasında operatör bölge bulunmaktadır. Antibiyotiksiz ortamda *mecI*, hem *mecA* hem de *mecR1-mecI*'nin transkripsiyonunu engeller. Beta-laktam antibiyotik varlığında ise, önce *mecR1* otokatalitik bir süreçle kesilir ve sitoplazmik kısmındaki bir metalloproteaz bölümü aktif hale gelir. Metalloproteaz, *mecA*'nın promoter bölgesine bağlanmış olan *mecI*'yi keser. Böylelikle *mecA* transkripsiyonu ve PBP 2a sentezi gerçekleşir (şekil 1) (7,9). *mecR1-mecI* dışında, betalaktamaz yapımı ile ilgili *blaI-blaR1* sistemi de *mecA* transkripsiyonunu etkiler. *mecR1* ve *mecI*'nin, plazmid aracılı stafilokokal beta-laktamaz geni olan *blaZ*'nin ekspresyonunda rolü olan *blaR1* ve *blaI* ile protein sekans homolojisi yüksektir. Bu da *mecA*'nın regülatör genlerini *blaZ* sisteminden aldığını düşündürmektedir. Fakat beta-laktamaz sentezinin aksine PBP2a'nın ekspresyonu normal regülatör genleri (*mecA* ve *mecR1-mecI*) taşıyan suşlarda güçlü bir şekilde indüklenemez ve ayrıca indüksiyon da çok daha yavaştır. Beta-laktamaz ekspresyonu için 15 dakika gerekirken PBP2a sentezi için bu süre 48 saate kadar uzayabilmektedir. Nedeni *mecI*'nin *mecA* transkripsiyonunun sıkı bir regülatörü olması ve beta-laktam antibiyotiklerin çoğunun *mecR1*'i etkin bir biçimde aktive edememesidir. Sonuç olarak bazı suşlar *mecA* genini taşımalarına rağmen metisilin duyarlıdırlar ve bu suşlar pre-MRSA olarak tanımlanırlar (7).

mecI veya *mecA* promoter/operatör bölgelerinde mutasyonu veya delesyonu olan bazı *S.aureus* suşlarında antibiyotik kullanımı selektif baskısına bağlı olarak represyonun inaktif hale geçmesi sonucu yapısal PBP2a ekspresyonu gelişebilir. Bu mutasyonu taşıyan suşlarda homojen veya heterojen direnç fenotipi gelişir. Homojen direnç fenotipinde popülasyonu oluşturan hücrelerin tümünde yüksek düzeyde metisilin direnci (>128 mg/L) vardır. Heterojen direnç fenotipinde hücrelerin çok küçük bir kısmında yüksek düzeyde metisilin direnci vardır. MRSA popülasyonu içinde aslında küçük bir kısım yüksek düzey direnç eksprese eder (heterojen direnç özelliği). Bu nedenle metisilin direnç fenotipini saptamak güç olabilir.

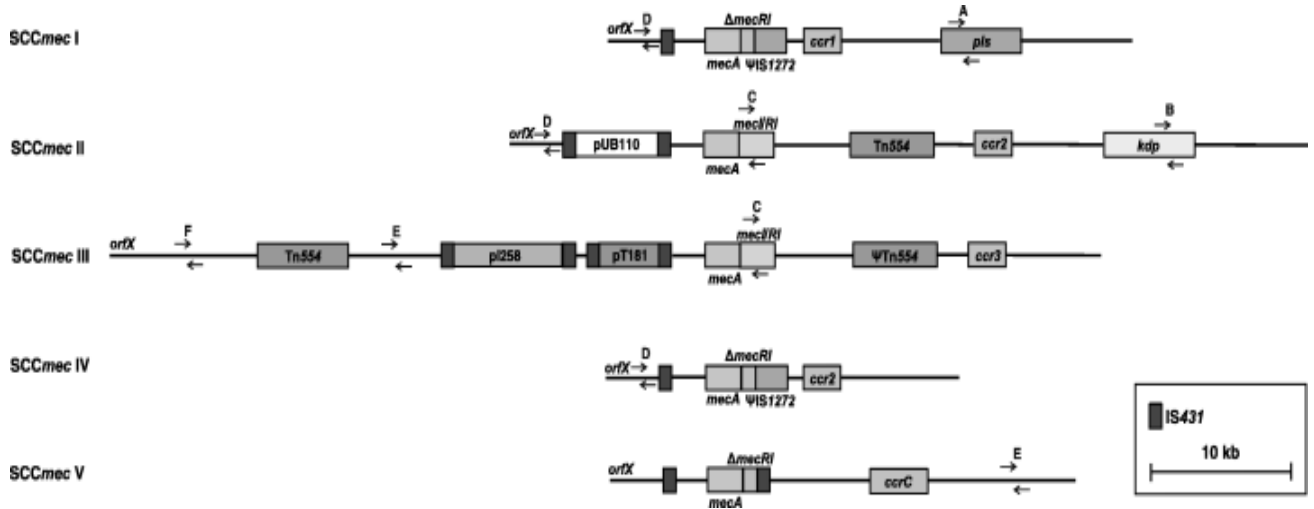
Laboratuvarlarda metisilin direncini açığa çıkaracak çeşitli teknikler [örneğin uzun süreli inkübasyon (24 saat); düşük ısı (35°C); tuz; oksasiline yerine *mecA*'yı daha iyi indükleyen sefoksitin kullanımı gibi] uygulanmaktadır. Son yıllarda, klasik fenotipik yöntemler yerine doğrudan *mecA*'yı veya PBP 2a'yı saptayacak yöntemler de rutin kullanıma girmiştir (7,13).

Şekil 1: Stafilokokal beta-laktamaz sentezinin indüklenmesi ^a, *Staphylococcus aureus*'ta metisilin direncinin düzenlenmesi ^b.



PBP 2a aracılıklı beta-laktam direncini, *fem* ve *aux* olarak adlandırılan diğer genetik lokuslar ile otolizinlerin aktivitesi de etkiler. Örneğin pentaglisin köprülerinin oluşumundan sorumlu *fem* mutasyonlarında *mecA* varlığına karşın beta-laktam minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) düzeyleri yükselmez (13). PBP 2a, *S.aureus* için ancak antibiyotik varlığında başvurulmuş, etkinlik açısından fazla başarılı olmayan bir enzimdir. MRSA suşları beta-laktam varlığında üretildiğinde çapraz bağ sayısının normal üreme koşullarına göre çok daha az olduğu görülür. Üreme hızı da metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA) suşlarına göre daha düşüktür. Bu durum, MRSA suşlarının dirence karşılık verdikleri bir “dayanıklılık ödünü”dür (fitness cost).

Şekil 2: Stafilokokal Kaset Kromozom *mec* (SCC*mec*) tipleri



Katayama ve ark. (15) tarafından tanımlanan *mecA* geni, kromozomda Stafilokokal Kaset (Cassette) Kromozom(Chromosome) *mec* (SCC*mec*) olarak adlandırılan büyük bir hareketli eleman üzerinde yer alır. SCC*mec* hareketli bir element olup, hareket *ccrA* ve *ccrB* genleri tarafından oluşturulmaktadır. Günümüze kadar beş SCC*mec* tipi (Tip I-V) bildirilmiştir (12,16,17). Farklı tiplerdeki SCC*mec* elemanlarının büyüklüğü 20.9 kb'den 66.9 kb'ye kadar değişmektedir (Şekil 2).

SCC*mec* tip I (34.3 kb), IV (20.9-24.3 kb) ve V (28 kb), sadece beta-laktam direncini kodlarken, SCC*mec* tip II (53.0 kb) ve III (66.9 kb) çoklu dirence yol açar. SCC*mec* tip II ve III MRSA suşlarının önemli bir özelliği de hastane ortamında bulunmalarıdır. SCC*mec* tip IV MRSA ise daha çok önceden hastane ortamında bulunmamış kişilerde saptanmıştır. Bu elemanın diğerlerinden en önemli farkı daha küçük ve genetik olarak daha hareketli olması, bunun yanında ek antimikrobiyal direnç geni taşımasıdır. Toplumdan kazanılmış MRSA infeksiyonlarının analizi sonucu, suşların hepsinde SCC*mec* tip IV saptanmıştır. Tipik 40 kb'lık stafilokok bakteriyofajından küçük olmaları tip IV SCC*mec*'in transdüksiyon yolu ile geçtiğini düşündürmektedir (13). SCC*mec* tip I, tip II ve tip III'ün yapılarının büyük olması böyle bir transferi olanaksız kılmaktadır. *mec* bölgesinin stafilokok suşları arasında geçişi hiçbir zaman tam olarak saptanamamıştır. Bu nedenle MRSA'ların kurumlarda yayılımı daha çok dirençli bakterilerin, büyük olasılıkla geçici olarak kolonize olan sağlık çalışanlarının ellerinden ve diğer hastalardan geçişine bağlıdır (13).

S.aureus izolatlarındaki SCCmec elemanlarının kaynağı kesin bilinmemekle birlikte, bu kasetin G+C içeriğinin kromozomun geri kalanından farklı olması nedeniyle başka bir türden geldiğine inanılmaktadır. Kemirgen ve memelilerde bulunan bir stafilokok türü olan *S.sciuri*'de bir *mecA* homoloğu tanımlanmıştır (7,13). *S.sciuri* izolatlarının taşıdığı SCC kasetinin MRSA SCCmec elemanları ile % 87.8 uyumlu olduğunun gösterilmesi bu türün SCCmec elemanının kaynağı olabileceğini düşündürmüştür. Dolayısıyla, koagülaz negatif stafilokoklardaki (KNS) SCCmec elemanları veya *mecA* içermeyen diğer SCC kasetleri, *S.aureus*'un antibiyotik direnci için bir rezervuar oluşturuyor gibi gözükmektedir. SCCmec kasetlerinin in-vivo ortamda aktarılabildiğine dair kanıtlar bulunmaktadır (18,19). Bir yenidoğanda epidemik bir MSSA izolatı ile, bununla izogenik bir MRSA izolatı eş zamanlı olarak saptanmış ve MRSA'daki *mecA* geninin yine aynı bebekte bulunan bir *S.epidermidis* suşundaki *mecA* ile identik olduğu gösterilmiştir (18).

Hastane kökenli suşlarda en sık bulunan SCCmec tipleri tip II ve III'tür. Bunlar içerisinde daha fazla direnç elemanı bulunduğu için bunları taşıyan klonal soylar daha dirençlidir. MRSA izolatları tüm beta-laktamlar ve tedavide kullanılan diğer antibiyotik sınıflarına da dirençli olduğu için, yeni antibiyotiklerin devreye girmediği uzun yıllar boyunca glikopeptid antibiyotikler (vankomisin ve teikoplanin) tek tedavi seçeneği olarak kalmıştır.

Toplum kaynaklı *S.aureus* izolatlarında SCCmec kompleksine çok az ekleme olmuştur. Bu nedenle bu izolatlardaki SCCmec bölgeleri oldukça küçüktür (20-30 kb) ve izolatları sadece beta-laktamlara dirençlidir. Hastane izolatlarında zaman içinde çoklu dirence yol açan plazmid ve transpozonların birikimi nedeniyle SCCmec bölgeleri daha büyüktür (13,15). SCCmec KNS türlerinde daha yüksek oranda bulunmaktadır ve *S.aureus*'taki dizilerle çok benzerdir (20).

İlk kez 1998'de ABD'de (21), ardından Avustralya'da yerli toplumunda (22) daha önce bilinen risk faktörleri ve hastanede yatış öyküsü bulunmayan çocuklarda MRSA infeksiyonları bildirilmiştir. Bu izolatlar toplum kökenli MRSA olarak adlandırılmaktadır. 2002 yılından itibaren toplum kökenli izolatların tüm dünyada büyüyen bir problem olarak karşımıza çıktığı görülmektedir. Toplum kökenli MRSA en sık nekrotik apselerle seyreden deri ve yumuşak doku infeksiyonları oluşturmaktadır. Bunun yanı sıra nekrotizan pnömoni gibi yaşamı tehdit edici infeksiyonlar da yapabilmektedir. Benzer klinik bulgular oluşturan MSSA izolatlarında olduğu gibi, nekrotizan infeksiyonlar yapan toplum kökenli MRSA suşlarında da sıklıkla, faj Φ Sa2 üzerinde taşınan *lukS* ve *lukF* genlerince kodlanan Panton-Valentin Lökositin (PVL) toksini bulunmaktadır. PVL'nin toplum kökenli MRSA infeksiyonlarındaki rolü tam açıklanmamakla birlikte arada güçlü bir epidemiyolojik ilişki bulunmaktadır. Toplum kökenli MRSA izolatlarının bir diğer özelliği de hemen her zaman SCCmec tip IV taşımalarıdır. Bu

suşların toplumda yaygın olarak bulunan ve PVL taşıyan MSSA izolatlarına (ör. ST30 gibi) SCC*mec* tip IV girmesi ile ortaya çıktığı düşünülmektedir.

Ülkemizde toplum kökenli MRSA yaygın değildir. Literatürde ülkemizde yapılmış SCC*mec* tipi, PVL saptanması ve multilokus sekans tipleme (MLST) analizi ile tam bir çalışmaya rastlanmamaktadır. MRSA izolatlarının bu sayılan yöntemlerle incelenmesi toplum kökenli izolatların varlığını kanıtlayabilir. Yine bazı toplum kökenli izolatların metisilin MİK değerleri çok düşük olduğu için bunlar yanlışlıkla MSSA sanılabilir. Bu nedenle PVL üreten izolatlarda *mecA* PCR yapılması da önerilebilir (9).

2.1 Metisilin Direncinin Düzenlenmesi

PBP2a sentezi *mecI* ve *mecR1* proteinleri ve varsa *blaZ* sisteminin regülatör sinyal verici proteinleri aracılığıyla düzenlenir. PBP2a sentezinin hem *mec* hem de *blaZ* sisteminin proteinleri aracılığıyla bu denli sıkı biçimde denetlenmesinin nedeni PBP2a'nın aşırı yapımının bakteri için toksik olabilmesidir.

Metisilin direncinin düzenlenmesinden sorumlu diğer gen serisi “factors essential for resistance to methicillin” (*fem*) genleridir. Metisilin direncini etkileyen internal ve eksternal faktörler de vardır (7).

2.1.1 Metisilin Direncini Etkileyen İnternal Faktörler:

Genetik ve biyokimyasal çalışmalar PBP2a'nın fonksiyon görebilmesi için bazı substratlara ihtiyacı olduğunu ortaya koymuştur. Bu substratların oluşumunu engelleyen bir faktörün metisilin direncini etkileme ihtimali vardır. Yapılan çalışmalarda PBP2a'nın şunlara ihtiyacı olduğu gösterilmiştir.

- a- **Belirli Uzunluktaki Glikan Zincileri:** Pbp2A'nın yapısal analizi hem transglikozilaz, hem de transpeptidaz domainleri olduğunu göstermiştir. Buna karşın transglikozilaz domainlerinin işlevsel olup olmadığı açıklık kazanmamıştır. PBP2a, PBP2'nin transglikozilaz aktivitesine bağımlıdır. Yani PBP2a'nın doğru çalışabilmesi için PBP2'nin transglikozilaz domainine gereksinme vardır. Beta-laktamlar yüksek molekül ağırlıklı PBP'lerin transpeptidaz domain'ini inhibe ederken transglikozilaz domain'e bir etki göstermezler. Transglikozilaz”domain” in inaktivasyonu daha kısa olan glikan zincirlerin sayısında artışa ve metisilin direncinde belirgin azalmaya neden olur. Bu nedenle PBP'in transglikozilaz domain'ini hedef alan bileşikler metisilin dirençli suşların tedavisinde gelecek vaat etmektedir (13).

- b- **Normal Peptid Konfigürasyonu İçin Gerekli Kök Peptidler:** Ortama glisin konulduğunda peptidoglikan zincirinin sonunda normal şartlarda olması gereken iki alanin rezidüsünün yerini, iki glisin rezidüsünün alması metisilin direncinde azalmaya ve homojen fenotipin heterojen fenotipe dönüşmesine neden olmaktadır. UDP-N-asetil-muramil tripeptid sentetazı kodlayan gen olan *murE* (*femF*)'nin inaktivasyonu sonucunda da metisilin direncinde azalma olur. Nedeni hücre duvarı öncülleri havuzundaki UDP bağlı muramil pentapeptidlerin azalması ve UDP bağlı muramil dipeptidlerin birikmesidir. Bu sonuçlar PBP2a'nın doğru uzunlukta ve normal seride peptid elde edilmesi için kök peptidlerine ihtiyaç olduğuna işaret etmektedir.
- c- **İntakt Olmak İçin Gerekli Penta-Glisin Çapraz Köprü:** Glikan zincirlerini birbirine bağlayan penta-glisin çapraz köprünün yapımından *femA*, *femB* ve *femX* sorumludur. *femX* birinci glisini, *femA* ikinci ve üçüncü glisinleri, *femB*'de dördüncü ve beşinci glisinleri köprüye sokar. *femA* ve *femB* arasında değişme olmadığından bu proteinlerden herhangi birini kodlayan genlerin inaktivasyonu sonucu mono veya tri-glisinli çapraz köprüler oluşur. *femA* veya *femB* genlerinden herhangi birinin inaktivasyonu sonucu bakteri için letal olduğundan, *femA* ve *femB* proteinleri ilaç çalışmalarının yeni hedefleridir. (7).

2.1.2 Metisilin Direncini Etkileyen Eksternal Faktörler:

Tuz konsantrasyonu, pH, ortam kompozisyonu, osmolarite ve ortam sıcaklığı metisilin direncini etkileyen eksternal faktörlerdir. Yüksek (%6.5) NaCl konsantrasyonunun ve düşük sıcaklığın (30-35°C) metisilin direncini nasıl arttırdığı tam olarak bilinmemektedir. İnkübasyon süresinin 18 saat yerine 24 saate uzatılmasının da metisilin dirençli suşların saptanma şansını arttırdığı bilinmektedir. Gelecekte metisilin direncinin saptanmasında *mecA* genini saptamaya yönelik PCR yönteminin laboratuvarlarda yaygınlaşması beklenmektedir (7).

2.2 Vankomisin Direnci

Metisiline dirençli stafilokok, *Clostridium difficile* ve enterokok infeksiyonlarının tedavisinde vankomisin kullanımındaki artış, vankomisine dirençli stafilokokların ortaya çıkışına önemli katkıda bulunmuştur. İlk kez 1997 yılında Japonya'dan vankomisine ve teikoplanine orta düzeyde (vankomisin MİK değeri 8 µg/mL) dirençli *S.aureus* (VISA; vancomycin intermediate *S.aureus*) suşu bildirilmiştir (23). Bu ilk bildirimi, çeşitli ülkelerde

yapılmış ve benzer yöntemlerle azalmış duyarlılığı ortaya koyan diğer çalışmalar izlemiştir. Bu suşların ortak özellikleri hepsinin MRSA olması ve klonal olmamalarıdır (7).

S.aureus'ta glikopeptidlere karşı mutasyonel direnç tam bir dirençten çok azalmış duyarlılık şeklinde gözlenen, klinikte ender olan bir olaydır. VISA veya glikopeptidlere orta dirençli *S.aureus* (GISA) olarak tanımlanan dirençli suşlar için vankomisin MİK'leri 4-8 µg/mL aralığındadır. Bununla birlikte bu kültürler içinde direnci daha yüksek düzeyde ifade eden küçük popülasyonlar bulunmaktadır. Hayvan çalışmaları VISA suşlarındaki direnç düzeyinin tedavi etkinliğini azaltacağını düşündürmektedir.

VISA fenotipinin tam mekanizması bilinmemekle birlikte, *S.aureus*'un düzenleyici genlerindeki mutasyonlara bağlı olarak, bu suşlarda bağlantısız prekürsörlerin sayısında artış olduğu ve anormal septaların oluştuğu, hücre duvarının kalınlaştığı, duvardaki çapraz bağ sayısının azaldığı ve bu kalınlaşan duvarın ortamdaki vankomisin moleküllerini sitoplazmik membranın iç yüzeyindeki esas hedefleri olan yeni prekürsörlere ulaşmadan tükettiği üzerinde durulmaktadır (24,25). Hücre duvarının katmanları arasında biriken vankomisin molekülleri ayrıca adeta bir tıkaç gibi davranarak yeni ilaç moleküllerinin geçişine de izin vermemektedir (9). Bu fenotipe uyan bir bulgu da klinikte izole edilen tüm GISA'larda peptidoglikanın çapraz bağlanmasında iş gören PBP4'ün saptanamayacak kadar az miktarda olmasıdır (26). PBP4'ün çok kopya sayılı plazmidde düzeltilmesi ile çapraz bağlanma ve bu suşlarda vankomisine duyarlılığı da düzeltilmektedir. İlk çalışmalar vankomisin direncinin ifadesinde bir dizi genin rol oynadığını, fenotipin farklı suşlarda farklı genetik mutasyonlara bağlı olduğunu ve vankomisine dirençli mutantların hipermutatör suşlardan türediğini düşündürmektedir. Vankomisin direncinin vankomisinin büyük bölümünün sitoplazmadan çıkarken gerçek hedefleri olan lipid II'ye tutunmuş olan peptidoglikan prekürsörüne ulaşmadan, serbest prekürsörler (yalancı vankomisin hedefleri) tarafından absorbe edilmesi sonucu olduğu ileri sürülmüştür. Bu nadir ancak sorunlu suşlardaki vankomisin direncin anlaşılabilmesi için daha ileri araştırmalara gerek vardır.

VISA fenotipi özellikle *agrII* varlığı ile ilişkili olarak CC5 klonal soyunda görülmektedir (27). Ülkemizde de bu konuda çeşitli bildirimler vardır (28-30). Oranlar % 0-6 arasında değişmektedir. Populasyon analizi ile % 18'e ulaşan azalmış duyarlılık bildirilmiştir. Ancak MİK değerleri 0.125-4 mg/L olarak bildirilen bu h-VISA suşlarının klinik önemine ait yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.

KNS'larda glikopeptid direnci bildirilmiştir. *S.aureus*'takinden farklı olarak *S.haemolyticus*'taki direnç peptidoglikanın çapraz bağlarının bileşimindeki değişiklikler ile ilgilidir. Bunun vankomisin direncine hangi mekanizma ile yol açtığı bilinmemektedir.

2002 yılında ABD’den bildirilen iki vankomisine dirençli *S.aureus* (VRSA) suşu, VISA’dan tam vankomisin direnci ile (vankomisin MİK değeri ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$) ve yayılım mekanizmasıyla ayrılır. VISA suşlarındaki kromozomal dirençten farklı olarak VRSA suşlarında direnç *Enterococcus faecalis*’teki *vanA* operonunun konjugal transferi sonucu gelişmiştir. Direnç mekanizmasındaki bu değişiklik stafilocoklar arasında bu direncin yayılması açısından son derece önemlidir. *S.aureus*’ta günümüzde bilinen iki direnç mekanizması, Peptidoglikan biyosentezindeki değişiklik ve *vanA* operonunun konjugal transferidir (7).

2.2.1 Peptidoglikan Biyosentezindeki Değişiklik: VISA suşlarında görülen bu direnç mekanizmasıyla orta düzeyde vankomisin direnci (vankomisin MİK 8-16 $\mu\text{g/mL}$) gelişir. Orta düzeyde vankomisin direncinin nedeni peptidoglikan biyosentezindeki değişikliktir. Bu suşlardaki hücre duvarı daha kalın ve irregülerdir. Peptidoglikan çapraz bağ sayısı daha az olduğundan serbest D-Alanil-D-Alanin rezidülerinin sayısı daha fazladır. Çapraz bağ sayısının azalmasının nedeni pentapeptid köprüdeki D-glutamatın amidasyonu için gerekli olan L-glutamin miktarındaki azalmadır. Sonuç olarak vankomisini yakalayıp ona bağlanabilecek daha fazla D-Alanil-D-Alanin rezidüsü olduğundan vankomisine karşı orta düzeyde bir direnç oluşur. Rezidülere bağlanan vankomisin, diğer vankomisin moleküllerinin sitoplazmik membrandaki hedeflere ulaşmalarını engelleyerek direnci artırır. Peptidoglikan biyosentezindeki bu değişikliklerin moleküler mekanizmaları henüz bulunamamıştır (7).

2.2.2 *vanA* Operonunun Konjugal Transferi: Showsh ve arkadaşları, *vanA* içeren enterokokal plazmidde ayrıca konjugal transferin potansiyel bir hızlandırıcısı olduğu düşünülen seks feromonun da bulunduğunu göstermişlerdir. Bu VRSA izolatlarındaki vankomisin MİK değeri ≥ 128 $\mu\text{g/mL}$ ’dir. Bu izolatlardaki direncin nedeni terminal peptiddeki D-Alanil-D-Alanin’in yerini D-Alanil-D-Laktat’ın alması ve vankomisinin bu rezidülere bağlanamamasıdır. (7).

2002 yılında ABD’de bir vankomisine dirençli enterokok (VRE) suşundan bir MRSA suşuna *vanA* operonunun aktarılmasıyla ilk klinik VRSA suşu bildirilmiştir. Günümüze kadar ilki Michigan, ikincisi Pennsylvania ve ikisi New York’tan olmak üzere 4 VRSA suşu saptanmıştır. VRSA gelişmesi için *vanA* gen kümesini içeren Tn 1546’nın stabil olarak bir stafilocok plazmidine aktarılması gereklidir. Günümüze kadar bu tip raporların sayısı az olduğu için stabil aktarımın pek sık olmadığı söylenebilir (9).

Enterokoklar uzun yıllar bağırsak florasının, infeksiyon potansiyeli yüksek olmayan üyeleri olarak kabul edilmişlerdir. VRE'ler ortaya çıkana kadar da bu bakteriler ile ortaya çıkan infeksiyonların üzerinde pek durulmamıştır. Bu bakteriler insanlarda normal gastrointestinal sistem (GİS) florasının elemanlarından olmasının yanı sıra, ağız boşluğu, vajen, hepatobiliyer sistem, yumuşak dokularda hastalığa yol açmadan kolonize olabilmektedirler (31). Ancak son zamanlarda yayınlanan bir çok araştırmada VRE'ler de dahil olmak üzere bir çok enterokok infeksiyonunun hastadan hastaya direk olarak, personelin elleri, kontamine hasta bakım ekipmanları ve çevre ile de indirekt olarak geçişin mümkün olduğunu vurgulamaktadır. İnsanlarda 20'den fazla enterokok türü tanımlanmış olmasına rağmen, bunlardan ikisi infeksiyonların çoğundan sorumludur: *Enterococcus faecalis* klinik izolatların % 80-90'ını, *Enterococcus faecium* ise % 5-15'ini oluşturur (9). Enterokoklar toplumda önemli bir endokardit etkeni; hastanelerde ise hastane kökenli idrar yolu, yara ve dolaşım sisteminde infeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Enterokoklar beta-laktamlar ve vankomisin bakterisidal etkisine toleran oldukları için, tedavi sırasında bakterisidal etkinlik bu ajanların aminoglikozidlerle kombine edilmesi ile sağlanır (9).

Enterokoklar linkozamidler, aminoglikozidler, trimetoprim-sulfametoksazol ve sefalosporinlere doğal olarak dirençlidir. Ayrıca PBP'lerinin gerek penisiline gerekse diğer beta-laktam ajanlara afinitesi yüksek değildir. Bu nedenle beta-laktamların klinik etkinliği sınırlıdır. Bu durum özellikle penisiline karşı düşük afiniteli PBP 5'in aşırı üretildiği durumlarda ve *E.faecium* suşlarında daha belirgindir. *E.faecalis*'de nadiren beta-laktamaz üretimine bağlı penisilin direnci görülebilir (13). Direnç kazandıkları diğer antibiyotikler arasında aminoglikozidler (yüksek düzey), kloramfenikol, makrolid, linkozamid, streptograminler, florokinolonlar, tetrasiklin, rifampin ve en son olarak da glikopeptidler bulunmaktadır (9). Glikopeptidler MRSA ve diğer Gram pozitif bakterilere etkili olduğu için, bu mikroorganizmalarla gelişen infeksiyonlarda yaygın olarak kullanılmıştır. VRE'ler ilk kez 1988 yılında Uttley ve arkadaşları tarafından İngiltere'den, Leclercq ve arkadaşları tarafından da Fransa'dan bildirilmiş, bunu diğer Avrupa ülkeleri ve ABD'den bildirilen olgular ve VRE epidemileri izlemiştir. Yapılan bir çok çalışmada VRE sıklığının gittikçe arttığı ve daha önemli bir sorun haline geldiği gösterilmiştir (31). Günümüzde birçok ülkede özellikle hastanelerde saptanmaktadır. Bunda enterokokların antibiyotiklere, fiziksel etkilere, kuruluğa, ısı ve pH koşullarına dayanıklılığı da rol oynamaktadır. Glikopeptid direnci özellikle *E.faecium*'da yaygın olup, *E.faecalis*'de daha az görülmektedir (>% 2) ve bunun nedeni açıklık kazanmamıştır. ABD'de vankomisine dirençli olan *E.faecium* suşlarının büyük çoğunluğu aynı zamanda ampisiline yüksek düzeyde dirençlidir. Böylece enterokoklara karşı en etkili iki

ilaç devre dışı kalmaktadır. Bazı suşlarda bu bağlantı fizikseldir. Tn5382 *pbp5* geninin hemen altındaki bölgeye girmekte ve yüksek düzeyde ampisilin direncine yol açmaktadır (13). Bu iki determinant henüz belirlenmemiş bir mekanizma ile enterokok kromozomları arasında birlikte geçmektedir.

Vankomisin direnç determinantlarının kaynağı belli değildir. Ancak dizilerinin kıyaslanması ile enterokoklarda oluşmadıkları açıklık kazanmıştır. Vankomisin 1958 yılında kullanıma girdiği dikkate alınırse gecikmiş olarak direnç gelişmesi büyük olasılıkla memeli gastrointestinal sistemlerine yüksek yoğunlukta glikopeptid verilmesiyle oluşmuştur.

Avrupa’da bu etki daha çok üreme artırıcı olarak besi hayvanlarına avoparsin glikopeptidinin verilmesi sonucu oluşmuştur (32). Avrupa’da VRE izolatları avoparsinin seçici etkisi ile önce hayvanlarda başlamış, sonra besin zinciri yoluyla insanlara geçmiştir. Glikopeptid antibiyotikler içeren yemlerle beslenen hayvanlardan elde edilen tüm besin maddeleri VRE rezervuarı olarak önem taşımaktadır (31). Artık hayvan suşlarının besin zinciri yoluyla Avrupa’daki insan topluluklarına geçişine ilişkin sağlam kanıtlar vardır (33).

Glikopeptidlerin hiçbir zaman hayvan yemlerine katılmadığı ABD’de bu geçiş olayı büyük olasılıkla *Clostridium difficile* ile ilişkili diare olguları veya olgu şüphesinde oral vankomisin alan yatan hastaların sindirim sistemlerinde oluşmuştur. ABD’deki *E.faecium* suşları büyük olasılıkla antibiyotik direnç ve virulans determinantlarını edinerek hastane ortamına iyi uyum sağlamış suşlardır. Avrupa hastanelerinde toplumda kolonizasyonun çok olmasına karşın vankomisine dirençli enfeksiyonlar ender iken, toplumda kolonizasyona ilişkin hiçbir kanıtın olmadığı ABD’de hastanede gelişen enterokok enfeksiyonlarının %25’inden fazlasını vankomisine dirençli enfeksiyonlar oluşturmaktadır. Bunun kaynaklarının değişik olması nedeni ile olduğu tahmin edilmektedir. Yeni veriler klinik enfeksiyon epidemilerinden izole edilen vankomisine dirençli suşların bir çoğunun özgül bir klon grubuna ait olduğunu göstermektedir. Bu da bazı *E.faecium* suşlarının yayılma ve klinik enfeksiyon oluşturma olasılığının daha yüksek olduğunu düşündürmektedir (34).

Avoparsinin AB ülkelerinde yasaklanması ile hem hayvanlardaki hem de insanlardaki oran düşmüştür (14). 2005 yılındaki SENTRY çalışmasında Fransa, İsveç ve İsviçre’de VRE oranı % 0 iken, İngiltere’de % 66.7, İrlanda’da % 71.4’e ulaşmıştır. Aynı çalışmada Türkiye’den giden sonuçlara göre *E.faecalis*’teki oran % 0, *E.faecium*’da ise % 8.6’dır. ARMed çalışmasında (2003-2004) ise kandan izole edilen *E.faecalis*’teki oran % 1, *E.faecium*’daki oran ise % 4’tür (9). Yoğun bakımlarda 2002-2005 yılları arasında alet kaynaklı enfeksiyon hızlarını inceleyen çok merkezli uluslararası bir diğer çalışmada ise dolaşım sistemi enfeksiyonlarından hiç VRE saptanmazken, kateter kaynaklı idrar yolu enfeksiyonlarında VRE

oranı % 7 olarak bildirilmiştir (35). Ülkemizden yapılan diğer bildirimler genellikle salgınları kapsamaktadır (36-38). Salgın dışı dönemlerde rektal sürüntü ile yapılan taramalarda bildirilen oranlar genellikle % 1'in altındadır (39). Son yıllarda bazı Avrupa ülkelerinde özellikle hastane kökenli VRE infeksiyonlarında artış olduğu bildirilmiştir. Bu infeksiyon kümelenmelerinden sorumlu suşlar; her zaman CC17 olarak adlandırılan bir klonun üyesidir.

Glikopeptid antibiyotikler glikan omurganın iki şeker molekülünden biri olan NAM'a bağlı pentapeptid zincirinin ucunda yer alan Dalanil-Dalanin dipeptidine 5 hidrojen bağı ve yüksek afinite ile bağlanmaktadır. Bunun sonucunda hem disakkarit pentapeptid ünitenin varolan peptidoglikan zincirine transglikozilasyonla bağlanması, hem de D-D transpeptidazlar aracılığıyla sağlam bir hücre duvarı için gereken peptidoglikan prekürsörlerinin çapraz bağlanmasını (transpeptidasyon) engellemektedir. Bunun sonucunda peptidoglikan prekürsörleri hücre içinde birikmektedir (9,13)

Glikopeptid moleküllerinin büyük hacmi diğer önemli peptidoglikan bağlanma reaksiyonunu da (transglikozilasyon) yapısal engelleme yolu ile inhibe ediyor gibi görünmektedir. Vankomisin bağlandığı özgül bölüm pentapeptidin ucundaki D-alanil-D-alanindir. İncelenmiş olan bakterilerin çoğunda peptidoglikan prekürsörleri D-Ala-D-Ala ile biten pentapeptidlerdir ve teorik olarak vankomisine duyarlıdır. Buna karşın, vankomisin molekülünün büyük yapısı Gram negatif bakterilerde dış membrandaki porinlerin geçiş sınırlarını aştığından vankomisin bu bakterilerde hedefine ulaşamamaktadır. Bu nedenle vankomisin sadece dış membranı bulunmayan bakterilere karşı etkilidir. Bunlar da çoğunlukla Gram pozitiflerdir (13).

VRE ise ligaz enzimi ile D-ala-D-ala ucunun yapısını değiştirir ve D-alanil-D-laktat veya serin meydana gelir. Bu uca vankomisinin bağlanma yeteneği çok azdır. Böylece hücre duvarı sentezi ve üreme devam eder (31).

Enterokoklarda iki tür direnç mevcuttur. Birincisi vankomisine düşük düzeyde direnç gösteren intrinsek direnç, diğeri ise edinsel dirençtir. Direncin sınıflandırılması önceleri izolatların MİK değerlerine göre yapılmaktaydı. Günümüzde ise sınıflandırma spesifik ligaz genlerinin varlığına göre yapılmaktadır. Enterokokal glikopeptid direncinin altı tipi (*vanA,B,C,D,E,G*) vardır. Bunlardan klinik olarak en önemli olanları *vanA* ve *vanB*'dir. *vanA*, *vanB* ve *vanD* tipi direnç D-ala-D-lac; *vanC* ve *vanE* ise D-ala-D-ser üretimi ile ilişkilidir (13,31).

2.3 *vanA* Tipi Direnç:

vanA tipi vankomisin ve teikoplanine yüksek düzeyde direnç gösteren (vankomisin için ≥ 64 $\mu\text{g/mL}$, teikoplanin için ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$) direnç tipidir. *vanA* operonu çoğunlukla 10.4 kb lık bir Tn3 ailesi elemanı olup konjugatif plazmidlere girerek enterokoklar arasında yayıldığı düşünülen transpozon Tn1546'da bulunmaktadır. *vanA* operon genlerinin farklı türler arasında dizi yönünden oldukça korunmuş olmasına karşın operonların ve Tn1546'nın restriksiyon haritaları klinik suşlar arasında önemli farklılıklar olduğunu göstermektedir (40). Bu farklılıklar daha sonra hareketli element bölümlerinin delesyonu olsun ya da olmasın çeşitli IS elementlerin insersiyonu sonucu oluşmaktadır ve bazı araştırmacılar tarafından belirli klinik ortamlarda suşların bağlantısını araştırmak için kullanılmıştır. *vanA* geni özellikle *E.faecium*'da bulunmuştur. Ancak diğer enterokoklarda da saptanmıştır.

Vankomisin direncinin regülasyonu ve oluşumunda yer alan diğer genler (*vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanX*, *vanY* ve *vanZ*) ve *vanA* geni Tn1546 transpozonu üzerinde yer alır. *E.faecium*'da bu plazmid üzerindedir. Bu genlerin ekspresyonu sonucunda D-ala-D-ala yerine D-ala-D-lac ile sonlanan anormal peptidoglikan prekürsörü sentez edilir. Normal peptidlerin yerine bu uca vankomisin düşük düzeyde bağlanabilir. *vanR* ve *vanS* iki komponentli regülatuar rol oynar. *vanH*, *vanA* ve *vanX*'in transkripsiyonunu *vanR* ve *vanS*'nin oluşturduğu sistem regüle eder. *vanS* vankomisin varlığı veya etkisini algılar ve *vanH*, *vanA* ve *vanX* promotorlarını aktive eden *vanR*'ye aktarır. Piruvatı D-laktata çeviren bir dehidrogenaz olan *vanH*, D-lac oluşumunu sağlar. *vanA* bunu D-ala-D-lac sentezinde substrat olarak kullanır. *vanA* D-alanin ve D-laktatı ester bağıyla birleştiren bir ligazdır. D-ala-D-ala ile sonlanan vankomisin duyarlı prekürsörü üretildiği müddetçe, bu vankomisin direnç prekürsörü yüksek düzey vankomisin direnci için yeterli değildir. Bir D,D-dipeptidaz olan *vanX*, D-ala-D-ala'yı hidrolize eder ve normal pentapeptid oluşumunu engeller veya azaltır. Ek olarak dirençli organizmalar başka enzimler de üretir: Bir D,D-karboksiptidaz olan *vanY* terminal D-ala'yı pentapeptid prekürsörlerinden ayırır ve vankomisinin düşük afinite gösterdiği tetrapeptid içeren prekürsörler oluşur. Böylece vankomisin varlığında hücre duvarı sentezi devam eder ve organizma vankomisine karşı dirençli hale gelir. *vanZ*'nin fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir. Ancak teikoplanin direncinde rol oynayabilir. Vankomisin direnci yüksektir ($\text{MİK} \geq 64$ $\mu\text{g/mL}$) ve indüklenebilir. Dirence neden olan membran proteini ancak vankomisin varlığında bakteri üretilirse sentezlenir. Teikoplanin ise zayıf bir indükleyicidir. İndüklenebilir *vanA* direncinde yalnızca vankomisin varlığında oluşan PBP'lerin artışı sonucunda beta-laktam antibiyotiklere karşı aşırı duyarlılık meydana gelir. Bu da VRE'lerin tedavisinde vankomisin beta-laktam kombinasyonunun başarısını açıklamaktadır (13,31).

2.4 *vanB* Tipi Direnç:

Enterokoklarda *vanB* tipi glikopeptid direnci *vanA* ligaza yapısal benzerlik gösteren (aminoasit dizisi %76 benzerlik) *vanB* ligaz ile oluşur. *vanB* geni yine D-ala-D-lac pentapeptidinin oluşumuna neden olur. Kromozomal yerleşimlidir ancak transpozon (Tn1547, Tn5382) veya plazmid üzerinde de olabilir ve transfer edilebilir (31). Genetik olarak *vanA* ve *vanB* benzer olmakla birlikte aralarında bazı farklılıklar mevcuttur. *vanA*'da mevcut genlerden altı tanesi *vanZ* hariç *vanB*'de mevcuttur. *vanA* ile *vanB* arasındaki önemli bir fark *vanA*'nın daha sık görülmesi ve Avrupa'da baskın olan tip olmasıdır. *vanB* ise daha çok ABD'de görülmektedir (31).

Bu genlerin esas amacı pentapeptid prekürsörünü D-alanil-D-alanin yerine D-alanil-D-laktat olarak değiştirmek, böylece vankomisin hedefine olan afinitesini azaltmaktır (ortalama 1000 kat). Transpeptidasyon reaksiyonunda pentapeptidin ucundaki aminoasit ayrıldığından hücre duvarının son bileşimi direnç determinantı taşımayanlardan farklı olmamaktadır. *vanA* enterokoklar fenotipik olarak vankomisin ve teikoplanine dirençlidirler, buna karşın *vanB* suşlar vankomisine dirençli, ancak teikoplanine duyarlı görünmektedir. Bu duyarlılık, teikoplaninin direnç ifadesini indüklememesine bağlıdır. Ancak *vanB*'de tedavi sırasında mutasyonların olabilmesi çok kolay olduğundan tedavide teikoplanin düş kırıklığı yaratmıştır. Hem *vanA* hem de *vanB* operonları transpozonlarda taşınmaktadır (13).

vanA ve *vanB* operonları birkaç istisna dışında *E.faecalis* ve *E.faecium*'da sınırlı kalmıştır. *vanA* determinantının *S.aureus*'a in vitro olarak geçirilmesine ve en az üç klinik örneklerden *vanA*'yı ifade eden *S.aureus* izolatlarının izole edilmesine rağmen vankomisine dirençli *S.aureus* oldukça enderdir. Tüm olgularda direncin *vanA* operonuna bağlı olduğu ve ayrıntılı çalışılmış bir olguda geçişin *E.faecalis*'de geniş konak aralığına sahip bir plazmiddeki Tn1546 varlığı ile sağlandığı gözlenmiştir. Stafilokok içine girdikten sonra Tn1546 stafilokok plazmidine geçmektedir (41, 42).

2.5 *vanC* Tipi Direnç:

vanC operonu *E.casseliflavus* ve *E.gallinarum* gibi daha az önemli enterokok türlerinde hücre duvarı sentezi için yapısaldır. *vanC* suşlarında peptidoglikan prekürsörü D-alanin-D-serin ile sonlanmakta, vankomisin afinitesi yedi kat kadar azalmakta ve düşük düzeyde kromozomal direnç ortaya çıkmaktadır. (13) *E.gallinarum*'da *vanC1*, *E.casseliflavus*'ta *vanC2* ve *E.flavescens*'te *vanC3* genlerinin varlığı rapor edilmiştir. Bu suşlar sadece vankomisine

düşük düzeyde yapısal direnç gösterir. Teikoplanine duyarlıdırlar. Aynı zamanda D-ala-D-ala üretiminin yüksek düzeyde olması MİK değerinin düşük düzeyde kalmasının nedenidir (31).

2.6 *vanD* Tipi Direnç:

vanD tipi izolatlar yapısal olarak vankomisin (16-256 µg/mL) ve teikoplanine (2-64 µg/mL) dirençlidir. *vanD* geni kromozomaldır ve konjugasyon ile transfer edilemez. *E.faecium* BM4339 ile yapılan son çalışmada tıpkı *vanA* ve *vanB*'deki gibi D-lac ile sonlanan pentapeptidler peptidoglikan prekürsörlerinin major kısmını oluşturur. Çok bir kısmı D-ala-D-ala ile sonlanır (31).

2.7 *vanE* Tipi Direnç:

vanE tipidirenç *E.faecalis* BM4405 izolatında tanımlanmıştır. Düşük düzeyde vankomisine dirençli (16 µg/mL) ve teikoplanine duyarlıdır (0.5 µg/mL). Bu yeni direnç fenotipi intrinsek *vanC* tipi direnç ile benzerlik gösterir. İndüklenebilir özelliktedir ve vankomisinle indüksiyon ile D-ala-D-Ser terminal dipeptidi üretir (31).

2.8 *vanG* Tipi Direnç:

vanG tipi direnç *E.faecium*'da tanımlanmıştır. Vankomisine düşük düzeyde (MİK 16 µg/mL) direnç gözlenirken teikoplanine duyarlıdır (MİK 0.5 µg/mL). *vanC* ve *vanE*'de olduğu gibi D-ala-D-Ser tipi peptidoglikan prekürsörü oluşturarak dirence neden olur. Nadir görülen bir direnç tipi olup, transfer edilemez (31).

2.9 Vankomisine Bağımlı Enterokoklar (VDE):

Vankomisin tedavisi altındaki hastalardan alınan primer kültürlerde çoğunlukla *vanB* tipi dirence sahip enterokokların ürediği rapor edilmiştir. Bu izolatlar subkültürleri yapıldığında üreyememekte, ancak vankomisin diski çevresinde veya vankomisin içeren besiyerlerinde üreyebilmektedir. Vankomisin bağımlı *E.faecalis* ve *E.faecium* kan, idrar ve dışkıdan izole edilmiştir. İzole edilen hastalarda vankomisin veya geniş spektrumlu bir antibiyotik tedavisi ve daha önce izole edilmiş bir VRE hikayesi mevcuttur. Bu hastaların kan ve idrarında kalan vankomisin miktarı, kültürlerinde üreyebilmeleri için gerekli miktarda antibiyotiği sağlamaktadır. Bu VRE ile VDE pulsed-field jel elektroforez (PFGE) ile benzer DNA paterni göstermişlerdir. Bu da bize VDE'lerin VRE ve vankomisin bağımsız izolatlardan kaynaklandığını göstermektedir. Bu organizmalar D-ala-D-ala ile biten normal pentapeptid prekürsörleri üretememektedir. Endojen D-ala-D-ala ligaz enzimini kodlayan *ddl*'nin

mutasyonu VDE’de olduğu gibi fonksiyonel olmayan enzimlerin üretimine neden olur. Bu organizmalar vankomisin indüksiyonu sonucunda, *vanA* ve *vanB* genleri tarafından sentezlenen D-ala-D-lac üreterek canlılıklarını sürdürmektedir. Diğer bir deyişle vankomisin eksikliğinde hücre yaşamı için ve hücre duvarı sentezi için gerekli olan komponentleri üretememektedir. Bu tip bakteriler defektif glikopeptid dirençli enterokoklar olarak tanımlanabilmektedir (31).

3. MATERYAL VE METOD

Laboratuvarımızda kan kültürleri BACTEC 9120 cihazı ile değerlendirilmekte, BACTEC™ PLUS+ Aerobic/F ve BACTEC™ PEDS PLUS/F kan kültür şişeleri (aerobic ve pediatrik şişeler) kullanılmaktadır. Çalışma üreme tespit edilen kan kültür şişelerinden alınan materyalin Gram boyaması sonucunda Gram pozitif kok morfolojisi gösteren 55 adet pozitif kan kültür şişesi ile yapıldı. Hastadan alınan iki kan kültüründen sadece birinde üreme bulunan tüpler kontaminasyon olarak değerlendirilip çalışmaya alınmadı. Aynı hastaya ait örneklerden sadece biri çalışmaya alındı. Ayrıca kontaminasyon kontrolü için 5 test boş olarak çalışıldı. Aynı zamanda örneklerin subkültürleri yapılarak PHOENIX PMIC/ID Panel (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Spark, Md, USA) (43) ile identifikasyon ve antibiyogramları yapıldı. Test sonuçları iki gün sonra çıkan diğer sonuçlarla karşılaştırıldı.

Genotype® BC grampositive testi DNA• STRIP® teknolojisine dayalı ve aşağıdaki Gram pozitif bakteri türlerinin identifikasyonuna imkan tanıyan bir testtir.

Staphylococcus aureus, *Staphylococcus epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. simulans*, *S. warneri*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus anginosus/constellatus/intermedius/mutans/sanguis*, *Streptococcus mitis/oralis*, *Streptococcus dysgalactiae ssp. equisimilis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus gallinarum* ve *Enterococcus casseliflavus*.

Bu test aynı zamanda metisilin direncine aracılık eden *mecA* genini ve vankomisin direncine aracılık eden *vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2/C3* genlerini de tespit edebilmektedir.

Genotype® BC grampositive test prosedürü üretici firma tarafından tanımlanan 3 fazı içermektedir. İlk olarak pozitif kan kültüründen DNA izolasyonu özel bir teknoloji ile Geno • CARD®'lar kullanılarak sağlanmaktadır. Burada kağıda dayalı bir DNA izolasyon sistemi sağlanmaktadır. Ardından biyotinlenmiş primerler kullanılarak multiplex amplifikasyon (Termotabil DNA polimeraz gereklidir) yapılmakta, son olarak ta strip bazlı revers hibridizasyon ile sonuçlar değerlendirilmektedir. Hibridizasyon; amplifikasyon ürünlerinin kimyasal denaturasyonu, biyotinle işaretlenmiş amplikonların, tek iplikçiklerin membrana bağlı probalar ile hibridizasyonu, stringent yıkama, ek olarak streptovadin/alkalin fosfataz (AP) konjugat ve AP ile ilişki kuran boyama reaksiyonu ve elde edilen bantların yorumlanması basamaklarını içermektedir.

Kalite kontrol için stripler 2 kontrol zonu içermektedir. Universal kontrol (UC) direk olarak yüksek bir şekilde korunmuş bütün bakteri türlerinde yaygın olarak bulunan DNA

bölgelerine karşı her stripte bulunan bir bölgedir. Bilinen tüm bakteri türlerini tespit eder. Bakteriyel DNA varlığında doğru bir şekilde DNA izolasyonu ve amplifikasyonu olduğunu gösterir. Konjugat kontrol (CC) zonu ise konjugatın stripe bağlandığını ve sonrasındaki doğru kromojenik reaksiyonun olduğunu kontrol eder.

Test Prosedürü:

DNA İzolasyon ve Amplifikasyonu

- Kan kültür şişelerinden alınan 15 µL materyal Geno • CARD® 'ların yuvarlak kısımlarına pipetlenmiştir.
- Geno • CARD® 'lar 15 dakika 37-40°C de kapağı açık bir şekilde kurutma kabinlerinde kurutulmuştur.
- Her örnek için iki ayrı PCR reaksiyonu yapılmıştır. Bir PNM BC grampositive 1 ve bir PNM BC grampositive 2 kullanılmış ve doğru sonuçlar bu şekilde 2 ayrı reaksiyonla elde edilmiştir.
- Örnekler için bütün reagentleri içeren 2 ayrı karışım hazırlanıp iyice karıştırılmıştır (vorteks yapılmamıştır). PCR tüpünde 45.4 µL karışım mevcuttur.

Her tüpte

- 35 µL PNM BC grampositive 1 veya bir PNM BC grampositive 2,
- 5 µL PCR Buffer (Hot Start PCR Buffer) (polimeraz inkübasyon buffer),
- 5 µL MgCl₂ solüsyonu,
- 0.4 µL termostabil DNA polimeraz (hot start DNA polimeraz) bulunmaktadır.

Disklerin toplanması:

Özel bir delgeç yardımıyla kurumuş olan Geno • CARD® 'lardan 4 disk amplifikasyon karışımının içine konulmuş, disklerin amplifikasyon miksine karışmış olmasına dikkat edilmiş, tüp duvarına yapışmış olanlar mixin içine karışacak şekilde elle çalkalanmıştır. Kontaminasyon kontrolü için karışım disk eklenmeden de kullanılmıştır. Multipleks PCR için Gene Amp® PCR System 9700 (thermocycler cihazı) kullanılmıştır.

95 °C'de	5 dakika	1 siklus,
95 °C'de	30 saniye	} 10 siklus
58 °C'de	2 dakika	

95 °C'de	25 saniye	}	20 siklus
53 °C'de	40 saniye		
70 °C'de	40 saniye		

70 °C'de 8 dakika 1 siklus ile final uzatma yapılmıştır.

Örnekler amplifikasyon reaksiyonunu kontrol etmek için %3'lük agaroz jel elektroforezde kontrol edilebilmektedir.

Hibridizasyon

Hibridizasyon manuel veya otomatize olarak (Auto-Lipa cihazıyla) yapılabilir. Otomatize sistem olarak laboratuvarımızda TECAN ProfiBlot T48 Auto-Lipa cihazı bulunmaktadır. Çalışmada bu cihaz kullanılmıştır.

Önce çalkalamalı su banyosu ya da Twincubator'ün ısısı 45°C 'ye kadar getirilip uygun Auto-Lipa programı açılır. Hibridizasyon ve Stringent solüsyonları 37-45°C'ye kadar ısıtılır. Konjugat ve substrat konsantreleri kendi sulandırma solüsyonları ile 1/100 oranında sulandırılır. Her örnek için iki amplifikasyon reaksiyonu yapılmıştır. Bunlar birlikte tek striple hibridize edilir. 40 µL denaturasyon solüsyonu her trayin (striplerin yerleştirildiği plate) örneklerin çalışılacağı kuyucukların köşelerine pipetlenir. 20 µL PCR ile çoğaltılmış örnekler (her iki amplifikasyon reaksiyonu için ayrı ayrı 20'şer µL) denaturasyon solüsyonuna pipetlenerek karıştırılır ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilir. Sonrasında stripler yerleştirilir ve her bir kuyucuğa 1 ml hibridizasyon solüsyonu konur. Belli döngülerden sonra konjugat ve substrat solüsyonları konularak sonuçlar değerlendirilir.

4. BULGULAR

Çalışma pozitif sinyal veren kan kültür şişelerinden Gram boyama sonucunda Gram pozitif kok morfolojisi gösteren 55 adet pozitif kan kültür şişesi ile yapıldı. Ayrıca kontaminasyon kontrolü için 5 test boş olarak çalışıldı. Aynı zamanda örneklerin subkültürleri yapılarak PHOENIX PMIC/ID Panel (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Spark, Md, USA) (43) ile identifikasyon ve antibiyogramları yapıldı. Test sonuçları iki gün sonra çıkan diğer sonuçlarla karşılaştırıldı. Genotype® BC grampositive test ve PHOENIX PMIC/ID Panel ile elde edilen sonuçlar tabloda verilmiştir.

Tablo 1: 55 örnekten Genotype®BC grampositive testi ve PHOENIX PMIC/ID Panel ile yapılan identifikasyonların karşılaştırılması

Örnek Sayısı	PHOENIX PMIC/ID Panel	Genotype®BC grampositive	<i>mecA</i> veya <i>van</i> genleri
15	MR <i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>mecA</i>
8	MS <i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	-
7	MR <i>S.hominis</i>	<i>S.hominis</i>	<i>mecA</i>
7	MS <i>S.hominis</i>	<i>S.hominis</i>	-
3	MR <i>S.hominis</i>	<i>S.hominis</i> , <i>S.epidermidis</i> ¹	<i>mecA</i>
4	<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecalis</i>	-
1	MS <i>S.hominis</i>	<i>S.hominis</i>	<i>mecA</i> ²
1	<i>S.saprophyticus</i>	- ³	<i>mecA</i> ⁵
1	MR <i>S.saprophyticus</i>	- ⁴	<i>mecA</i>
2	<i>E.faecium</i>	<i>E.faecium</i>	-
1	Vankomisine dirençli <i>E.faecium</i>	<i>E.faecium</i>	<i>vanA</i>
1	MS <i>S.warneri</i>	<i>S.warneri</i>	-
1	MR <i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	<i>mecA</i>
1	MS <i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>mecA</i> ⁶
1	MR <i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i> , <i>S.hominis</i> ⁷	<i>mecA</i>
1	MR <i>S.epidermidis</i>	<i>S.aureus</i> , <i>S.epidermidis</i> ⁸	<i>mecA</i>

MR: metisiline dirençli MS: metisiline duyarlı

Üç örnekte Phoenix ile MR *S.hominis* sonucu alınmış, ancak Genotype testi ile *mecA* geni ve *S.hominis*'e ek olarak *S.epidermidis* tespit edilmiştir¹. Bir örnekte MS *S.hominis* sonucu alınmışken Genotype testi ile ek olarak *mecA* geni bulunmuştur². İki örnekte *S.saprophyticus* suşu izole edilmiş ancak panelde olmadığından Genotype testi ile identifikasyon yapılamamıştır^{3,4}. Yine bu suşlardan biri metisiline duyarlı görüldüğü halde Genotype testi ile *mecA* geni tespit edilmiştir⁵. MS *S.haemolyticus* olarak izole edilen bir suşta test yine buna ek olarak *mecA* genini saptamıştır⁶. MR *S.epidermidis* olarak izole edilen bir suşta Genotype testi *S.epidermidis* ve *mecA* genine ek olarak *S.hominis*'i⁷; benzer şekilde MR *S.epidermidis* olarak izole edilen diğer bir suşta da Genotype testi *S.epidermidis* ve *mecA* genine ek olarak *S.aureus*'u tespit etmiştir⁸.

Elde edilen hibridizasyon örnekleri şekil 3'te gösterilmiştir.

Şekil 3: Hibridizasyon Örnekleri



mecA, S.epidermidis

S.aureus

mecA, S.hominis

S.hominis

mecA, S.hominis, S.epidermidis

E.faecalis

E.faecium

vanA, E.faecium

mecA

mecA, S.aureus

mecA, S.haemolyticus

S.warneri

mecA, S.aureus, S.epidermidis

Negatif Kontrol

5. TARTIŞMA

Otomatize devamlı monitörize edilen kan kültür sistemleri bakterilerin tespit edilme zamanında önemli bir kısalma sağlamıştır (2,6). Bir çok hastanede standart laboratuvar tekniği olarak genellikle sürekli okuma yapan bu sistemler kullanılmaktadır. Bu otomatize sistemler mikroorganizmanın ürettiği CO₂'yi monitörize eden sistemlerdir. BACTEC sistemi mikroorganizmanın metabolizması sonucu ortaya çıkan CO₂'in saptanması için floresan sensörler kullanmaktadır. Pediatrik örnekler resin içeren kan kültür şişelerine ekilmektedir (Peds Plus; Becton Dickinson). Daha sonra konvansiyonel yöntemlerle tanıya gidilmektedir.

Üreme tespit edilen şişelerden subkültürler ve daha sonra identifikasyon ile birlikte antibiyogram yapılmaktadır. Bu süre pozitif sinyal alındıktan sonra 2 günlük bir zaman almaktadır. Ancak optimum tedaviye yönlenmek için daha da hızlı identifikasyon sistemleri gerekmektedir. Bakterilerin hızlı ve güvenilir biçimde direk olarak kan kültürlerinden identifikasyonu klinik pratikte uygun antimikrobiyal tedavinin seçiminde önemlidir. Bu gerçekten hareketle bir çok çalışma yapılmış, erken tanımlamanın klinik olarak faydaları belirtilmiştir.

Bir çok çalışmada hızlı identifikasyonun klinik etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla kullanılan yöntemlerin sonuçlara etkileri bildirilmiştir. Hautala ve ark. (44) toplum kaynaklı, hastane kaynaklı ve hematolojik ünitelerdeki infeksiyonlar olmak üzere üç farklı kategori için pozitif sinyal veren kan kültürlerinden yaptıkları Gram boyamanın sonuçlarına göre hastaların tedavilerini yönlendirmişlerdir. Sepsiste erken tedavi ve başlanılan ilacın önemine vurgu yapan yazarlar bu yöntemin kullanılmasını tavsiye etmişler ve erken tedavinin hastanede kalış süresini kısalttığını belirtmişlerdir.

Veijola ve ark. (45) pozitif sonuç veren BacT/ALERT kan kültür şişelerinden Gram boyama yapmışlar ve sonucu klinisyenlere telefonla bildirmişlerdir. Bu sonuçlarla erken ampirik tedavi başlanmasının faydasını vurgulamışlardır.

Kan kültürlerinden Gram boyama yapılmasıyla ilgili raporların azlığına vurgu yapan Søgaaard ve ark. (46) Gram boyama sonucu çeşitli morfolojik gruplar tanımlamışlardır (Gram pozitif küme yapmış koklar, Gram pozitif diplokok veya zincir yapmış koklar, Gram pozitif çomaklar, Gram negatif kok veya çomaklar gibi). Bunun yanında tecrübeli teknisyenlerce Gram boyamanın yapılmasının ve bildirilmesinin, pahalı olmayan, hızlı ve yüksek derecede hassas bir yöntem olduğunu vurgulamışlar, uygun antimikrobiyal tedavinin başlanması konusunda faydalı olduğunu belirtmişlerdir. Bouza ve ark. (47) ise her geçen gün mortalitenin

1-2 kat arttığını belirtmişler ve bu yüzden Gram boyamanın ve diğer hızlı teşhis metodlarının önemli olduğunu vurgulamışlardır.

Murdoch ve Greenlees (48) BacT/ALERT kan kültür şişelerinde *S.aureus*'un diğer stafilokoklardan Gram boyama karakterleri yönünden farklılığını değerlendirmişler ve %89 duyarlılık %98 özgüllük oranı bulmuşlardır. Üreme görülen BacT/ALERT kan kültür şişelerinden Gram boyama yapıp değerlendirilmesinin *S.aureus* bakteriyemisinin hızlı tanısında gerekli olduğunu savunmuşlardır. Şimdiye kadar klinik mikrobiyologların bu yöntemi kullanmadıklarını vurgulamışlardır. Ancak başka bir laboratuvarından aldıkları pozitif BACTEC şişeleri için aynı şekilde ayırım yapmanın güvenilir olmadığını da belirtmişlerdir. Aerobik BacT/ALERT şişelerinde *S.aureus*'un 1µm den büyük, tipik olarak 8-32 hücrelik sıkı kümeler yaptığını, hücrelerde boyut farkı olmadığını, KNS'lerin ise değişik boyutlarda ve tipik olarak 1 µm den küçük, tetrat veya 16 hücreye kadar küçük kümeler yaptığını göstermişlerdir.

Bu çalışmada ise *S.epidermidis* ve *S.hominis*'in birlikte tespit edildiği dört örnekten ikisinde polimikrobiyal üreme Gram boyama ile tahmin edilebilmiş ancak diğer iki örnek için herhangi bir tahminde de bulunulamamıştır. *S.aureus* ve *S.epidermidis*'in birlikte tespit edildiği bir örnekte yine Gram boyama ile polimikrobiyal üremenin tahmini mümkün olmuştur. Polimikrobiyal üreme görülen beş örnekten ikisi için herhangi bir öngörü yapılamaması bir eksiklik olmakla birlikte, farklı morfolojik şekillerin görülmesi bize polimikrobiyal üremeyi tahmin etme fırsatı vermiştir. Ayrıca deneyimli gözlerle Gram boyama ile streptokoklar ve stafilokokların ayırımı mümkün olabilmektedir. Ancak Murdoch ve Greenlees (48)'in BacT/ALERT kan kültür şişeleri için belirttiği ayırımın, BACTEC kan kültür şişeleri için geçerli olmadığı tarafımızdan da teyid edilmiştir. Bazı koagülaz negatif suşlarının *S.aureus*'a benzer büyük hücreli kümeler yaptığı görülmüştür. *S.aureus* izolatlarının çoğunluğunda büyük hücreli kümeler olmakla birlikte bazı örneklerde küçük hücreli kümeler de tespit edilmiştir. Dolayısıyla BACTEC şişelerinden yapılan Gram boyama ile *S.aureus* ile KNS'ları kesin olarak ayırmak mümkün olmamıştır.

Kan kültürlerinin yorumlamasındaki en önemli aşamalardan biri şüphesiz Gram boyamadır. Yukarıda anlatılmış olan bir çok çalışmada Gram boyamanın hayati önemine atıf yapılmıştır. İmkanları daha kısıtlı olan laboratuvarlar için de ışık tutucu bilgiler içeren bu çalışmalar, sadece Gram boyama sonuçları ile dahi önemli avantajlar sağlandığını vurgulamıştır.

Moleküler yöntemler kullanılarak yapılan hızlı identifikasyonun klinik etkilerini inceleyen çalışmalar da mevcuttur. Bunlardan bir olan Carver ve ark. (49)'nın çalışmasında bakteriyemili

hastalarda *mecA* gen testinin yapılmasıyla optimal antimikrobiyal tedaviye erken başlandığı için mortalitenin düştüğü bildirilmiştir.

Hallin ve ark. (50) *S.aureus* suşlarının ve metisilin direncinin PCR testleri kullanılarak identifiye edilmesinin klinik etkilerini araştırdıklarında, hastaların %25'inde antimikrobiyal terapide faydalı modifikasyonlar yapma imkanı sağladığını bulmuşlardır.

Kerremans ve ark. (51) hızlı identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık testlerinin antibiyotik kullanımını azalttığını ve direk patojene etkili antibiyotik kullanımını sağladığını tespit etmişlerdir.

Bu konuda ayrıntılı bir araştırma yapan Forrest ve ark. (52) çalışmalarında ileride daha ayrıntılı anlatılacak bir metodla erken teşhisi sağlamış, sonuçta hastanede kalış süresinin erken tanı grubunda 4-6 gün arası bir süre kıaldığını ve bunun anlamlı olduğunu göstermişlerdir. Sonuçta hızlı identifikasyon yapılan grupta hastane maliyetleri hasta başına ortalama 4000 dolar düşmüştür. Alınan erken sonuçla kontaminasyon erkenden tespit edilip gereksiz ampirik vankomisin kullanımı da önlenmiştir.

Kan kültürlerinden direk tanı amacıyla bir çok araştırmacı farklı moleküler metodlar kullanmışlardır. Bu konuda ilk çalışmalardan biri 1996 yılında Carroll ve ark. (53) tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar direk olarak BACTEC kan kültür şişelerinden koagülaz pozitif ve negatif suşları, metisilin direncini değerlendiren bir PCR sistemi geliştirmişler ve bu sistemle elde edilen sonuçların kültür sonuçlarıyla %100 uyumlu olduğunu bildirmişlerdir. PCR ve agaroz jel elektroforezi ile sonuçlar üç saatten daha kısa zamanda değerlendirilmiştir. *Staphylococcus aureus* için standart duyarlılık sonuçları ile %99 korelasyon bulunmuştur. Aynı zamanda *mecA* geni de tespit edilebilmiştir.

4 saat kadar süren bir identifikasyon sistemi tanımlayan Anthony ve ark. (54) bakteriyel 23S ribozomal DNA'nın çeşitli bölgelerini PCR primerleri kullanarak amplifiye etmişler daha sonra oligonükleotidlerin bulunduğu bir panelle revers hibridizasyonla tanıya gitmişlerdir. Panelde *S.aureus*, *S.epidermidis*, *S.warneri*, *S.saprophyticus*, *S.xylosus*, *S.cohnii*, *S.simulans*, *S.hominis*, *S.haemolyticus*, *E.faecium*, *E.faecalis*, Viridans grup streptokoklar, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* için oligonükleotidlerin bulunduğu belirtilmiştir. Üreme görülen 158 kan kültüründen yapılan çalışmada doğru identifikasyon oranı 125 adet (%79.7) olarak bildirilmiştir. Bununla birlikte bütün *S.aureus* izolatları doğru olarak identifiye edilmiştir. Araştırmacılar nispeten yetersiz buldukları sistemin maliyet arttırılmadan geliştirilmesi gerektiğini vurgulamışlardır.

Jordan ve Durso (55) yenidoğan bakteriyemisini erken saptamak için 16S rRNA genini kullandıkları PCR ile BACTEC 9240 (Becton Dickinson, Sparks, Md.) cihazı ile tespit edilen

sonuçları karşılaştırmıştır. PCR tabanlı test 9 saat sürmüştür. PCR amplifikasyonu ve DNA dot blot hibridizasyon yapılmıştır. İşaretli oligonükleotid probalar kullanılmış ve denatüre edilmiş PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez ile saptaması yapılmıştır. BACTEC sistemi ile karşılaştırıldığında duyarlılığı %96 özgüllüğü %99.4 olarak bulunmuştur. Araştırmacılar tedaviye erken başlanabilmesi ve erken izolasyon imkanı nedeniyle bu yöntemi tavsiye etmişlerdir. Araştırmacılar 11 KNS, 4 *S.aureus*, 4 *Enterococcus sp.* 4 *E.coli*, 1 *Klebsiella pneumoniae*, 1 *Bacillus sp.* tespit etmişlerdir.

Lem ve ark. (56) BacT/Alert kan kültür şişelerinde bulunan sodyum polianetolsulfonat (SPS)'ı uzaklaştırmak için benzil alkol-guanidin hidroklorid ekstraksiyon metodu kullanmışlardır. Stafilokoklardaki *mecA*, *S.aureus*'a spesifik olan bir bölge olan termonükleaz geni (*nuc*), ve 16S rRNA genlerinin amplifikasyonu için multipleks PCR kullanmışlardır. Rutin fenotipik testlerle karşılaştırıldığında duyarlılığını ve özgüllüğünü mükemmel bulmuşlardır. Ancak bu PCR testi metisiline dirençli KNS (MRKNS) ve MSSA'nın birlikte bulunması halinde MRSA gibi yanlış bir sonuç vermektedir. Çünkü sistem sadece *mecA* genini, stafilokoklarda genel olarak bulunan bir 16S rRNA bölgesini ve *S.aureus*'a özel *nuc* genini tespit edebilmektedir. PCR GeneAmp PCR System 9600 thermal cycler cihazı ile yapılmıştır. Etidyum bromid ile işaretli amplifiye ürünler %1.5'lük agaroz jel elektroforezde UV ışığı altında değerlendirilmiştir. Sonuçların değerlendirilmesi 4 saat kadar bir zaman almıştır.

Maes ve ark. (57) cinse spesifik 16S rRNA, *mecA* ve *nuc* genlerini hedef alma esasına dayalı geliştirilmiş bir tripleks PCR testini kullanmışlardır. Test ile *S.aureus*'u, dolaylı olarak koagülaz negatif stafilokokları ve *mecA* genini tespit edebilmişlerdir. BACTEC-Plus (Becton Dickinson) şişelerinin kullanıldığı çalışmada üreme tespit edilen 61 şişeden Gram boyama sonrası çalışma yapılmış 59'unda (%98) konvansiyonel metodlarla uyumlu sonuçlar elde etmişlerdir. Agaroz jel elektroforezinde değerlendirme yapılmış, sonuçlar üreme tespitinden 6 saat sonra değerlendirilebilmiştir.

Louie ve ark. (58) BacT/Alert (Organon-Teknika, Durham, N.C.) kan kültür şişelerinden alınan materyalden multiplex PCR'a dayalı *nuc*, *mecA*, ve bakteriyel 16S rRNA genlerini tanımlayan bir test tanımlamışlardır. DNA ekstraksiyonu, PCR, ve sonuçların değerlendirilmesi 2.5 saat sürmüştür. Testin duyarlılığı %99.2 özgüllüğü %100 olarak tanımlanmıştır. DNA ekstraksiyonu, ardından PCR [GeneAmp 9600 thermocycler (Applied Biosystems)] ile amplifikasyon yapılmıştır. Daha sonra agaroz jel elektroforezi ile tanıya gidilmiştir. Bu son 3 testte KNS'ler dolaylı olarak tespit edilmektedir. Bu da Lem ve arkadaşlarının belirttikleri gibi hata yapma olasılığı bulunan testlerden biri olarak değerlendirilmiştir.

Marlowe ve ark. (59) Direk olarak rRNA hedeflerine yönelen DNA problemleri kullandıkları çalışmalarında otomatize olarak hibridizasyon ve analiz yapan ve sonuç veren bir cihaz kullanmışlardır. Prob analizi, hybridization protection assay (HPA) adı verilen hibridizasyon koruma testi ile yapılmıştır (60). Kemilüminesan akridinyum ester bağlı tek zincirli DNA problemleri kullanılmıştır. Bu problemler mikroorganizmanın komplementer olduğu rRNA bölgesine bağlanmıştır. Bu karışım 96'lık mikro plate'lere konularak kurutulmuştur. Daha sonra otomatize olarak hibridizasyon ve analiz yapılmış ve rapor alınmıştır. HPA ile sonuçlar Gram boyama sonucundan 1 saat sonra görülebilmektedir. Sonuçlar konvansiyonel test metodlarıyla karşılaştırılmıştır. 384 sinyal pozitif örnek 60 *Enterobacteriaceae*, 10 *Pseudomonas aeruginosa*, 10 diğer gram negatif bakteriler, 40 *Staphylococcus aureus*, 152 koagülaz negatif stafilokok, 28 streptokok, 22 enterokok, 21 diğer Gram pozitif bakteriler, 8 anaerob, 16 fermenter organizma tespit edilmiştir. 17 kültür polimikrobiyal olarak değerlendirilmiştir. Sistemin duyarlılığı %100, özgüllüğü %96 olarak bulunmuştur.

Christensen ve ark. (61) yaptıkları çalışmada 16S ribozomal DNA (rDNA) sekans farklılığına bağlı olarak terminal restriksiyon fragman (TRF) uzunluk polimorfizmi (T-RFLP)'ni saptamanın avantajına dikkat çekmişlerdir. Her organizmanın terminal restriksiyon fragman ölçüsünün değişik olduğunu vurgulamışlardır. Çalışmada 16S rDNA-spesifik floresan boya ile işaretli primerler kullanılmıştır. Pozitif BacT/Alert şişelerinden çalışılan test 8 saat içinde sonuç vermiştir. Gram boyama sonucu çalışmaya başlanmış, sonuçlar otomatize Vitek System (bioMérieux) ile karşılaştırılmıştır. DNA ekstraksiyonu QIAmp DNA Mini kit (Qiagen, Inc., Valencia, Calif.) ile yapılmış, *nuc* ve *mecA* genleri tespit edilebilmiştir. 16S rDNA TRF uzunluk analizi model 377 automated sequencer (Applied Biosystems Instruments, Foster City, Calif.) elektroforez ile yapılmıştır. Test kanda sık görülen patojenleri cins düzeyinde tespit edebilmiştir (*Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp.).

Levi ve Towner (62) ticari bir gen prob hibridizasyon testi olan EVIGENE'i (Statens Serum Institut, Kopenhag, Danimarka) kullanmışlardır. Bu test kan kültürlerinden 7 saat içinde doğrudan *S.aureus*'un identifikasyonunu yapabilmektedir. EVIGENE MRSA Detection Kit mikrokuyucuk formatında olup stafilokoklara spesifik 16S rRNA'yı, *mecA* ve *nuc* gen sekanslarını hedef almakta, KNS'yi ve *S.aureus*'u dolaylı olarak ayırabilmekte, ayrıca metisilin direncini de tespit edebilmektedir. Örneğin lizisini takiben 16S rRNA, *mecA* ve *nuc* problemleri eklenmiş, hibridizasyon sonucu kolorimetrik reaksiyon özel striplerle değerlendirilmiştir.

Lindholm ve Sarkkinen (63) yaptıkları çalışmada AccuProbe (Gen-Probe, Inc., San Diego, Calif.) testinin performansını değerlendirmişlerdir. Bu sistemin *S.aureus*, *S.pneumoniae*, enterokoklar, grup A ve B streptokokları değerlendirebildiği belirtilmiştir. *S. aureus* probu'nun

özgüllüğü çok yüksek olmakla birlikte (%99.8) duyarlılığı düşük bulunmuştur (%72.4). Enterokoklar ile grup A ve B streptokokları değerlendiren prob ise mükemmel olarak değerlendirilmiştir. Üreme görülen kan kültür şişelerinden Gram boyama yapılmış ve Gram pozitif kok morfolojisi gösteren şişelerdeki materyal, *S. aureus*'a ait, enterokokal ve streptokokal rRNA'lar için taranmıştır. Gram boyamada küme yapmış koklar görüldüğünde *S. aureus* probu kullanılmış, çiftler veya zincirler görüldüğünde ise *Streptococcus pneumoniae*, enterokokal, grup A ve B streptokokal problar kullanılmıştır. Aynı zamanda subkültürler yapıp konvansiyonel yöntemlerle değerlendirilmiştir. AccuProbe teknolojisinde (Gen-Probe) direk olarak hedef organizmanın rRNA sına bağlanan kemilüminesan akridinyum esterle işaretli DNA'lar kullanılmıştır. Hibridize problardaki kemilüminesans Gen-Probe Leader 50i luminometre ile ölçülmüştür. Test bir saat kadar bir sürede sonuç vermiştir.

Wellington ve ark. (64) BACTEC kan kültür şişelerinde, pozitif olan kan kültürleri için “Hyplex BloodScreen Multiplex PCR–Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” sistemini kullanmışlardır. Test bakteriyel DNA'nın multipleks amplifikasyonunu takiben ELISA tabanlı bir format içinde olan bir hibridizasyon sistemi ile PCR ürünlerinin spesifik oligonükleotid problar kullanılarak hibridizasyonuna dayanmaktadır. Pozitif örnekler ELISA plate'lerinde optik dansitenin ölçümü ile identifiye edilmektedir. 4.5 ile 6 saat arasında zaman alan bu test ile *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*/*Enterococcus faecium*, *Streptococcus pyogenes*, ve *Streptococcus pneumoniae*, aynı zamanda stafilokokal *mecA* geninin tespiti mümkün olmuştur. Testin duyarlılığı %96.6 ile %100 arasında değişiklik göstermiştir. Özgüllüğü ise %97.7 ile %100 arasında bulunmuştur. *mecA* geni sonuçları ise fenotipik oksasilin direnç testiyle uyumlu çıkmıştır. Bu sistemin kanda sık rastlanan patojenlerin tespitinde çok uygun bir sistem olduğu vurgulanmıştır.

Fujita ve ark. (65) pozitif sonuç veren Bact/Alert şişelerindeki materyalden 16S-23S rRNA geninin analizinin yapıldığı bir PCR yöntemi olan internal transcribed spacer (ITS) PCR'ın yapıldığı, ardından da mikroçip jel elektroforez (MGE) ile sonuçların değerlendirildiği bir sistem tanımlamışlardır. Stafilokok türlerini ve *mecA* genini tespit ettikleri bu yöntemle 1.5 saatte sonuç almışlar, MRSA ve MSSA'ları %89 oranında doğru olarak değerlendirdiklerini belirtmişlerdir.

Internal transcribed spacer (ITS) PCR primerleri Saruta ve ark. (66) tarafından tanımlanmıştır. Saruta ve arkadaşları prokaryotic 16S-23S spacer bölgeleri çoğaltmışlar ve buna Internal transcribed spacer (ITS) PCR adını vermişlerdir. Mikroçip jel elektroforezi microchip electrophoresis instrument (model SV1100; Hitachi Electronics Engineering Co. Ltd., Tokyo, Japan) kullanılarak yapılmıştır. MGE için 0.1 mm genişliğinde 0.03 mm

derinliğinde ve 45 mm uzunluğunda kanalcıklar kullanılmıştır. Kanalcıklar ethidium bromide içeren %0.6'lık hydroxypropyl methylcellulose ile doldurulmuş daha sonra PCR ürünleri bu kanalcıklarda değerlendirilmiştir (67).

Cleven ve ark. (68) önemli bakteriyemi nedeni olan *S.aureus*'u tespit edebilen bir prototip DNA mikroarray geliştirmişlerdir. Bu testte çeşitli yönetici proteinleri, virulans faktörlerini, antibiyotik direnç determinantlarını kodlayan genleri ifade eden spesifik probalar kullanılmıştır [*S. aureus* direnç geni probu *mecA*, *aacA-aphD* (gentamisin direnci), *ermA* (erithromisin direnci), *blaZ* (penisilin direnci)]. Pozitif kan kültüründen önce DNA ekstraksiyonu, ardından floresanla işaretleme yapılmış, DNA çiplerinde hibridizasyon işleminden sonra lazerle tarama ile sonuçlar analiz edilmiştir. Tarama işlemi için Scan Array 5000 laser scanner (Perkin-Elmer) kullanılmış ve sonuçlar bilgisayarda değerlendirilmiştir. Sonuçlar konvansiyonel metodlarla %100 uyumlu bulunmuştur. Sonuçların alınması 8 saat sürmüştür. Süre bakımından dezavantajlı görülen bu sistem daha çok epidemiyolojik amaçlı çalışmalar için önerilmiştir.

Ligase detection reaction (LDR) orijinalinde tek baz mutasyonlarını, polimorfizmini tespit etmek için tasarlanmıştır. Multipleks olarak ta kullanılabilen LDR multipleks PCR ile kombine kullanıldığında kanser genlerindeki mutasyonları ve tek nükleotid polimorfizmini tespit edebilen bir test olarak bildirilmiştir. Pingle ve ark. (69) PCR-ligase detection reaction-capillary electrophoresis (PCR-LDR-CE) assay'i tanımlamışlar ve bu testin kan kültürlerinden, *S.aureus* (ATCC 700699D), *S.epidermidis* (ATCC 12228D), *E.faecalis* (ATCC 700802D), *S.pneumoniae* (ATCC BAA-334D ve ATCC 6308D)'yı tespit edebildiğini belirtmişlerdir. PCR 16S rRNA'daki iki ayrı bölge için primerler kullanılmış, daha sonra gelen LDR ile amplifiye edilmiş iki PCR ürünüdeki tek nükleotid polimorfizmi araştırılmıştır. Daha sonra kapiller elektroforez ile sonuçlar değerlendirilmiştir. Test ile 4 saat içinde sonuç alınabilmektedir. Ancak bu testte çalıştığımız testten ve diğer çalışmalardan farklı olarak klinik örneklerden alınan materyaller değil, bilinen standart suşlar kullanılmış, sıvı besiyerinde üretilen mikroorganizmalar kan kültür şişelerine aktarılmış ve 4 saat kadar bir süre içinde pozitifleşmesi sağlanmıştır. Buradan alınan materyal kullanılarak sonuca gidilmiştir.

Tang ve ark. (70) stafilokoklarda tür düzeyinde tanımlama yapabilen, PVL ve direnç determinantlarını belirleyebilen StaphPlex sistemini geliştirmişler, 18 gen hedefini eş zamanlı tek reaksiyonla amplifiye etmişlerdir. Çalışmaya küme yapmış Gram pozitif kokların görüldüğü kan kültür şişeleri alınmıştır. Çalışma sonuçları fenotipik yöntemlerle karşılaştırılmıştır. *S.aureus* (*nuc geni*), MRSA, MSSA, KNS ve KNS-MRSA, KNS-MSSA miks infeksiyonlar için uygunluğu %91.7 olarak, KNS'da tür düzeyine inilince *S.epidermidis*, *S.haemolyticus*, *S.hominis*, *S.lugdunensis* için %80.1 uygunluk bulunmuştur. *aacA*

(aminoglikozid), *ermA*, *ermC* (MLSB), *tetM*, ve *tetK* (tetrasiklin) genleri için major hata bulunmuştur. *mec* tiplemesi ve PVL'i saptamada sistem %100 duyarlı, özgüllüğü ise sırayla %95.5 ve %100 olarak bulunmuştur. Sonuçlar 5 saat içinde alınmıştır. DNA ekstraksiyonu sonrasında multipleks amplifikasyon Temples StaphPlex I assay system (catalog no. 021-01-S; Genaco Biomedical Products, Inc., Huntsville, AL) ile yapılmıştır. Amplifiye ürünlerin multipleks olarak identifikasyonu Luminex 100 instrument (Luminex, Austin, TX) ile birlikte bir suspansiyon sistemi kullanılarak (catalog no. 021-01-D; Genaco Biomedical Products, Inc., Huntsville, AL) düzenlenmiştir. Sonuç Luminex makinesinde okunmuştur. Hibridizasyon lazer sistemiyle saptanmıştır.

Goldmeyer ve ark. (71) Gram pozitif kok kümelerinin olduğu kan kültür şişelerinden *S.aureus* ve metisilin direncini tespit eden bir sistem geliştirmişlerdir. *nucA* ve *mecA* genlerinin tespit edildiği izotermal helikaz bağımlı amplifikasyon yapılmış, ampikonlar tek kullanımlık bir tanımlama cihazında tespit edilmiştir. *S.aureus* ve metisilin direnci için duyarlılığı %100, özgüllüğü ise % 100 ve % 98 olarak bulunmuştur. İki ayrı amplifikasyon reaksiyon karışımı ve *S.aureus*'a spesifik *nuc* geni ve *mecA* genini tespit eden tespit kaseti içeren IsoAmp RapidStaph Detection kit ile sonuçlar 1.5 saat içinde alınabilmiştir.

Buraya kadar olan kısımda farklı yöntemler ve ticari kitler kullanılarak yapılan DNA ekstraksiyonu, PCR ve son olarak hibridizasyona dayalı yöntemler incelenmiştir. Bundan sonra kan kültürlerinden patojenlerin identifikasyonları için en çok kullanılmış yöntemler olan farklı real-time PCR (RT-PCR) ve floresan in situ hibridizasyon (FISH) test yöntemleri yine tarih sırasıyla irdelenecektir.

İlk olarak Yen Tan ve ark. (72) kan kültürü pozitifleştikten sonra 2 saat gerektiren moleküler biyoloji-tabanlı bir test tanımlamışlardır. Real-time floresan PCR kullandıkları bu test metisiline dirençli olanları da içermek üzere *S.aureus* suşlarını %96 oranında doğru bir şekilde tespit edebilmiştir. Yen Tan ve arkadaşları MRSA'ların hızlı identifikasyonunun vankomisin ampirik tedavisinin oranlarını düşürdüğünü belirtmişlerdir. Pozitifleşen BACTEC şişelerinden Gram pozitif küme yapmış kok gördükleri örnekleri çalışmaya almışlar, lizis ve DNA ekstraksiyonunu Generation DNA Purification Capture Column kit (Gentra Corporation, Minneapolis, Minn.) ile yapmışlardır. Amplifikasyon ve sekans spesifik saptama için 179 bp lik fragman (*Sa442* için), 98-bp lik fragmanlık (*mecA* geni için) oligonükleotid primerler ve floresanla işaretli probalar dizayn edilmiştir. Her örnek için iki ayrı PCR reaksiyonu yapılmıştır. Önce *Sa442* fragmanı sonra *mecA* geni saptanmıştır. PCR hızlı termal sikluslar yapan ve amplifiye edilen ürünlerin prob spesifik tanımlamasını yapan LightCycler cihazı ile (Biogene, Kimbleton, United Kingdom) yapılmıştır.

Shrestha ve ark. (73) BacT/ALERT şişelerinden üreme görülen, Gram boyamada kümeli kokların olduğu örnekleri çalışmalarına almışlar, *S.aureus* ve metisilin direncini tespit etmek için LightCycler PCR ile *sa442* ve *mecA* genlerine bakmışlardır. Yöntemlerini %100 duyarlı ve özgül olarak bulmuşlardır. Ancak test KNS'lar için uygun bulunmamıştır. Bu yöntemle RT-PCR ve floresan saptama işlemi yapılmaktadır.

Wellingshausen ve ark. (74) kanda sık rastlanan patojenlerin hızlı tespiti için bir PCR testi geliştirmişlerdir. Bu sistemin *Staphylococcus* spp., *S. epidermidis*, *S. aureus*, *mecA* geni, *E.faecalis*, *E.faecium*, *Streptococcus* spp., *Streptococcus agalactiae*'yı tespit edebildiğini bildirmişlerdir. Üreme görülen kan kültür şişelerinden materyal almışlar, mikroskopik incelemeyi takiben PCR uygulamışlar, bunu da kültür sonuçları ile karşılaştırmışlardır. PCR kültür sonuçlarıyla paralellik göstermiş farklı bir sonuç çıkmamıştır. Birkaç saat içinde sonuç alınabilmiştir. Ancak testin miks infeksiyonlarda duyarlılığın daha düşük olduğu bildirilmiştir. Hedef DNA'nın amplifikasyon ve real-time saptaması için LightCycler PCR ve saptama sistemi (2nd generation LightCycler, Roche Diagnostics, Germany) kullanılmıştır. Tüm PCR testleri LightCycler kapilleri (Roche) kullanılarak tek tüpte çalışılmıştır (multipleks PCR değil). Amplikonların saptanması LightCycler DNA Master hibridizasyon prob kitleri (Roche) kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre yapılmıştır.

Sakai ve ark. (75) iki floresan enerji transfer prob seti ve hedefleri stafiloklardaki *tuf* geni olan bir real-time PCR tanımlamışlardır. Biri cins düzeyinde stafilokokları, diğeri ise *S.aureus*'u tespit eden iki prob seti kullanmışlardır. Gram boyama sonucu küme yapmış Gram pozitif kokların görüldüğü şişeler (BacT/ALERT) çalışmaya alınmıştır. Bu test iki bakımdan da %100 duyarlı ve özgül bulunmuştur. DNA denaturasyonunu takiben RT-PCR için LCRed640 ile işaretli problar kullanılmaktadır. Değerlendirme aşamasında spektrofotometrik okuma GenQuant Pro instrument (Biochrom Ltd., St. Albans, United Kingdom) ile yapılmaktadır.

Adams (76) kan kültürlerinden çalıştığı bir RT-PCR testi tanımlamıştır. Sadece *S.aureus*'u tespit edebildiği kısa ve basit bir metodla DNA ekstraksiyonu, ardından RT-PCR yapmıştır. *S.aureus*' a spesifik *femA_{SA}*, ve *mecA* genini tespit etmiştir. Bunlardan *femA_{SA}* 'nın negatifliğini KNS olarak yorumlamıştır. BacT/ALERT şişelerinde pozitif olan şişelerden çalışmış, PCR için real-time thermocycler kullanmıştır. 18 saatlik bir süre kazanımını vurgulayan çalışmanın uzun bir süre aldığı belirtilmiş, bununla birlikte çalışmanın süresinden bahsedilmemiştir. Ancak konvansiyonel yöntemlerle 2 günlük bir sürede sonuç alındığı göz önünde tutulursa, testin süre bakımından pek bir avantaj sağlamadığını söylemek mümkündür.

Shrestha ve ark. (77) BacT/ALERT kan kültür şişelerini kullanarak yaptıkları çalışmada pozitif kan kültürlerinin Gram boyamalarında küme yapan kokları *S.aureus* ve koagülaz negatif stafilokoklar olarak ayıran Roche “LightCycler *Staphylococcus* M^{GRADE}” kitlerini değerlendirmişlerdir. LightCycler enstrumanları ve LightCycler reagenleri (Roche) kullanılmıştır. Bunlar DNA hybridizasyon problemleri, *Staphylococcus* primer ve hybridizasyon problemleri ve *Staphylococcus* template set olup bu kitler ile stafilokok türlerindeki ITS bölgelerinin (16S ve 23S genleri arasındaki internal transcribed spacer bölgeleri) amplifikasyonu yapılmış, *S. aureus* ve KNS’lar floresan rezonans enerji transfer problemleri kullanılarak tespit edilmiştir. sonuçlar 3 saat içinde değerlendirilmiştir. Doğrulama için örnekler *sa442* hedef alınarak yapılan bir başka real time PCR testi ile de değerlendirilmiştir. 100 test çalışılmış ve test *S.aureus* için % 100 duyarlı, %98.44 özgül olarak, koagülaz negatif stafilokoklar için %100 duyarlı ve özgül olarak bulunmuştur.

Stamper ve ark. (78) pozitif kan kültürlerinde *S.aureus* ve MRSA tespitinde bir RT-PCR testi olan StaphSR testini (BD GeneOhm, San Diego, CA) kullanmışlardır. Bu testi 300 pozitif kan kültüründe çalışmışlardır. İki saat gibi bir zaman alan BD GeneOhm StaphSR testinin %100 duyarlılığı ve %98.4 özgüllüğü olduğunu tespit etmişlerdir. Bu testi MRSA ve MSSA tespitinde değerli bir yöntem olarak bulmuşlardır.

Wu ve ark. (79) bakteriyel yenidoğan sepsis etkenlerini erkenden tanımlamak için direk olarak kan örneklerinden çalışabildikleri bir RT-PCR sistemi kullanmışlar ve faydalı bulmuşlardır. Gram stain-specific-probe-based real-time PCR (GSPBRT-PCR) sistemi ile 25 Gram pozitif bakteri türünü tespit edebilen bu sistemde sonuçlar 3 saat gibi bir sürede elde edilmektedir. Üreme görülen 34 kan kültüründen Gram boyamayı takiben tür tayini yapabilmışlardır. Test ile *S.aureus*, KNS’lar, *S.agalactiae*, *E.avium* ve *E.faecium* tespit edilebilmiştir.

Ruimy ve arkadaşları (80) 90 dakika içinde *S.aureus*’u diğer KNS’lardan ayıran ve metisilin direncini belirleyen yeni bir RT-PCR tekniğini denemişlerdir. Testin *S.aureus* ve KNS’ları ayırmada ve metisilin direncinin belirlenmesinde duyarlılığı ve özgüllüğü %100 olarak belirlenmiştir. Ayrıca Ruimy ve arkadaşları sonuçlara göre daha etkin ve erken tedavi yapıldığını, glikopeptidlerin gereksiz kullanımının da önüne geçildiğini göstermişlerdir. Ruimy ve arkadaşları *S.aureus*’un *femA* geni, *mecA* ve stafilokokların imzası olan *rrs* sekans spesifik bölgelerini hedefleyen hybridizasyon problemlerinin kullanıldığı tripleks bir real-time PCR (RT-PCR) tekniğini kullanmışlardır. Gram boyama sonucuna göre alınan örneklerden önce DiagHemoc-Staph kit (Diagenode, Liege, Belgium) kullanılarak 10 dakika içinde hızlı bir

şekilde DNA ekstraksiyonu, sağlanmıştır. Tripleks RT-PCR ABI Prism 7000 sequence detection systems (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) ile yapılmıştır.

FISH tekniği problemlerin hedef rRNA ile hibridizasyonunu takiben floresan mikroskopla tespiti esasına dayanmaktadır. Bu metod bütünlüğü bozulmamış hücrelerdeki nükleik asitleri tespit etmektedir. FISH yönteminin kullanıldığı ilk çalışmalardan biri KEMPF ve ark. (1) tarafından yapılmıştır. KEMPF ve ark. (1) rRNA'yı hedefleyen floresanla işaretli oligonükleotid problemler kullanarak FISH yöntemi ile pozitif BACTEC (Becton Dickinson) kan kültürlerinden kültür yapmadan patojenleri hızlı bir şekilde tespit edebilmişlerdir. Sonuçlar konvansiyonel metodlarla karşılaştırılmıştır. Gram boyama sonrası örnek lam üzerine yayıldıktan sonra çeşitli işlemlerden geçirilmiş (streptokoklar lizozim, stafilokoklar lizozim ve sonrasında lizostafin ile) ve 5' ucundan işaretli seçilmiş oligonükleotid problemler kullanılmıştır. Test sonucu floresan mikroskopi ile değerlendirilmiştir. Cins ve tür düzeyinde identifikasyon imkanı sağlayan problemlerin duyarlılığı ve özgüllüğü %100 olarak bulunmuştur. Sonuçlar 2.5 saat içinde elde edilebilmiştir. KEMPF ve arkadaşları Ticari immunolojik ve biyokimyasal kitlerin polimikrobiyal infeksiyonlarda yanlış yorumlamalara neden olabildiğini belirtmişler, bu yüzden moleküler tekniklerin daha kıymetli olduğunu vurgulamışlardır. Amplifikasyon ve bakteriyel DNA'nın tespiti için PCR ve hibridizasyon yöntemlerinin zaman alıcı ve pahalı olduğunu belirtmişler ve kendi yöntemlerinin üstün olduğunu iddia etmişlerdir. Yazarlar FISH yönteminin çabuk, ucuz, güvenilir bir metod olduğunu, protokolün basit olduğunu, spesifik ekipman gerektirmediğini, rutin tanıda rahatlıkla kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Oliveira ve ark. (81) spesifik 16S rRNA'yı hedef alan peptid nükleik asit problemlerini (PNA) kullanarak direk olarak 2.5 saatte *S.aureus*'u tanımlamışlardır. Test %100 duyarlılık ve %96 özgüllük göstermiştir. Yine Oliveira ve ark. (82) başka bir çalışmada benzer şekilde üreme görülen kan kültür şişelerinden direk olarak *S.aureus*'u tanımlamışlardır. *S. aureus* PNA FISH testi Gram boyamada küme yapmış Gram pozitif koklar görüldükten 2.5 saat sonra sonuç vermektedir. ESP, BACTEC, ve BacT/Alert şişeleri için duyarlılık ve özgüllük oranlarını %100 ve %99.2 - %98.5 ve %98.5 - %100 ve %99.1 olarak bulmuşlardır.

Forrest ve ark. (52) hastane kaynaklı VRE bakteriyemisinin artmış hastane maliyetleri, yatış süresinin uzaması ve mortaliteyle ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. *E.faecalis* ve diğer enterokokları ayıran çok renkli problemlerin kullanıldığı PNA FISH metodu ile Gram boyamada Gram pozitif diplokok ve zincir yapmış kokların görüldüğü pozitif kan kültürlerinde 3 saatte sonuç alınmıştır. Konvansiyonel metodlara göre *E. faecalis* 3 gün önceden, *E.faecium* ise 2.3 gün önceden tespit edilebilmiştir. Erken efektif tedavinin başlaması istatistiki olarak anlamlı bir şekilde hızlanmıştır. Mortalitenin de düştüğü gözlenmiştir. Hastane kaynaklı *E.faecium*'un

ampirik antimikrobiyal tedaviye başlama zamanının kısalması büyük bir avantaj sağlamıştır. Test günde iki kez çalışılmış (08 ve 15 te) Gram boyama sonrası bir damla kan kültür içeriği lam üzerine konulduktan sonra prob eklenmiş, sonuçlar floresan mikroskopta değerlendirilmiştir. Yeşil floresanın *E.faecalis*'i, kırmızı floresanın *E.faecium*'un da içinde bulunduğu diğer enterokokları gösterdiği test ile, elde edilen sonuçlara göre farklı tedavi şemaları önerilmiştir. *E.faecalis* için ampisilin (penisilin alerjisi varsa vankomisin), diğer grup için (*E.faecium* ve diğer enterokoklar) linezolid, diğer streptokoklar düşünülürse penisilin veya seftriakson (menenjit veya febril nötropeni varsa vankomisin eklenebilir) önerilmiştir. Linezolid alternatif olarak VR *E.faecium*'da yüksek doz daptomisin kullanılabileceği belirtilmiştir. Neden olarak enterokokal bakteriyemi ile birlikte sıklıkla diğer mikroorganizmaların özellikle de Gram negatiflerin olabileceği vurgulanmıştır.

Peters ve ark. (83) pozitif olan BACTEC kan kültürlerinde FISH metodu ve konvansiyonel yöntemleri (VITEK 2; BioMérieux) karşılaştırmışlardır. Bu yöntemin faydalı bir tanısal test olduğunu vurgulamışlardır. FISH için kullanılan problar (PNA veya oligonükleotid) floresan ile işaretlenmiştir. %95 mikroorganizma familya seviyesinde, %78'i ve %66'sı cins ve tür seviyesinde belirlenmiştir. FISH için ticari SeaFAST sepsis kit (SeaPro Theranostics International B.V., Lelystad, The Netherlands) kullanılmış, firmanın protokolüne göre fiksasyon ve lizostafin/lizozim ile ekstrapermeabilizasyon yapılmıştır. Daha sonra hibridizasyon ve yıkama işlemi yapılmış ve bağlanmamış problar uzaklaştırılmıştır. Lamalar kuruyunca floresan mikroskop ile (Olympus BX40; 100'lük büyütme) incelenmiştir. Bakterilere spesifik 16S veya 23S rRNA bölgelerini hedefleyen oligonükleotid probların kullanıldığı test 4 saatten fazla bir süre almıştır. *Staphylococcus* sp., *S.aureus*, *S.pyogenes*, *S.agalactiae*, *Streptococcus* sp., *Enterococcus* sp., *E.faecalis*, *E.faecium*, *S.pneumoniae* bu test ile tanımlanabilmiştir.

Yine aynı yıl içinde Peters ve ark. (84) lizis, hibridizasyon ve yıkama aşamalarında değişiklikler yaparak modifiye bir FISH testi denemişler ve bir saatten kısa bir sürede pozitif kan kültürlerinden mikroorganizmaların identifikasyonunu sağlamışlardır. Metod standart FISH yöntemi ve konvansiyonel kültürlerle karşılaştırılmıştır. Modifikasyonun faydalı olduğu belirtilmiş, standart FISH için seaFAST Sepsis Kit (SeaPro International B.V., Lelystad, The Netherlands) kullanılmış, hedef rRNA ile hibridize olan oligonükleotid problar kullanılmıştır. Bağlanmayan problar yıkamayla uzaklaştırılmış ve floresan mikroskopi ile incelenmiştir. Yazarlar sonuçların standart FISH ile aynı olduğunu tespit etmişlerdir.

Son olarak Tavares ve ark. (85) 4.5 saat içinde pozitif sinyal veren kan kültürlerinde stafilokokların varlığını tespit eden, *S.aureus* ve koagülaz negatif stafilokokları ayırt edebilen

bir FISH testi düzenlemişlerdir. 5' ucundan fluorochrome Cy3 (Thermo Hybaid, Ulm, Germany) ile işaretli oligonükleotid probolar kullanılmıştır. Rutin kullanım için bu metodu tavsiye etmişler, spesifik bir ekipman gerektirmemesi nedeniyle de avantajlı olduğunu vurgulamışlardır. Yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde, FISH metodu geliştirildikçe ileride gelecek vadeden bir tanı metodu olarak görülmektedir.

Bu çalışmada yeni bir teknoloji olan Genotype® BC grampositive testi kullanılmıştır. DNA•STRIP® teknolojisine dayalı bu test, 17 Gram pozitif bakteri türünün identifikasyonuna imkan tanımaktadır. Test aynı zamanda metisilin direncine aracılık eden *mecA* genini ve vankomisin direncine aracılık eden *vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2/C3* genlerini de tespit edebilmektedir.

Genotype® BC grampositive test prosedürü kolaydır ve ortalama 15 µl'lik bir başlangıç materyali gerekmektedir. Test prosedürü üretici tarafından tanımlanan 3 fazı içermektedir. İlk olarak pozitif kan kültüründen DNA izolasyonu özel bir teknoloji ile Geno • CARD® lar kullanılarak yapılmaktadır. Burada kağıda dayalı bir DNA izolasyon sistemi sağlanmaktadır. Ardından biyotinlenmiş primerler kullanılarak multiplex amplifikasyon yapılmakta, son olarak ta strip bazlı revers hibridizasyon ile sonuçlar değerlendirilmektedir. Sonuçlar strip üzerindeki reaksiyon zonlarının okunmasıyla değerlendirilmekte ve bu Gram boyamadan sonra 4.5 saatlik bir zaman almaktadır. Testin çalışılması için thermocycler cihazı dışında bir cihaz gerekmemektedir.

Literatürde bu test kullanılarak yapılan iki çalışma mevcuttur. Bunlardan ilki Eigner ve ark. (2) tarafından yapılmıştır. Eigner ve arkadaşları bu çalışmada değerlendirilen Genotype® BC grampositive test kitlerini (Hain Life Science, Germany) kullanmışlardır. Analitik duyarlılığı değerlendirmek için referans suşları kan kültür şişelerine şırınga etmişler ve 10⁴ CFU'nun tespit edilebildiğini bildirmişlerdir. Gram boyama sonucu Gram pozitif kok olarak tanımlanan 152 örnekten 148'ini (%97.4) doğru olarak identifiye etmişlerdir. 13 MRSA izolatın 12'si doğru olarak identifiye edilmiştir. Bir adet *Enterococcus faecium* izolatında *vanA* geni bulunmuştur. Mikroskopik analizden sonra sonucun elde edilmesi 4 saat sürmüştür. Sonuç olarak yazarlar bu testin hızlı ve güvenilir sonuçlar verdiğini rapor etmişlerdir. Ayrıca diğer testlere göre manuplasyonun çok kolay olması, kağıt stripler kullanılması ve otomatize olarak çalışılabilmesi avantajını da vurgulamışlardır.

İkinci çalışma Prère ve ark. (6) tarafından yapılmıştır. Genotype®BC Gram-pozitif test kitlerini (Hain Life Science, Germany) kullanmışlar, BacT/ALERT şişelerinde pozitif sonuç veren 60 kan kültüründe bu testi çalışmışlardır. Gram boyama sonucu Gram pozitif kokların görüldüğü 25 şişe çalışmaya alınmış, sonuçlar 4.5 saat gibi bir sürede değerlendirilmiştir.

Bütün sonuçları biyokimyasal identifikasyonlarla ve fenotipik antibiyotik duyarlılık testleriyle uyumlu bulmuşlardır. Bu testin rutin tanıda kolayca kullanılabileceğini vurgulamışlardır. Sadece bir panelde hibridizasyon bandı oluşmamış, ancak biyokimyasal identifikasyonda *S.capitis* olduğu anlaşılan suşun panelde olmaması nedeniyle bandın oluşmadığı anlaşılmıştır (2).

Kan kültürlerinde moleküler yöntemlerle tanıya gidilirken karşılaşılan önemli bir problem de PCR inhibitörleridir (58,86). Al-Soud ve ark. (87,88) iki ayrı çalışmada insan plazma immunoglobulin G ve laktoferrin gibi major PCR inhibitörlerinden bahsetmiştir. Ancak Prère ve arkadaşları inhibisyon gözlememişlerdir. GenoCard DNA izolasyon sistemiyle potansiyel inhibitörlerin elimine edildiğini iddia etmişlerdir. Bu teknoloji Gram pozitif bakterilerin yüksek kalitede bakteriyel lizisine izin vermiştir. Prère ve ark. (6) BacT/ALERT şişelerinin organik kömür içermesi nedeniyle Gram boyamada problem yaşandığını bakterilerin kömür tozlarının altında kaldığını bildirmişlerdir. Bu problemin daha çok Gram pozitif bakteriler için söz konusu olduğunu Gram negatiflerde problem olmadığını da bildirmişlerdir. Standart thermocycler dışında spesifik bir ekipman gerektirmemesi, elektroforetik bir sistem gerektirmemesi, herhangi bir boyamaya ve görüntüleme sistemine gerek olmaması avantajlar olarak bildirilmiştir. Ayrıca GenoCard teknolojisiyle DNA izolasyonunda da zaman kazanımı olmuştur.

Bu çalışmada da Genotype® BC grampositive test ve PHOENIX PMIC/ID Panel ile elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında sonuçlar genelde uyumlu bulunmuştur. Ancak burada testin polimikrobiyal infeksiyonları tespit etmede otomatize sisteme göre üstün olduğu görülmüştür. PHOENIX ile metisiline dirençli *S. hominis* olarak identifiye edilen üç örnekten test ile *mecA* geni ve *S.hominis*'e ek olarak *S.epidermidis*'te tespit edilmiştir. Yine PHOENIX ile metisiline dirençli *S.epidermidis* olarak identifiye edilen iki örnekten, *mecA* ve *S.epidermidis*'e ek olarak bir örnekte *S.hominis* diğer örnekte *S.aureus* saptanmıştır. Kanlı agar besiyeri değerlendirilirken iki farklı stafilokok suşunu ayırt etmek mümkün olmamış, ayrıca Gram boyama da bu konuda yetersiz kalmıştır. Bu tür infeksiyonların tespitinde test üstün bulunmuştur. PHOENIX ile *S.saprophyticus* olarak identifiye edilen 2 örnekten test sadece *mecA* genini tespit edebilmiş, tür düzeyinde identifikasyon yapamamıştır. Bunun üzerine sonuç beklenmiş ve örneklerden izole edilen suşun panelde olmayan *S.saprophyticus* olduğu görülmüştür. Panel PHOENIX ile metisilin direncinin tespit edilemediği 5 örnekte *mecA* genini tespit etmiştir. Oksasilin disk difüzyon testi ile de sonuçlar kontrol edilmiş, otomatize sistemle aynı sonuç elde edilmiştir. Metisilin direncinin tespitinde *mecA* geninin altın standart olduğu göz önüne alınırsa otomatize sistemin bu konuda bazen yetersiz kaldığı yönünde bir

izlenim oluşmuştur. Ancak bunun otomatize sistemin eksikliğinden değil izole edilen suşların bazı özelliklerinden kaynaklanabileceği ihtimali de düşünülmüştür. Çünkü bazı suşlar *mecA* genini taşımalarına rağmen metisiline duyarlı olarak görülebilmektedir (7). Populasyon içinde heterojen direnç özelliği bulunması durumunda da böyle problemler yaşanabilmektedir. Yine pentaglisin köprülerinin oluşumundan sorumlu *fem* mutasyonlarında *mecA* varlığına karşın beta-laktam MİK düzeylerinin yükselmediği göz önüne alınırsa bu suşlarda *fem* genindeki bir mutasyonun olması da ihtimal dahilindedir (13).

Kan kültürlerinden direk tanı amacıyla bir çok araştırmacı farklı moleküler metodlar kullanmışlardır. Bir çok çalışmada, maliyetteki yüksekliğin artmış mortalite ve hastanede yatış süresi ile gelen ekstra maliyetler göz önüne alındığında aslında fazladan bir masraf olmadığı, aksine hastane maliyetleri yönünden de bir azalma sağladığı ispat edilmiştir. Bütün yönleriyle ele alındığında tedavinin erken başlanması, daha başarılı ve kısa süren bir tedavi, azalmış komplikasyonlar, mortalite ve morbiditenin azalması nedeniyle hızlı testlerin maliyet yönünden de fazladan bir yük getirmediğini söylemek mümkündür.

Testin aynı gün içinde ve doğru sonuç verebilme özelliğiyle sağladığı zaman kazancı çok önemli bulunmuştur. Normalde subkültürler yapıp ertesi gün plakların değerlendirilmesi ve sonrasında bir gün daha vakit alan identifikasyon ve antibiyogram sürecini beklemek gerekirken aynı gün içinde sonuç alınması sepsis hastalarının tanı ve tedavisinde gerekli görülmüştür.

Ayrıca bu test diğer moleküler yöntemlerle karşılaştırıldığında bir çok yönden daha üstün bulunmuştur. Öncelikle bu testte termal sikluslar yapan thermocycler dışında bir cihaz gerekmemektedir. Ayrıca başka hiçbir testte olmayan bir DNA izolasyon sistemi olan kağıda dayalı bir sistem kullanılmıştır. Bu sistemle DNA izolasyonu 15 dakika gibi bir sürede ve çok kolay bir biçimde yapılmaktadır. PCR yine delgeçler yardımıyla direk olarak bu kağıtlar kullanılarak yapılmaktadır. Bir çok araştırmacı PCR inhibitörlerini elimine etmek için çalıştıkları materyalleri belli işlemlerden geçirmek zorunda kalmaktadır. Ancak Geno • CARD® teknolojisi kullanıldığında bu inhibitörler elimine edilmektedir. Hibridizasyon aşamasında da kolaylıklar bulunmaktadır. Hibridizasyon manuel yapılabildiği gibi auto-lipa cihazıyla da yapılabilmektedir. Diğer sistemlerde bulunmayan stripe dayalı revers hibridizasyon yapılmaktadır. Ek olarak agaroz jel elektroforezine gerek duyulmamaktadır. Ayrıca stripler içerdikleri iki ayrı kontrol zonu ile de iki aşamalı bir kontrol sağlamakta reaksiyonun doğru bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediği izlenebilmektedir. Bu test diğer testlere göre identifiye ettiği suş sayısı olarak daha üstün bulunmuştur. Ayrıca bu suşlara ek olarak *mecA* ve *van* genlerinin varlığını da tespit edebilmiştir.

Sonuçlar değerlendirildiğinde de bu testin önemli sepsis patojenlerini, *mecA* ve van genlerini direk olarak pozitif kan kültürlerinden hızlı ve güvenilir bir şekilde saptadığı sepsisin hızlı tanısı ve tedavinin yönlendirilmesi hususunda güvenilir olduğu anlaşılmaktadır. Sepsis düşünülen hastalarda DNA strip teknolojisine dayalı bu testin kolay bir şekilde rutin tanıda kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

ÖZET

Septisemik hastaların kan kültürlerinden bakteriyel izolatların tespiti diagnostik mikrobiyolojide hasta morbidite ve mortalitesi açısından önemli bir role sahiptir. Hastalardaki bakteriyel patojenlerin hızlı rapor edilmesinin sonuçlar ve hastane maliyetleri açısından pozitif etkisi önceden ifade edilmiştir.

Şu an kullandığımız otomatize kan kültür sistemleri bakterilerin tespit edilme zamanını kısaltmıştır. Ancak bununla birlikte optimum tedaviye yönlenmek için hızlı identifikasyon sistemleri gerekmektedir.

Genotype teknolojisi biotinlenmiş primerlerle DNA'nın multiplex amplifikasyonunu takiben membrana bağlı proplar kullanılarak hibridizasyona dayalı, sepsisin hızlı tanısı için kullanılan hızlı bir genetik testtir. Çalışmamızda yeni Genotype® BC grampositive test kitleri (Hain Life Science, Germany) kullanılmıştır. Bu test 17 Gram pozitif bakteri türünün identifikasyonu yapmakta, aynı zamanda metisilin ve vankomisin direncini (mecA ve van genleri) belirleyebilmektedir. Vankomisin direncini kodlayan genler olan vanA, vanB, vanC1 ve vanC2/C3 genleri metisilin direncini kodlayan gen olan mecA geninde olduğu kadar iyi bir şekilde ve aynı basamakta tespit edilebilmektedir.

Çalışma BACTEC™ Plus kan kültür şişeleri (aerobic ve pediatrik) kullanılarak pozitif olan 55 kan kültüründe yapılmıştır. İlk olarak Gram boyama yapıldı ve Gram pozitif kok morfolojisi görülen şişelerden Genotype®BC grampositive test ile identifikasyon, aynı zamanda örneklerin subkültürleri yapılarak PHOENIX PMIC/ID Panel (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Spark, Md, USA) ile identifikasyon ve antibiyotik duyarlılıkları belirlenmiştir. Operasyon prosedürü gayet kolaydır ve küçük bir miktar başlangıç materyali gerektirmektedir (15 µl kan kültürü). Sonuçlar mikroskopik analizden 4.5 saat sonra değerlendirilebilmiştir. Sonuçlar PHOENIX otomatize sistemindeki sonuçlarla karşılaştırıldığında genel olarak doğru bulunmuştur. İki *Staphylococcus saprophyticus* izolatu strip üzerindeki spesifik propların eksikliğinden dolayı identifiye edilememiştir. Ayrıca 5 örnekte otomatize sistemle tespit edilemeyen polimikrobiyal infeksiyonlar bu testle identifiye edilebilmektedir. Polimikrobiyal infeksiyonların tespitinde bu test üstün bulunmuştur. vanA geni taşıyan bir *Enterococcus faecium* izolatu bu testle doğru bir şekilde ayırt edilebilmiştir.

Bu çalışma BACTEC kan kültür şişelerinden Genotype®BC grampositive test ile ilk değerlendirmeyi sağlamaktadır. Sonuç olarak değerlendirilen GenoType kan kültür testi, direk olarak pozitif kan kültür şişelerinden, en önemli Gram pozitif sepsis patojenlerini, mecA ve van genlerini hızlı ve güvenilir bir şekilde tespit ettiği ispat edilmiştir. Sonuçlarımıza

dayanarak sepsis düşünölen hastalarda DNA strip teknolojisine dayalı bu testin kolay bir şekilde rutin tanıda kullanılabileceği kanısına vardık.

SUMMARY

Detection of bacterial isolates in blood cultures of septicemic patients plays an important role in diagnostic microbiology, due to high rates of patient morbidity and mortality. The positive impact of rapid reporting of bacterial pathogens on patient outcomes and hospital costs have been previously stated.

Current automated continuous monitoring blood culture systems marked a significant advance in reducing bacteria detection time. However, rapid identification systems are also required to optimise treatment orientation.

The Genotype technology, a rapid molecular genetic assay based on DNA multiplex amplification with biotinylated primers followed by hybridization to membrane bound probes, complies with the requirements for a fast diagnosis of sepsis. We evaluated the new Genotype®BC Gram-positive test kits (Hain Life Science, Germany). The test includes a panel of probes for identification of 17 Gram-positive (GP) bacteria species and simultaneous determination of methicillin and vancomycin resistance (*mecA* and *van* genes). The vancomycin resistance mediating genes *vanA*, *vanB*, *vanC1*, and *vanC2/C3* as well as the methicillin resistance mediating *mecA* gene can be detected in the same step.

The study was performed on 55 positive blood cultures from BACTEC blood culture vials (aerobic and pediatric vials). First, a Gram stain was carried out to select Genotype®BC GP, then identification were performed by the Genotype®BC GP test, and by PHOENIX PMIC/ID Panel (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Spark, Md, USA) after subculture and phenotypic susceptibility determination. The operating procedure was very easy to carry out and required a small amount of starting material (15 µl of blood culture). The results were available 4.5 hours after the results of microscopic analysis. Results are generally founds correct as compared with PHOENIX automatize system. Two isolates were CoNS (*Staphylococcus saprophyticus*) not identifiable by the lack of specific probes on the strip. Also succesfully identified of polimicrobial infections by this test in 5 blood culture specimens that not determined automatize system. Detection of polimicrobial infections were excellent by this test. One *Enterococcus faecium* isolate with a positive *vanA* gene isolated was correctly differentiated by the assay.

This study provides the first evaluation of genotypeBC tests directly from BACTEC blood cultures vials. In conclusion the evaluated GenoType blood culture assay proved fast and reliable results in detecting the most important Gram positive sepsis pathogens and the *mecA*

and *van* genes directly from positive blood culture bottles. According to our results, this DNA strip technology based assay can easily be incorporated into routine diagnosis.

KAYNAKLAR

1. Kempf VAJ, Trebesius K, Autenrieth IB. Fluorescent In Situ Hybridization Allows Rapid Identification of Microorganisms In Blood Cultures. J Clin Microbiol 2000; 38(2): 830–8.
2. Eigner U, Weizenegger M, Fahr AM, Witte W. Evaluation of a rapid direct assay for identification of bacteria and the *mecA* and *van* genes from positive-testing blood cultures. J Clin Microbiol 2005; 43(10): 5256–62.
3. DiGiovine B, Chenoweth C, Watts C, Higgins M. The attributable mortality and costs of primary nosocomial bloodstream infections in the intensive care unit. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 1999; 160: 976–81.
4. Doern GV, Vautour R, Gaudet M, Levy B. Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification. J Clin Microbiol 1994; 32: 1757–62.
5. Trenholme GM, Kaplan RL, Karakusis PH et al. Clinical impact of rapid identification and susceptibility testing of bacterial blood culture isolates. J Clin Microbiol 1989; 27(6): 1342–5.
6. Prère MF, Baron O, Fayet O. Rapid identification of bacteria, *mecA* and *van* genes from blood cultures. Pathologie Biologie 2007; 55: 375–77.
7. Ünal S. Staphylococcus aureus: Direnç Mekanizmaları, Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Önemli ve Sorunlu Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları, Bilimsel Tıp Yayınevi, s.23-38 Ankara 2004.
8. Davis TE, Fuller DD. Direct identification of bacterial isolates in blood cultures by using a DNA probe. J Clin Microbiol 1991; 29: 2193–6.
9. Gülay Z. Gram Pozitif Bakteri İnfeksiyonları: Direnç ve Epidemiyoloji. ANKEM Derg 2008; 22(Ek 2): 276-86.
10. Borg MA, Kraker M, Scicluna E et al: Prevalance of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in invasive isolates from southern and eastern Mediterranean countries, J Antimicrob Chemother 2007; 60(6): 1310-5.
11. Rice LB: Antimicrobial resistance in gram positive bacteria, Am J Infect Control 2006; 34(5): 11-9.
12. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus, Clin Microbiol Infect 2007; 13(3): 222-35.

13. Rice LB, Bonomo RA: Mechanisms of resistance to antimicrobial agents, “Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds): Manual of Clinical Microbiology” kitabında s.1114-45, ASM Press, Washington (2007).
14. Witte W, Cuny C, Klare I, Nübel U, Strommenger B, Werner G. Emergence and spread of antibiotic-resistant Gram positive bacterial pathogens, Int J Med Microbiology 2008; 298: 365–77.
15. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A New Class of Genetic Element, Staphylococcus Cassette Chromosome *mec*, Encodes Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* Antimicrob Agents Chemother 2000; 44(6): 1549–55.
16. Ito T, Ma XX, Takeuchi F, Okuma K, Yuzawa H, Hiramatsu K. Novel type V staphylococcal cassette chromosome *mec* driven by a novel cassette chromosome recombinase *ccrC*, Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(7): 2637-51.
17. Ito T, Okuma K, Ma XX, Yuzawa H, Hiramatsu K. Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. Drug Resist Update 2003; 6(1): 41-52.
18. Wiolders CL, Vriens MR, Brisse S et al. In-vivo transfer of *mecA* DNA to *Staphylococcus aureus*. Lancet 2001; 357(9269): 1674-5.
19. Wu SW, de Lencastre H, Tomasz A. Recruitment of the *mecA* homologue of *Staphylococcus sciuri* into a resistance determinant and expression of the resistant phenotype in *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 2001; 183(8): 2417-24.
20. Gülay Z. Koagülaz-Negatif Stafilokoklar: Mikrobiyoloji, Epidemiyoloji ve Patogenez, Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Önemli ve Sorunlu Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları, Bilimsel Tıp Yayınevi, s.73-103 Ankara 2004.
21. Herold BC, Immergluck LC, Maranan MC et al. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in children with no identified predisposing risk. JAMA 1998; 279(8): 593-8.
22. Turnridge JD, Bell JM. Methicillin-resistant *Staphylococcal aureus* evolution in Australia over 35 years. Microb Drug Resist 2000; 6(3): 223-9.
23. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility, J Antimicrob Chemother 1997; 40(1):135-6.
24. Boyle-Vavra S, Labischinski H, Ebert CC, Ehlert K, Daum RS. A Spectrum of Changes Occurs in Peptidoglycan Composition of Glycopeptide-Intermediate Clinical *Staphylococcus aureus* Isolates. Antimicrob. Agents Chemother 2001; 45(1): 280-7.

25. Cui L, Ma X, Sato K et al. Cell Wall Thickening Is a Common Feature of Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2003; 41(1): 5-14.
26. Finan JE, Archer GL, Pucci MJ, Climo MW. Role of Penicillin-Binding Protein 4 in Expression of Vancomycin Resistance among Clinical Isolates of Oxacillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 2001; 45 (11): 3070-5.
27. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spralt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99(11): 7687-92.
28. Nakipoğlu Y, Derbentli S, Çağatay AA, Katranci H. Investigation of *Staphylococcus* strains with heterogeneous resistance to glycopeptides in a Turkish university hospital. BMC Infect Dis 2005; 5(1): 31.
29. Sancak B, Ercis S, Menemenlioglu D, Çolakoglu S, Haşcelik G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin in a Turkish university hospital. J Antimicrob Chemother 2005; 56(3): 519-23.
30. 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): 508-10.
31. Başustaoglu A. Enterokoklarda Antibakteriyel Direnç Mekanizmaları ve Direnç Sorunu, Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Önemli ve Sorunlu Gram-Pozitif Bakteri Enfeksiyonları, Bilimsel Tıp Yayınevi, s.141-158 Ankara 2004.
32. Wegener HC, Aarestrup FM, Jensen LB, Hammerum AM, Bager F. Use of Antimicrobial Growth Promoters in Food Animals and *Enterococcus faecium* Resistance to Therapeutic Antimicrobial Drugs in Europe. Emerg Infect Dis 1999; 5(3): 329-35.
33. Sorensen TL, Blom M, Monnet DL, Frimodt-Moller N, Poulsen RL, Espersen F. Transient Intestinal Carriage after Ingestion of Antibiotic-Resistant *Enterococcus faecium* from Chicken and Pork. N Engl J Med 2001; 345(16): 1161-6.
34. Willems RJL, Top J, van Santen M et al. Global Spread of Vancomycin resistant *Enterococcus faecium* from Distinct Nosocomial Genetic Complex. Emerg Infect Dis 2005; 11(6): 821-8.
35. Rosenthal VD, Maki DG, Salomao R et al: Device associated nosocomial infections in 55 intensive care units of 8 developing countries. Ann Intern Med 2006; 145(8): 582-91.

36. Basustaoğlu A, Aydoğan H, Beyan C, Yalcin A, Unal S. First glycopeptide resistant *Enterococcus faecium* isolate from blood culture in Ankara, Turkey. *Emerg Infect Dis* 2001; 7(1): 160-1.
37. Colak D, Naas T, Gunseren F, Oğunç D, Gultekin M, Nordmann P. First outbreak of vancomycin resistant enterococci in a tertiary hospital in Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50(3): 397-401.
38. Comert FB, Kulah C, Aktas E, Ozlu N, Celebi G. First isolation of vancomycin-resistant enterococci and spread of a single clone in a university hospital in northwestern Turkey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26(1): 57-61.
39. Kacmaz B, Aksoy A. Antimicrobial resistance of enterococci in Turkey. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25(6): 535-8.
40. Darini ALC, Palepou MFI, Woodford N. Effects of the Movement of Insertion Sequences on the Structure of VanA Glycopeptide Resistance Elements in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000; 44(5): 1362-4.
41. Flannagan SE, Chow JW, Donabedian SM et al. Plasmid Content of a Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecalis* Isolate from a Patient Also Colonized by *Staphylococcus aureus* with a VanA Phenotype. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47(12): 3954-9.
42. Weigel, LM, Clewell DB, Gill SR et al. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* 2003; 302: 1569-71.
43. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Approved Standard 6th ed., NCCLS Document M7-A6, Wayne, PA (2003).
44. Hautala T, Syrjälä H , Lehtinen V et al. Blood culture Gram stain and clinical categorization based empirical antimicrobial therapy of bloodstream infection, *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25: 329–33.
45. Veijola S, Burtonwood M, Stapf J et al. Blood culture Gramstain and simple clinical categorisation can be used to identify patients at risk for delay in appropriate antibiotic treatment. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32: 538–47.
46. Søgaaard M, Nørgaard M, Schønheyder HC. First Notification of Positive Blood Cultures and the High Accuracy of the Gram Stain Report. *J Clin Microbiol* 2007; 45(4): 1113–7.

47. Bouza, E, Sousa D, Munoz P, Rodriguez-Creixems M, Fron C, Lechuz JG. Bloodstream infections: a trial of the impact of different methods of reporting positive blood culture results. Clin. Infect. Dis. 2004; 39: 1161–9.
48. Murdoch DR, Greenlees RL. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* from BacT/ALERT blood culture bottles by direct Gram stain characteristics. J Clin Pathol 2004; 57: 199–201.
49. Carver PL, Lin SW, DePestel DD, Newton DW. Impact of *mecA* Gene Testing and Intervention by Infectious Disease Clinical Pharmacists on Time to Optimal Antimicrobial Therapy for *Staphylococcus aureus* Bacteremia at a University Hospital. J Clin Microbiol 2008; 46(7): 2381–3.
50. Hallin M, Maes N, Byl B, Jacobs F, De Gheldre Y, Struelens MJ. Clinical Impact of a PCR Assay for Identification of *Staphylococcus aureus* and Determination of Methicillin Resistance Directly from Blood Cultures. J Clin Microbiol 2003; 41(8): 3942–4.
51. Kerremans JJ, Verboom P, Stijnen T et al. Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing reduce antibiotic use and accelerate pathogen-directed antibiotic use. J Antimicrob Chemother 2008; 61: 428–35.
52. Forrest GN, Roghmann MC, Toombs LS et al. Peptide Nucleic Acid Fluorescent In Situ Hybridization for Hospital-Acquired Enterococcal Bacteremia: Delivering Earlier Effective Antimicrobial Therapy, Antimicrob. Agents Chemother. 2008; 52(10): 3558–63.
53. Carroll KC, Leonard RB, Newcomb-Gayman PL, Hillyard DR. Rapid detection of the staphylococcal *mecA* gene from BACTEC blood culture bottles by the polymerase chain reaction. Am J Clin Pathol. 1996; 106(5): 600–5.
54. Anthony RM, Brown TJ, French GL. Rapid Diagnosis of Bacteremia by Universal Amplification of 23S Ribosomal DNA Followed by Hybridization to an Oligonucleotide Array. J Clin Microbiol 2000; 38(2): 781–8.
55. Jordan JA, Durso MB. Comparison of 16S rRNA Gene PCR and BACTEC 9240 for Detection of Neonatal Bacteremia. J Clin Microbiol 2000; 38(7): 2574–8.
56. Lem P, Spiegelman J, Toye B, Ramotar K. Direct detection of *mecA*, *nuc* and 16S rRNA genes in BacT/Alert blood culture bottles. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2001; 41: 165–8.
57. Maes N, Magdalena J, Rottiers S, De Gheldre Y, Struelens MJ. Evaluation of a Triplex PCR Assay To Discriminate *Staphylococcus aureus* from Coagulase-Negative

- Staphylococci and Determine Methicillin Resistance from Blood Cultures. J Clin Microbiol 2002; 40(4): 1514–7.
58. Louie L, Goodfellow J, Mathieu P, Glatt A, Louie M, Simor AE. Rapid Detection of Methicillin-Resistant Staphylococci from Blood Culture Bottles by Using a Multiplex PCR Assay. J Clin Microbiol 2002; 40(8): 2786–90.
59. Marlowe EM, Hogan JJ, Hindler JF, Andruszkiewicz I, Gordon P, Bruckner DA. Application of an rRNA Probe Matrix for Rapid Identification of Bacteria and Fungi from Routine Blood Cultures. J Clin Microbiol 2003; 41(11): 5127–33.
60. Brecher, ME, Hogan JJ, Boothe G et al. Platelet bacterial contamination and the use of a chemiluminescence-linked universal bacterial ribosomal RNA gene probe. Transfusion 1994; 34: 750–5.
61. Christensen JE, Stenjl JA, Reed KD. Rapid Identification of Bacteria from Positive Blood Cultures by Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism Profile Analysis of the 16S rRNA Gene. J Clin Microbiol 2003; 41(8): 3790–3800.
62. Levi K, Towner KJ. Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Blood with the EVIGENE MRSA Detection Kit. J Clin Microbiol 2003; 41(8): 3890–2.
63. Lindholm L, Sarkkinen H. Direct Identification of Gram-Positive Cocci from Routine Blood Cultures by Using AccuProbe Tests. J Clin Microbiol 2004; 42(12): 5609–13.
64. Wellinghausen N, Wirths B, Essig A, Wassill L. Evaluation of the Hyplex BloodScreen Multiplex PCR–Enzyme-Linked Immunosorbent Assay System for Direct Identification of Gram-Positive Cocci and Gram-Negative Bacilli from Positive Blood Cultures. J Clin Microbiol 2004; 42(7): 3147–52.
65. Fujita SI, Senda Y, Iwagami T, Hashimoto T. Rapid Identification of Staphylococcal Strains from Positive-Testing Blood Culture Bottles by Internal Transcribed Spacer PCR Followed by Microchip Gel Electrophoresis. J Clin Microbiol 2005; 43(3): 1149–57.
66. Saruta, K, Matsunaga T, Kono M et al. Rapid identification and typing of *Staphylococcus aureus* by nested PCR amplified ribosomal DNA spacer region. FEMS Lett. 1997; 146: 271–278.
67. Fujita SI, Senda Y, Nakaguchi S, Hashimoto T. Multiplex PCR using internal transcribed spacer 1 and 2 regions for rapid detection and identification of yeast strains. J Clin Microbiol 2001; 39: 3617–22.

68. Cleven BEE, Palka-Santini M, Gielen J, Meembor S, Krönke M, Krut O. Identification and Characterization of Bacterial Pathogens Causing Bloodstream Infections by DNA Microarray. J Clin Microbiol 2006; 44(7): 2389–97.
69. Pingle MR, Granger K, Feinberg P et al. Multiplexed Identification of Blood-Borne Bacterial Pathogens by Use of a Novel 16S rRNA Gene PCR-Ligase Detection Reaction-Capillary Electrophoresis Assay. J Clin Microbiol 2007; 45(6): 1927–35.
70. Tang YW, Kilic A, Yang Q et al. StaphPlex System for Rapid and Simultaneous Identification of Antibiotic Resistance Determinants and Panton-Valentine Leukocidin Detection of Staphylococci from Positive Blood Cultures, J Clin Microbiol 2007; 45(6): 1867–73.
71. Goldmeyer J, Li H, McCormac M et al. Identification of *Staphylococcus aureus* and Determination of Methicillin Resistance Directly from Positive Blood Cultures by Isothermal Amplification and a Disposable Detection Device, J Clin Microbiol, 2008; 46(4): 1534–6.
72. Yen Tan T, Corden S, Barnes R, Cookson B. Rapid Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Positive Blood Cultures by Real-Time Fluorescence PCR. J Clin Microbiol 2001; 39(12): 4529–31.
73. Shrestha NK, Tuohy MJ, Hall GS, Isada CM, Procop GW. Rapid Identification of *Staphylococcus aureus* and the *mecA* Gene from BacT/ALERT Blood Culture Bottles by Using the LightCycler System. J Clin Microbiol 2002; 40(7): 2659–61.
74. Wellingshausen N, Wirths B, Franz AR, Karolyi L, Marre R, Reischl U. Algorithm for the identification of bacterial pathogens in positive blood cultures by real-time LightCycler polymerase chain reaction (PCR) with sequence-specific probes, Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2004; 48(4): 229–41.
75. Sakai H, Procop GW, Kobayashi N et al. Simultaneous Detection of *Staphylococcus aureus* and Coagulase-Negative Staphylococci in Positive Blood Cultures by Real-Time PCR with Two Fluorescence Resonance Energy Transfer Probe Sets. J Clin Microbiol 2004; 42(12): 5739–44.
76. Adams DN. Shortcut Method for Extraction of *Staphylococcus aureus* DNA from Blood Cultures and Conventional Cultures for Use in Real-Time PCR Assays. J Clin Microbiol 2005; 43(6): 2932–3.
77. Shrestha NK, Tuohy MJ, Padmanabhan RA, Hall GS, Procop GW. Evaluation of the LightCycler *Staphylococcus* M^{GRADE} Kits on Positive Blood Cultures That Contained Gram-Positive Cocci in Clusters. J Clin Microbiol 2005; 43(12): 6144–6.

78. Stamper PD, Cai M, Howard T, Speser S, Carroll KC. Clinical Validation of the Molecular BD GeneOhm StaphSR Assay for Direct Detection of *Staphylococcus aureus* and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Positive Blood Cultures. J Clin Microbiol 2007; 45(7): 2191–6.
79. Wu YD, Chen LH, Wu XJ et al. Gram Stain-Specific-Probe-Based Real-Time PCR for Diagnosis and Discrimination of Bacterial Neonatal Sepsis. J Clin Microbiol 2008; 46(8): 2613–9.
80. Ruimy R, Dos-Santos M, Raskine L et al. Accuracy and Potential Usefulness of Triplex Real-Time PCR for Improving Antibiotic Treatment of Patients with Blood Cultures Showing Clustered Gram-Positive Cocci on Direct Smears. J Clin Microbiol 2008; 46(6): 2045–51.
81. Oliveira K, Procop GW, Wilson D, Coull J, Stender H. Rapid Identification of *Staphylococcus aureus* Directly from Blood Cultures by Fluorescence In Situ Hybridization with Peptide Nucleic Acid Probes. J Clin Microbiol 2002; 40(1): 247–51.
82. Oliveira K, Brecher SM, Durbin A et al. Direct Identification of *Staphylococcus aureus* from Positive Blood Culture Bottles. J Clin Microbiol 2003; 41(2): 889–91.
83. Peters RPH, Savelkoul PHM, Simoons-Smit AM, Danner SA, Vandenbroucke-Grauls CMJE, van Agtmael MA. Faster Identification of Pathogens in Positive Blood Cultures by Fluorescence In Situ Hybridization in Routine Practice. J Clin Microbiol 2006; 44(1): 119–23.
84. Peters RPH, van Agtmael MA, Simoons-Smit AM, Danner SA, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Savelkoul PHM. Rapid Identification of Pathogens in Blood Cultures with a Modified Fluorescence In Situ Hybridization Assay. J Clin Microbiol 2006; 44(11): 4186–8.
85. Tavares A, Inácio J, Melo-Cristino J, Couto I. Use of Fluorescence In Situ Hybridization for Rapid Identification of Staphylococci in Blood Culture Samples Collected in a Portuguese Hospital. J Clin Microbiol 2008; 46(9): 3097–100.
86. Fredricks DN, Relman DA. Improved amplification of microbial DNA from blood cultures by removal of the PCR inhibitor sodium polyanethanesulfonate. J Clin Microbiol 1998; 36: 2810–6.
87. Al-Soud WA, Radström P. Purification and characterization of PCR inhibitory components in blood cells. J Clin Microbiol 2001; 39: 485–93.

88. Al-Soud WA, Jönsson LJ, Radström P. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 345–50.