

**T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

***STAPHYLOCOCCUS AUREUS*'LARDA METİSİLİN  
DİRENCİNİN TESPİTİNDE OKSASİLİN-SEFOKSİTİN  
DİSK DİFÜZYON, OKSASİLİN AGAR TARAMA,  
LATEKS AGLÜTİNASYON, *mecA* GEN TESPİTİ VE  
BİR OTOMATİZE SİSTEMİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Meryem IRAZ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Mehmet Sait TEKEREKOĞLU**

**MALATYA – 2008**

**T.C.  
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

***STAPHYLOCOCCUS AUREUS*'LARDA METİSİLİN  
DİRENCİNİN TESPİTİNDE OKSASİLİN-SEFOKSİTİN  
DİSK DİFÜZYON, OKSASİLİN AGAR TARAMA,  
LATEKS AGLÜTİNASYON, *mecA* GEN TESPİTİ VE BİR  
OTOMATİZE SİSTEMİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Meryem IRAZ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Mehmet Sait TEKEREKOĞLU**

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince beni motive ederek çalışmamı zevkli ve verimli bir şekilde gerçekleştirmeme olanak sağlayan, karşılaştığım her türlü zorluğu aşmamda büyük desteğini gördüğüm danışman hocam Doç. Dr. Mehmet Sait TEKEREKOĞLU'na: Çalışmamın moleküler kısmında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Rıza DURMAZ ve Yrd. Doç. Dr. Barış OTLU'ya; Çalışmamın deneysel kısmında, tez değerlendirme aşamasında ve tüm eğitimim boyunca yapıcı eleştiri ve önerilerinden çok faydalandığım Doç. Dr. Selma AY'a sonsuz şükran duygularıyla teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca, yukarıda adı geçen hocalarımla birlikte, uzmanlık eğitimim boyunca mesleğini seven ve bizlere de sevdiren, yetişmemde büyük emeği olan örnek özveri ve performanslarıyla Prof. Dr. Bengül DURMAZ, Doç. Dr. Çiğdem KUZUCU, Yrd. Doç. Dr. Gülay YETKİN ve anabilim dalı başkanımız Doç. Dr. İ. Halil ÖZEROL'a,

Bütün asistan, yüksek lisans ve doktora öğrencisi arkadaşlarıma,

Koşulsuz özveride bulunan Uzm. Bio. Neşe TAŞTEKİN'e, Uzm. Bio. Bennur DUMAN ve diğer tüm laboratuvar çalışanlarına,

Benimle bu eğitim sürecini tamamlamanın mutluluğunu paylaşan eşim Mustafa IRAZ ve çocuklarım İsmail ve İnci IRAZ'a,

Manevi desteğini esirgemeyen anne, baba ve kardeşlerime teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

# İÇİNDEKİLER

Kısaltmalar Dizini	II
Tablolar Dizini	III
Şekiller ve Resimler Dizini	IV
Giriş ve Amaç	1
Genel Bilgiler	3
Stafilokoklar	4
Patogenez ve İmmünite	8
Stafilokokal toksinler	8
Stafilokokal enzimler	10
<i>S. aureus</i> 'un İdentifikasyonu	12
<i>S. aureus</i> için ek doğrulayıcı testler	14
Epidemiyoloji	15
<i>S. aureus</i> 'un Yaptığı Hastalıklar	16
Antimikrobiyal Duyarlılık	17
Metisilin direncinin saptanması	19
Beta-Laktam Antibiyotiklerin Etki Mekanizması	20
Stafilokoklarda metisilin direnç mekanizmaları	20
Materyal ve Metod	27
Bulgular	39
Tartışma	44
Sonuçlar	57
Özet	58
Summary	60
Kaynaklar	62

## KISALTMALAR DİZİNİ

BORSA	: borderline-resistant <i>S. aureus</i>
CLSI	: clinical and laboratory standards institute
CoNS	: koagülaz negatif stafilokok
CRF	: coagülaze-reakting factor
DNA'se	: deoksiribonükleaz
ETA	: eksfoliyatif toksinA
ETB	: eksfoliyatif toksinB
Ig	: immunglobulin
MBK	: minimal bakterisidal konsantrasyon
MİK	: minimum inhibitör konsantrasyon
MODSA	: metisilin intermediate <i>S. aureus</i>
MRSA	: Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
NAG	: N-asetilglikozamin
NAM	: N-asetilmuramik asit
OS-MRSA	: oksasiline duyarlı MRSA
PBP	: Penisilin bağlayan protein
P-V lökositidin	: Panton-Valentin lökositidin
PZR	: polimeraz zincir reaksiyonu
<i>S. aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
SCCmec	: stafilokokal kaset kromozomu
TBE	: Tris, Borik asit, EDTA
TSS-1	: toksik şok sendrom toksin-1
VISA	: Vankomisine azalmış duyarlılık gösteren <i>S. aureus</i>
VRSA	: Vankomisine dirençli <i>S. aureus</i>

## TABLolar DİZİNİ

**Tablo 1.** *S. aureus*'un biyokimyasal ve diğer temel özellikleri

**Tablo 2:** *S. aureus*'un sebep olduğu infeksiyonlar

**Tablo 3:** BORSA, MODSA VE OS-MRSA'nın özellikleri

**Tablo 4.** Triptik Soy Agar besiyerinin içeriği

**Tablo 5.** Muller-Hinton agar besiyerinin içeriği

**Tablo 6.** Mannitol salt agar besiyerinin içeriği

**Tablo 7.** 2X amplifikasyon karışımının hazırlanması

**Tablo 8.** 50 µl olan amplifikasyon karışımının hazırlanması

**Tablo 9.** Amplifikasyon programı

**Tablo 10.** Suşların *mecA* geni varlığına göre dağılımı ve kullanılan yöntemlerin MRSA, MSSA olarak belirledikleri suş sayıları

**Tablo 11.** *mecA* geni varlığına göre yöntemlerin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif yorumlama gücü değerleri

**Tablo 12.** Fenotipik ve genotipik incelemelerde OS-MRSA olarak tespit edilen suşlar

**Tablo 13.** *mecA* genine sahip olduğu halde fenotipik yöntemlerle duyarlı bulunana *S. aureus* suşları

## ŞEKİLLER DİZİNİ

**Şekil-1:** Peptidoglikan zincirler ve aralarındaki çapraz bağlar.

**Şekil 2.** Jel elektroforezde *mecA* sonuçlarının görünümü

**Şekil 3.** *S. aureus* ve MRSA örneklerinin yoğun bakımlar, cerrahi ve dahili birimlere göre dağılımı

**Şekil 4:** *S. aureus* ve MRSA'ların klinik örneklere göre dağılımı.

## RESİMLER DİZİNİ

**Resim 1:** Stafilokokların kanlı agar besiyerindeki görünümleri.

**Resim 2:** Koagülaz testi görünümü

**Resim 3:** Oksasilin agar tarama plağında görünüm

**Resim 4:** PBP2a lateks aglütinasyon testinin görünümü.

**Resim 5:** *S. aureus* örneklerinin mannitol salt agarda CoNS ile karşılaştırmalı görünümleri.

## GİRİŞ VE AMAÇ

Stafilokoklar, normal floranın bulunduğu üst solunum yolu, gastrointestinal ve ürogenital sistemde ve nemli deri kıvrımlarında bulunan mikroorganizmalardır. Çocuk ve erişkinlerde *S. aureus* taşıyıcılığı oldukça yaygındır. Normal sağlıklı erişkinlerin yaklaşık %15'inde nazofaringeal *S. aureus* taşıyıcılığı bulunmakla birlikte yatan hastalar, sağlık personeli, ekzematöz deri hastalığı olanlar ve sürekli ilaç kullananlarda bu oran daha yüksektir. *S. aureus* fırsatçı bir patojendir ve uygun koşulların bulunması durumunda daha ciddi infeksiyonlara yol açabilir. *S. aureus* hem hastane hem de toplumdan en sık izole edilen patojenlerden biri olması sebebiyle insan sağlığı için son derece önemlidir. Bu mikroorganizma, pnömoni, deri ve yumuşak doku infeksiyonları, kan dolaşımı infeksiyonları ve hastane kaynaklı postoperatif yara infeksiyonlarından en çok izole edilen bakteriyel ajandır. Ayrıca sepsis ve endokardit gibi hayatı tehdit eden ciddi infeksiyonlara da sebep olabilmektedir.

Penisilinin kullanıma girmesinden hemen sonra çok az saptanabilen penisilin direnci, bugün insanlardan izole edilen *S. aureus* suşlarının %95'inden fazlasında görülmektedir. Bu direnç beta-laktamaz (penisilinaz) enziminin beta-laktam halkasını parçalayarak penisilini inaktive etmesine bağlıdır. 1960'lı yıllarda beta-laktamaza dirençli penisilinler (metisilin, oksasilin, nafsilin) kullanıma girmiştir. Beta-laktamaza dirençli penisilinlerin kullanıma girmesinden kısa bir süre sonra bu antibiyotiklere de dirençli suşların ortaya çıktığı saptanmıştır. Bu direnci gösteren bakterilerin, sefalosporinler de dahil tüm beta-laktam antibiyotiklere dirençli oldukları saptanmış ve bu suşlara metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları denilmiştir. MRSA suşları diğer *S. aureus* suşlarının sahip olduğu bütün patojenik özelliklere sahiptir ve aynı şekilde virulandır. Bu suşların metisiline direncini sağlayan özellik, metisiline duyarlı suşlarda



bulunmayan farklı bir penisilin bağlayan protein (PBP) içermeleridir. Bu PBP normal stafilokok suşlarında bulunan PBP-1, 2 ve 3'ten farklıdır ve PBP2a olarak adlandırılır. Bu enzim, sefalosporinler ve karbapenemler de dahil olmak üzere tüm beta-laktam antibiyotiklere düşük afinite gösterir, bu antibiyotiklerin varlığında aktivitesini devam ettirir ve hücre duvarındaki peptidoglikan çapraz bağlarını bağlayarak bakterinin canlılığını sürdürmesine olanak sağlar. PBP2a enzimi, MRSA suşlarının kromozomunda bulunan *mecA* geni tarafından kodlanır. MRSA suşları beta-laktam dışı birçok antibiyotiğe de direnç gösterebilmektedir.

Yüksek antibiyotik direnci, tedavi başarısını azaltırken, metisilin direncinin doğru saptanmasının önemini ortaya koymaktadır. Hasta örneklerinde metisilin direncinin belirlenmesindeki hatalar, ciddi klinik sorunlara neden olabilmektedir. Metisilin direncinin saptanmasında yalancı negatif sonuçlar yetersiz tedaviye ve MRSA suşlarının yayılmasına, yalancı pozitif sonuçlar ise glikopeptitlerin gereksiz kullanımına ve izolasyon tedbirleri nedeniyle aşırı maliyete sebep olmaktadır. Bu nedenle *S. aureus* suşlarında metisilin direncinin doğru tanımlanması son derece önemlidir. MRSA suşlarının ortaya çıkarılmasında *mecA* geninin belirlenmesi altın standarttır. Ancak özel laboratuvar donanımı ve deneyimli personel gerektirmesi nedeniyle rutin laboratuvarlarda kullanımı pratik değildir.

MRSA tespiti için rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan en yaygın yöntemler disk difüzyon ve agar tarama yöntemleridir. Son zamanlarda bu amaçla otomatize yöntemler ve PBP2a'yı saptayan lateks aglütinasyon kitleri de geliştirilmiştir. Ancak MRSA'ların tanımlanmasında *mecA* tespitine alternatif olarak kullanılan bu yöntemlerin verimlilikleri merkezlere göre değişmektedir. Bu çalışmamızda: Turgut Özal Tıp Merkezi rutin mikrobiyoloji laboratuvarında *S. aureus* olarak tanımlanmış klinik örneklerde, *mecA*'nın varlığı referans alınarak; oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon testi, agar tarama testi, otomatize sistem ve PBP2a lateks aglütinasyon tarama yöntemlerinin MRSA'yı doğru saptamadaki başarılarının değerlendirilmesi amaçlandı.

## GENEL BİLGİLER

Stafilokoklar 100 yılı aşkın bir süredir infeksiyon etkeni olarak tıp dünyasında söz konusu olan bir mikroorganizmadır. Stafilocokları ilk kez 1878'de Robert Koch tanımlamış ve 1880'de Pasteur sıvı besiyerinde üretmiştir. Ardından, 1884'te Rosenbach hasta örneklerinden bu mikroorganizmaları izole etmiş ve beyaz renkli kolonileri "*Staphylococcus albus*", sarı-portakal rengi kolonileri ise "*Staphylococcus aureus*" olarak isimlendirilmiştir. Bakterinin Kraus ve Clairmont tarafından 1900'da alfa toksini, Glenny ve Stevens tarafından 1935'te beta toksini bulunmuştur. Smith ve Price 1938'de gama toksin ve Williams ile Harper 1947'de delta toksin varlığını açıklamışlardır. Todd ve arkadaşları tarafından 1978'de yeni bir hastalık olarak "Toksik Şok Sendromu" tanımlanmıştır (1). Fleming'in 1928 yılında penisilini bulmasına kadar stafilocoklar ağır seyirli ve hatta ölümlü sonuçlanabilen tedavisi sorunlu infeksiyonlara sebep oluyordu. Stafilocok tedavisinde ilk adım, 1940 yılında Oxford'da Florey, Chain ve arkadaşları tarafından penicillium kültürlerinden penisilinin saflaştırılmasıyla atılmıştır. Fakat penisilinin klinik kullanıma girmesinden kısa bir süre sonra penisiline dirençli stafilocoklar görülmeye başlanmıştır (2). İlk kez 1944 yılında Kirby tarafından penisilinaz üreten stafilocoklar tespit edilmiştir. Penisilinaz üreterek penisiline direnç kazanmış *S. aureus* suşları 1950'li yılların sorunlu bakterileri olmuşlardır. Penisilinaza dirençli penisilinlerin 1960'da kullanıma girmesinden iki yıl sonra görülen metisilin direnci, antimikrobialleri tedavi seçeneklerini önemli ölçüde sınırlandırmıştır. *S. aureus* 1980'li yıllardan sonra tüm dünyada hastane infeksiyonu etkenleri arasında önemli bir artış göstererek adeta yeniden doğmuştur. Tüm beta-laktam antibiyotiklere dirençli MRSA suşları beta-laktam dışı antibiyotiklerin çoğuna da dirençli olduklarından, bu suşlarla oluşan ağır infeksiyonların tedavisinde glikopeptit

antibiyotikler tek seçenek haline gelmiştir (3). İlk kez 1995 yılında Fransa’da vankomisine azalmış duyarlılık gösteren *S. aureus* (VISA), 1996’da Japonya’da hetero-VISA ve sonunda 2002 yılında A.B.D’de vancomycin resistant *S. aureus* (VRSA) suşlarının saptanması ile stafilocoklarda çoğul antimikrobiyal direnç sorunu daha da ciddi hale gelmiştir (4-6).

## **Stafilokoklar**

### **Tanım**

*Staphylococcus* cinsi “*Micrococcus*”, “*Stomatococcus*” ve “*Planococcus*” cinsleriyle birlikte “*Micrococcaceae*” ailesi içinde yer alır. Yunancada bir salkım üzüm anlamına gelen *staphyle* (üzüm salkımı) ve *coccus* (tane) sözcüklerinden türetilmiştir. Bu yüzden *Staphylococcus*, bu Gram pozitif kokların üzüm tanelerinin kümelenmesine benzer şekildeki üremesini ifade etmek için kullanılır. Fakat klinik materyallerde bu mikroorganizma tek, çift veya kısa zincirler halinde de görülebilir (1,7).

Stafilokoklar dış çevre koşullarına dayanıklı bakterilerdir. Kurumuş klinik materyallerden aylar sonra bile izole edilebilir (1). Antimikrobiyal ajanlara hızla direnç geliştiren bakterilerdendir. Dirençli suşlarla oluşan infeksiyonlarda ciddi tedavi sorunlarının ortaya çıkması stafilocoklara olan ilgiyi artırmaktadır.

### **Morfoloji ve boyanma özellikleri**

Stafilokokların çoğu 0.5-1.5 µm çapında, hareketsiz, sporsuz, kısa zincirler yada düzensiz kümeler oluşturan küresel şekle sahip Gram pozitif boyanan mikroorganizmalardır (7).

### **Kültür özellikleri**

Stafilokoklar aerop ve fakültatif anaerobik bakterilerdir. Yüksek tuz konsantrasyonunda (%10 NaCl) ve 18-40 °C arasında klasik besiyerlerinde üreyebilme özelliklerine sahiptir. Optimal üreme ısısı 30-37 °C ve pH: 7-7,5’tir. Kanlı agarda 18-24 saatte yuvarlak, düzgün kenarlı, hafif konveks, opakt, 1-4 mm çapında koloniler yapar.

Stafilokoklar çoğu insanda bulunabilen 35 tür ve 17 alt türden oluşur. İnsanda hastalık oluşturan bu cinsin en iyi bilinen, en virulan, en yaygın türü *S. aureus*’tur. *S. aureus* üreme esnasında karotenoit pigmente bağlı olarak altın sarısı renginde koloniler oluşturur. Oluşturduğu koloni rengine bağlı olarak bu tür adı verilmiştir. *S. aureus* kanlı

agarda beta hemoliz yapar. İnsanda bulunan stafilokok türlerinden sadece bu tür koagülaz enzimi üretir (1,7).

### **Biyokimyasal özellikleri**

*S. aureus*'un biyokimyasal ve diğer temel özellikleri Tablo 1'de özetlenmiştir.

Tablo 1. *S. aureus*'un biyokimyasal ve diğer temel özellikleri (1)

Özellik	<i>S. aureus</i>	Özellik	<i>S. aureus</i>
Aerop üreme	+	Ksiloz	-
Anaerop üreme	+	Cellobiose	-
Hemoliz	+	Glukoz	+
Koagülaz	+	Hücre duvarı	
DNA'se (Endonükleaz)	+	a. ribitol	+
TMPA'da renk değişikliği	+	b. gliserol	-
Asetoin	+	c. protein-A	+
Mannitol (asit oluşturma)	+	Alfa toksin	+
Trehaloz	+	Novobiosin duyarlılığı	+
Maltoz	+	Basitrasin duyarlılığı	-
Laktoz	+		

+: pozitif, -: negatif, TMPA: trehaloz-mannitol fosfataz agar

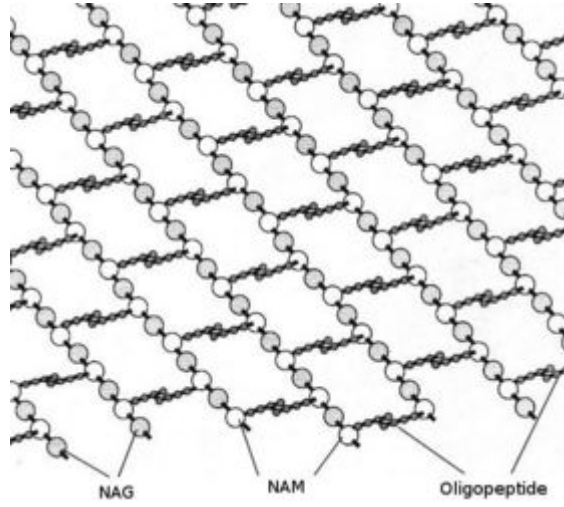
### **Kapsül ve slime tabakası**

Stafilokokların hücre duvarının en dış tabakası polisakkarit bir kapsül ile örtülebilmektedir. *S. aureus*'da 11 kapsüler serotip tanımlanmaktadır. İnfeksiyonların çoğu serotip 5 ve 7 ile ilişkilidir. Serotip 1 ve 2 çok kalın bir kapsüle sahiptir ve mukoid görünümlü koloniler oluşturur. Kapsül, bakteriyi fagositozdan korur. Genetik faktörler ve üreme ortamlarına bağlı olarak, çoğu stafilokoklar tarafından monosakkarit, protein ve küçük peptitlerin oluşturduğu, suda çözünabilir, gevşek bağlı ince bir tabaka (slime tabakası) üretilir. Bu ekstrasellüler yapı bakteriyi dokulara ve kateter, greft, protez kapak, protez eklem ve şant gibi yabancı cisimlere bağlar. Bu da özellikle kısmen avirulan koagülaz negatif stafilokokların hayatta kalması için önemlidir (7).

### **Peptidoglikan**

Gram pozitif bakteriler için en genel özellik, hücre duvarı ağırlığının yarısını peptidoglikan tabakasının oluşturmasıdır. Glikan zincirlerin tabakalarından oluşan peptidoglikan iskelet N-asetilmuramik asit ve N-asetilglukozaminin 10-12 değişken subunitinden meydana gelir. N-asetilmuramik asit subunitlerine bağlanan oligopeptit yan zincirler pentaglisin köprüleriyle çapraz bağlanırlar. (Şekil-1). Gram (-) bakterilerin aksine, Gram (+) bakterilerde peptidoglikan tabaka hücre duvarını daha rijit yapan birçok çapraz bağlı tabakadan meydana gelir. Peptidoglikan endojen pirojenlerin

uretimini, kompleman aktivasyonu, monositlerden interlökin-1 üretimini ve lökositlerin kemotaksisini stimüle eden endotoksin benzeri aktiviteye sahiptir (7).



**Şekil-1.** Peptidoglikan zincirler ve aralarındaki çapraz bağlar. NAG: N-asetilglukozamin, NAM: N-asetilmuramik asit (8).

### **Penisilin bağlayan protein (PBP)**

Hücre duvarının sentezi çoklu enzimatik adımlardan oluşan bir süreçtir. Özetle, disakkarit peptitler şeklindeki prekürsörler plazma membranından transport edilir ve ilk duvar sentezine katılması sağlanır. Son basamakta, oluşan peptit zinciri henüz çapraz bağlanmamış peptit ve önceden hazırlanmış peptidoglikan arasında peptit bağı oluşturur. Bu bağlanma transpeptidaz enzimleri tarafından gerçekleştirilir. Bu transpeptidasyon olayı üç boyutlu bir ağ oluşumuna sebep olur ve hücre duvarına tam bir sağlamlık kazandırır (9).

Transpeptidaz ve karboksipeptidazlar gibi hücre duvarı sentezinin son basamağına katılan bütün enzimler plazma membranına sıkıca bağlanmış durumdadırlar. Bu enzimler ayrıca beta-laktam antibiyotiklere kovalent olarak bağlandığı ve yine bu antibiyotikler tarafından inaktive edildikleri için penisilin bağlayan proteinler olarak da isimlendirilirler (9-13). Kısaca PBP'ler hücre duvarında bulunan, transpeptidaz, karboksipeptidaz ve endopeptidaz gibi enzimlerdir. Bu enzimler bakterinin büyüme ve bölünmesi sırasında hücre duvarının bir araya gelmesi ve şekil almasından sorumludurlar. Bakteriler yapıları birbirine benzer dört ayrı özellikte PBP yaparlar (1). Değişik bakteri türlerinde PBP'lerin sayısı, büyüklük, değişik penisilinlerin bunlara afinitesi ve inaktivasyonları sonucunda bakteride oluşan etki

açısından farklılık vardır. Penisilinler bağlandıkları PBP'lere göre bakterilerde farklı etki gösterir. *S. aureus*'larda hücre duvarı sentezinde normalde PBP 1, 2 ve 3 görev alır. Bunlara ek olarak MRSA'lar farklı bir PBP olan PBP2a' ya sahiptirler. PBP'lerin inaktivasyonu bakterinin ölümüne yol açarken PBP'nin beta-laktam antibiyotiklere olan affinitesindeki azalma ise direnç neden olur (11,14,15).

### **Teikoik asit**

Hücre duvarı kuru ağırlığını %30-50'sini oluşturan bir diğer önemli komponentidir. Teikoik asit, fibronektine spesifik olarak bağlanarak stafilokokların mukozal yüzeylere yapışmasına aracılık eder. Teikoik asitler eksik immunojen olmasına rağmen peptidoglikana bağlandığında spesifik bir antikor cevabını uyarır. Bu antikor cevabının izlenmesi sistemik stafilokok infeksiyonlarının saptanmasında kullanılmaktadır. Fakat bu diğer tanı koydurucu testlerden daha az duyarlıdır ve bugün kullanılmamaktadır (7).

### **Protein-A**

Çoğu *S. aureus*'un yüzeyi peptidoglikan tabakasına ya da stoplazmik membrana bağlanan protein-A ile kaplanmıştır. İmmunglobulin (Ig) G1, IgG2 ve IgG4'ün Fc reseptörlerine bağlanır. Bu da organizmanın antikor aracılı immun klirensini etkili bir şekilde önler. Kompleman aktivasyonu ve immunkompleks oluşumuna yol açar. Başka antijenlere karşı antikorların nonspesifik bir taşıyıcı olarak Protein-A'nın kullanımı Co-aglutinasyon deneyinde olduğu gibi bazı serolojik testlerde oldukça başarılı sonuçlar vermektedir. Protein-A antifagositik, kemotaktik ve mitojenik etkiler de gösterir. Koagülaz ve nükleaz aktiviteleri ile büyük oranda korelasyon gösterir ve virulans faktörüdür (1). Ayrıca Protein-A'nın saptanması, *S. aureus* için spesifik bir identifikasyon testi olarak da kullanılabilir (7).

### **Koagülaz ve diğer yüzey adezyon proteinleri**

Stafilokoklarda çok sayıda yüzey proteini tanımlanmaktadır. Çoğu *S. aureus* suşunun en dış yüzeyinde **clumping faktör** (bağlı koagülaz olarak da adlandırılır) bulunmaktadır. Bu protein *S. aureus*'da önemli bir virulans faktörüdür. Clumping faktör, fibrinojene bağlanarak fibrine dönüştürür ve stafilokokların kümeleşmesine sebep olur. Bu proteinin saptanması, *S. aureus*'un tanımlanmasında temel bir testtir. Fibronektin, fibrinojen, elastin, kollojen gibi diğer yüzey proteinleri de konak matriks

proteinlerine tutunmada önemlidir. Stafilokoklarda ve diğer bakterilerde bulunan yüzey adezyon proteinleri yeni tedavi yaklaşımlarında hedef oluşturmaktadır (7).

### **Stoplazmik membran**

Stoplazmik membran protein, lipit ve az miktardaki karbonhidratların bileşiminden oluşmaktadır. Hücrede osmotik bariyer olarak çalışır. Hücresel biyosentez ve solunum enzimlerinin sentezlenmesinde görevlidir (7).

### **Patogenez ve İmmünite**

Stafilokokal infeksiyonların patogenezi, konak dokularına bakterinin tutunmasını sağlayan yüzey proteinlerinin üretimi ile spesifik toksinler ve hidrolitik enzimler gibi ekstrasellüler proteinlerin üretilmesine bağlıdır.

### **Stafilokokal toksinler**

*S. aureus* beş sitolitik veya membran hasarlayıcı toksin (alfa, beta, delta, gama ve Panton-Valentin (P-V) lökosidin), iki eksofoliyatif toksin (A ve B), sekiz enterotoksin (A, B, C, D, E, G, H ve I) ve toksik şok sendrom toksin-1 (TSST-1)'i içeren çok sayıda virulans faktörü üretir. Sitotoksinlerin nötrofilleri parçalaması sonucu salınan lizozomal enzimler çevre dokuda yıkıma neden olabilirler. Sitotoksinlerden biri ve P-V lökosidin şiddetli pulmoner ve kutanöz infeksiyonlarla ilişkilendirilmektedir (7).

Eksofoliyatif toksin A, TSST-1 ve enterotoksinler süper antijenler olarak bilinen polipeptitler sınıfına aittir (7).

### **Alfa toksin**

Bakteriyel kromozom ve plazmidlerin her ikisi tarafından da kodlanabilen insanda hastalık oluşturan *S. aureus*'un çoğu suşları tarafından üretilen 33.kD'luk bir polipeptittir. Bu toksin damar düz kas hücrelerini bozar ve eritrosit, lökosit, hepatosit ve trombositlere zarar verir. Alfa toksinin stafilokokal hastalıklarda doku hasarında önemli bir mediyatör olduğuna inanılır (7).

### **Beta toksin**

Sfingomyelinaz C olarak da adlandırılan beta toksin, insan ve hayvanlarda hastalık oluşturabilen *S. aureus*'un çoğu suşu tarafından üretilen, 35 kD'lik ısıya duyarlı bir proteindir. Bu enzim sfingomyelin ve lizofosfatidilkolin için spesifiteye sahiptir ve eritrosit, fibroblast, lökosit ve makrofajları da içeren çoğu hücre için toksiktir. Beta toksinin insan hastalıklarındaki rolü henüz tam olarak açıklanamamıştır.

Ancak alfa toksinle birlikte stafilokok hastalıklarının karakteristik abse formasyonu ve doku yıkımından sorumlu olabileceğine inanılmaktadır (7).

### **Delta toksin**

*S. aureus* suşları ve diğer stafilokoklar tarafından üretilen 3 kD'lik bir polipeptittir. Bu toksin eritrosit, lökosit, makrofaj, lenfosit ve trombositler üzerine etkilidir. Diğer memeli hücreleri ve hücre içi membran yapılarını da içeren geniş bir sitolitik aktiviteye sahiptir. Delta toksin kısmi nonspesifik membran toksisitesiyle deterjan benzeri etki gösterir. Antijenik özelliğe sahip değildir (1,7).

### **Gamma toksin ve Panton-Valentine (P-V) lökosidin**

Hemen hemen tüm *S. aureus* suşları tarafından üretilen gama toksin ve *S. aureus* suşlarının %5'inden azı tarafından üretilen P-V lökosidin iki polipeptit zincirinden oluşan çift komponentli (S (yavaş) ve F (hızlı)) toksinlerdir. Şimdiye kadar üç S ve iki F protein tanımlanmıştır. Her iki toksini üretme yeteneğindeki bakteri bu proteinlerin tümünü 6 farklı toksin üretme potansiyeli ile kodlayabilir. Bu toksinler nötrofil ve makrofajları parçalayabilir. P-V lökositin toksini lökotoksiktir ancak hemolitik aktivitesi yoktur. Bu toksinlerin sitolitik etkisi membranlarda porus oluşumunu takiben hücre katyon gradyentindeki değişikliklere bağlı gelişen osmotik değişikliklerden kaynaklanır (7).

### **Eksfoliyatif toksinler**

Haşlanmış deri sendromu bu toksinle oluşur. Eksfoliyatif toksinin iki farklı şekli (ETA ve ETB) tanımlanmıştır. Her ikisi de hastalık yapabilir. ETA ısıya dirençli ve geni kromozomaldır. ETB ise ısıya duyarlı ve plazmid aracılıdır. Ultrastrüktürel çalışmalar, serin proteazlar olan bu toksinlere maruz kalma sonucunda epidermisin stratum granulosum tabakasındaki intrasellüler köprüler (desmozomlar)'in ayrılmasının gerçekleştiğini göstermiştir. Bu olayın tam mekanizması hala bilinmemektedir. Bu toksinler hücre yıkımı veya inflamasyonla ilişkili değildir. Bu yüzden epidermisin etkilenen tabakasında ne stafilokoklar ne de lökositler bulunmazlar. Epidermisin toksine maruz kalması sonucu koruyucu nötralizan antikorlar gelişir. Haşlanmış deri sendromu çoğunlukla küçük çocuklarda ve nadiren de büyük çocuklar ve erişkinlerde görülür. Bunun muhtemel sebeplerinden birisi ETA ve ETB'nin, duyarlı yenidoğanların epidermisinde bulunup büyük çocuk ve erişkin epidermisinde bulunmayan GM4 benzeri glikopeptitlere bağlanmalarıdır (7).



## **Enterotoksinler**

Serolojik olarak farklı 8 stafilokok enterotoksini (A-E, G-I) ve enterotoksin C'nin 3 alt tipi tanımlanmıştır. Enterotoksinler 100°C'de 30 dakika ısıtmaya, mide ve jejunum enzimlerine karşı dirençlidir. Gıda ürünleri enterotoksin üreten stafilokoklar ile kontamine olduktan sonra toksin üretimi gerçekleştiğinde, gıdanın yeniden hafifçe ısıtılması ve gastrik asite maruz kalması koruyucu olmamaktadır. Bu toksinler tüm *S. aureus* suşlarının %30-50'si tarafından üretilmektedir. Enterotoksin A hastalıkla ilişkili en yaygın toksindir. Enterotoksin C ve D kontamine süt ürünlerinde bulunur. Enterotoksin B ise stafilokokal pseudomembranöz enterokolite sebep olur. Toksin aktivitesinin tam mekanizması ise bilinmemektedir. Bu toksinler süperantijen olup; sitokin salınımı ve T hücrelerinin nonspesifik aktivasyonunu da sağlayabilmektedirler. Mide ve jejunumdaki karakteristik histolojik değişiklik epitelyum ve altındaki lamina propria'da nötrofil infiltrasyonunu içermesidir. Ayrıca bu toksinler, jejunum epitelindeki fırçamsı kenar kaybı ve mast hücrelerinden inflamatuvar mediyatörlerin salınımının uyarılmasıyla stafilokokal gıda zehirlenmesinin karakteristik özelliği olan kusmanın oluşmasından sorumlu olabilir (7).

### **Toksik şok sendrom toksin-1 (TSST-1)**

Önceden pirojenik ekzotoksin C ve enterotoksin F olarak isimlendirilen TSST-1, ısı ve proteolize dirençli, 22 kD'luk kromozom aracılı bir ekzotoksindir. Menstruasyonla ilişkili toksik şok sendromundan (TSS) *S. aureus* suşlarının % 90'ı, diğer TSS şekillerinden ise *S. aureus* suşlarının yarısının sorumlu olduğu tahmin edilmektedir. Enterotoksin B ve nadiren enterotoksin C menstruasyonla ilişkili olmayan TSS'lerin yaklaşık olarak yarısından sorumlu tutulmaktadır. TSST-1'in mukozal bariyerlerden penetre olma kabiliyeti TSS'nin sistemik etkisinden sorumludur. TSS'li hastalarda ölüm, multiorgan yetmezliğine neden olan hipovolemik şok nedeniyledir (7).

## **Stafilokokların enzimleri**

### **Koagülaz**

Stafilokoklar bağlı ve serbest olmak üzere 2 tip koagülaza sahiptir. Stafilokok hücre duvarına bağlı koagülaz doğrudan fibrinojeni fibrine dönüştürebilir ve stafilokoklarda kümelenmeye sebep olur. Serbest koagülaz ise bir plazma globulin faktörü (coagulase reacting factor) ile reaksiyona girerek bir trombin benzeri faktör (staphylothrombin) oluşturur. Bu faktör fibrinojeni fibrine dönüştürerek bağlı koagülazla aynı sonucu oluşturur. Koagülaz, stafilokok absesinin çevresinde fibrin

oluşumuna sebep olur ve böylece infeksiyon lokalize edilerek organizma fagositozdan korunur. Stafilokokların başka türleri de koagülaz üretebilir fakat bunlar genellikle hayvan patojenleridir ve nadiren insan infeksiyonuna neden olurlar (7).

### **Katalaz**

Tüm stafilokoklar katalaz enzimine sahiptir. Hemoprotein yapısındadır. Süperoksit dismutaz ve indirgenmiş flavoproteinlerin oksitlenmesi sırasında bakteri hücresi içerisinde açığa çıkan toksik hidrojen peroksiti su ve oksijene katalize eder (7,16).

### **Hyalüronidaz**

*S. aureus*'ların % 90'dan fazlası tarafından üretilen bu enzim, bağ dokunun asellüler matriksinde bulunan asidik mukopolisakkaritler olan hyalüronik asiti hidrolize eder. *S. aureus*'un dokulara yayılımını kolaylaştırır (7).

### **Fibrinolizin**

Stafilokinaz olarak ta adlandırılan bu enzim, *S. aureus* suşlarının neredeyse tamamı tarafından üretilir. Fibrin pıhtısını çözer (7).

### **Lipazlar**

*S. aureus*'un tüm suşları ve CoNS'lerin %30'undan daha fazlası birkaç farklı lipaz üretirler. Lipitleri hidrolize eden bu enzimler vücudun sebace bölgelerinde, stafilokokların barınmasını sağlayan bir fonksiyona sahiptir (7).

### **Nükleaz**

Diğer bazı türler de bu enzimi üretiyor olmasına rağmen, termostabil nükleaz enzimi, *S. aureus* için önemli bir markırdır. Bu enzimin infeksiyon patogenezindeki fonksiyonu bilinmemektedir (7).

### **Penisilinaz (beta-laktamaz)**

Penisilin tedavide ilk olarak kullanıldığı 1941'de stafilokok izolatlarının %90'dan fazlası bu antibiyotiğe duyarlıydı. Ancak, bu organizmaların primer olarak penisilinaz (beta-laktamaz) üretebilmeleri, penisiline çok hızlı bir şekilde direnç gelişmesine sebep oldu.

Beta-laktamaz enzimi, penisilinler, sefalosporinler ve benzeri beta-laktam antibiyotikleri hidrolize ederek, bu antibiyotiklere direnç gelişimine neden olur. Beta-laktam halkasındaki karbonil grubu ile bir ester köprüsü oluşturan bu enzimler, siklik amid bağını bozar ve bir açıl-enzim türevi oluştururlar. Bu reaksiyonları sonucunda beta-laktam antibiyotiklerle reaksiyona giren üç grup protein vardır:

1- Karboksi peptidazlar (Düşük molekül ağırlıklı penisilin bağlayan proteinler (PBP)).

2. Transpeptidazlar (Yüksek molekül ağırlıklı PBP'ler )

3. Beta-laktamazlar

Bütün PBP'lerin yanı sıra, beta-laktamazların çoğunluğu da aktif bölgelerinde bir serin aminoasidine sahiptirler. Bu nedenle “serin peptidazlar” olarak adlandırılan bir enzim üst ailesinde yer alırlar. Bu enzimlerin beta-laktam ajanlara bağlanması sırasında önce bir açıl-enzim türevidir oluşmaktadır. Bunu izleyen basamakta, bir deaçilasyon işlemi gerçekleşir ve enzim açıl molekülünden ayrılarak rejenere olur. PBP'ler ve beta-laktamazlar arasındaki farkı bu deaçilasyon basamağının hızı belirler. Beta-laktamazlar açıl türevinden kısa sürede ayrılır, ancak PBP'lerde bu basamak gerçekleşmez. Sonuçta reaksiyon beta-laktamazların aksine enzim inaktivasyonu ile sonlanır.

Geniş bir enzim grubu olan beta-laktamazlar moleküler yapılarına ve işlevsel özelliklerine göre sınıflandırılırlar. Bu güne kadar dört farklı moleküler sınıf (A, B, C, D) tanımlanmıştır. A, C ve D moleküler sınıflarında yer alan beta-laktamazlar yukarıda açıklanan serin-ester aracılıklı mekanizma ile işlev görürler. Sınıf B beta-laktamazlar ise kofaktör olarak çinko gerektiren metalloenzimlerdir.

A sınıfı, tercihen substratı penisilinler olan beta-laktamazlardan oluşur. Bu grup enzimler içerisinde *S. aureus*'un beta-laktamazları (Grup 2a) da yer alır (16).

Gram pozitif bakteriler arasında beta-laktamaz üreten en önemli patojen stafilokoklardır. Stafilokokal beta-laktamazlar tercihen penisilinleri hidrolize ederler. Çoğu induklenebilir ve ekstrasellüler olarak salınabilen enzimlerdir. Stafilokokal beta-laktamazlar genellikle küçük plazmidlerle veya transpozonlarla taşınmakla beraber, büyük plazmidlerin kodladığı beta-laktamazlar ve diğer direnç mekanizmaları da bulunmaktadır. Bu beta-laktamaz enzimini kodlayan genler sadece *S. aureus*'lar arasında değil, *S. aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* arasında da konjugasyonla transfer edilebilir (17,18).

### ***S. aureus*'un İdentifikasyonu**

*S. aureus*'u tanımlamada en güvenli testlerden biri koagülaz testidir. Serbest koagülaz “tüp koagülaz” ve bağlı koagülaz “lam koagülaz” yöntemleriyle tespit edilir.

#### **Lam koagülaz testi**

*S. aureus* suşlarının çoğu hücre duvarında bağlı koagülaza veya ‘clumping faktör’e sahiptir. Bu faktör hızlı hücre aglütinasyonuna sebep olan plazmadaki

fibrinojen ile direk tepkimeye girer. Bu test kanlı agar, Columbia Colistin Nalidixic Agar ya da diğerk nonselektif nutrient besiyerinde üreyen kolonilerden yapılabilir. Fakat yüksek tuz oranı *S. aureus*'un bazı suşlarında otoaglutinasyona sebep olduğu için bu test, yüksek tuz içeren besiyerlerinden (mannitol salt agar gibi) yapılmamalıdır. Clumping faktöre sahip olmayan suşlar serbest koagülaz üretebileceği için, herhangi bir suş lam koagülaz testinde negatif çıkarsa bu sonuç bir tüp koagülaz testi ile doğrulanmalıdır. *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi* gibi koagülaz negatif bazı suşlar clumping faktör üretip lam koagülaz testi ile pozitif sonuç verebilirler (19).

### **Tüpte koagülaz**

Bu metot ile saptanan koagülaz ekstrasellüler olarak salınır ve bir kompleks oluşturmak için plazmadaki Coagulase-Reacting Factor (CRF) ile reaksiyona girerek stafilotrombin oluşturur. Stafilotrombin de fibrinojenle reaksiyona girerek fibrin oluşumunu tetikler. Bazı suşlar, 35°C'de uzayan inkübasyon periyodunda pıhtının çözülmesine sebep olan fibrinolizin üreteceği için testler 35°C'de 4 saat inkübasyondan sonra oda ısısına alınmalıdır ve 18–24 saat sonra tekrar okunmalıdır. Nadiren bazı *S. aureus* suşları koagülaz negatif olabilmektedir (7,19).

Yukarıda sözü edildiği gibi hem tüp hem de lam koagülaz testi için önerilen ortam EDTA'lı tavşan plazmasıdır. *Enterococcus* türleri gibi organizmalar sitratı kullanabildiği için sitratlı plazma kullanılmamalıdır. Şayet katalaz testi yapılarak stafilokok olduğu kesin tanımlanmamışsa yanlış pozitif sonuca gidilebilir. İnsan plazması çeşitli miktarda CRF ve antistafilokokal antikorlar içerdiğinden koagülaz testi yapmada kullanılmamalıdır (19).

Tüp koagülaz testi *S. aureus* identifikasyonu için referans testdir. Bu test, pozitif sinyal veren kan kültüründen doğrudan tavşan plazması içerisine inokule edilerekte yapılabilir (19,20).

### **Koagülaz Testine Alternatif Yöntemler**

#### **Lateks aglutinasyon**

Bu yöntemde plazma ile kaplanmış lateks parçacıkları kullanılır. Latekse bağlı fibrinojen clumping faktörü saptar. Ayrıca parçacıklarda bulunan immunglobulin molekülleri stafilokokal hücre duvarı proteini olan protein A'yı da saptayabilir. Bu protein, IgG moleküllerinin Fc reseptörü ile bağlanabilmektedir. Bir agar plağından alınan kolonilerin test materyali ile karışması sonucu lateks-mikroorganizma süspansiyonu hızlı bir kümeleşme gösterir. Ayrıca *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi*'nin bazı suşları da clumping faktör üretir ve bu test ile pozitif reaksiyon verebilir (19).

### **Pasif hemaglütinasyon**

Eritrositler ya da sentetik olarak hazırlanmış polistiren lateks gibi parçacıklar, çeşitli yöntemlerle çok çeşitli antijenlerle kaplanabilirler. Bu şekilde kaplanmış olduğu antijenin taşıyıcısı durumuna gelen eritrosit ya da parçacıklar, elektrolitli ortamda bu antijenlerin antikorları ile karşılaştıklarında aglütinasyon verirler. Dolaylı hemaglütinasyon denilen bu testler çok duyarlı olup, ortamda çok az antikor bulunması bile sonuç vermek için yeterlidir. *S. aureus* hücrelerinin yüzeyindeki clumping faktörü saptamak için fibrinojen ile sensitize edilmiş koyun eritrositleri bu amaçla kullanılır (21).

### ***S. aureus* İçin Ek Doğrulayıcı Testler**

#### **Deoksiribonükleaz (DNA'se) testi**

Bazı *S. aureus* suşları zayıf ya da şüpheli tüp koagülaz reaksiyonu oluşturabilirler ve nadiren gerçekten koagülaz negatif olabilirler. Bu vakalarda koagülaz ile çok iyi uyum gösteren ek testler yapmak gerekebilir. *S. aureus* endonükleolitik ve ekzonükleolitik aktiviteye sahip olan DNA'se ve termostabil nükleaz üretir (22,23). Bu enzimlerin her ikisi de nükleik asiti hidrolize eder. DNA'se içeren bakteriler, DNA içeren besiyerinde DNA'yı parçalayıp oligonükleotidler oluştururlar. Bu deneyde DNA'lı plak besiyerine saf kültürden çizgi ekimi yapıp 35° C'de 18-24 saat bekletildikten sonra plak yüzeyine 1 N HCl damlatılmasına dayanır. Bakteri DNA'se yapıyorsa ekim çizgisinin çevresinde saydam bir zon oluşur. Endikatör olarak besiyerine toluidin mavisi konulmuş ise DNA'se varlığında bakteriler ekim çizgisi çevresinde parlak pembe bir zon oluştururlar. Endikatör olarak Methyl green konmuş besiyerinde ekim çizgisi etrafında besiyerinin yeşil rengi açılır (24). Besiyerine katılan toluidin mavisi DNA'se aktivitesini maskeleyebildiği için %0.005'i aşmamalıdır. Bu test *S. aureus*'un identifikasyonunda ek bir test olarak yardımcı olmakla birlikte başka stafilokoklar da pozitif DNA'se reaksiyonu verebilir (19,25).

#### **Thermostable endonükleaz testi**

Bu test için yine aynı DNA'se test besiyeri kullanılır. Sadece agar içerisinde 3 mm çapında çukur açılır ve 15 dakika su banyosunda kaynamış 24 saatlik sıvı kültür ile bu kuyucuklar doldurulur. Plaklar 35°C'de 1 gece inkübe edilerek çukurların çevresinde pembe bir hale oluşup oluşmadığı izlenir. Bazı hayvan izolatları (*S. caprae*, *S. schleiferi*, *S. intermedius* ve *S. hyicus* gibi) ısıya dirençli termonükleaz üretir. Bazı koagülaz negative stafilokoklar (*S. epidermitis*, *S. simulans*, *S. capitis*, *S. carnosus* gibi)

zayıf pozitif reaksiyon verebilirler. *S. aureus* endonükleaz testinin özgüllüğü, *S. aureus* enzimlerine karşı hazırlanmış monoklonal veya poliklonal antikolarla seroinhibisyon reaksiyonu veya *S. aureus* ısı stabil endonükleazını kodlayan *nuc* geni PZR ile gösterilerek doğrulanabilir (24,26).

### **Mannitol fermentasyonu**

*S. epidermidis* ve diğer koagülaz negatif türlerin aksine, *S. aureus* mannitolü fermente edebilir. *S. aureus*'un dışkı, çevre ve nasal taşıyıcılarda taranmasında bu özelliği kullanılır. Kullanılan besiyeri "mannitol salt agar"dır. Bu besiyeri mannitol (%1), NaCl (%7.5), fenol kırmızısı ve peptonlar içerir. Bu yüksek tuz konsantrasyonu, enterokoklar dışındaki diğer mikroorganizmaların üremesini engeller ve seçici olarak stafilocoklar ürer. İzole edilen *S. aureus* kolonileri, çevresinde mannitolden asit oluşumunu gösteren sarı bir zon varlığı ile saptanabilir. Nadiren başka stafilocok türleri de mannitolden asit üretebilir. Bu sebeple bu besiyerinde üretilen mannitol pozitif organizmalar kanlı agar besiyerine pasajlanıp koagülaz üretimi açısından test edilmelidir (19).

*S. aureus*'un identifikasyonunu sağlayan moleküler yöntemlerin çoğu PZR bazlıdır. İlk testler identifikasyonu doğrulamak için amplifikasyon ürünlerini Southern blotlamasını gerektiriyordu (27). Fakat daha sonra, türe spesifik hedef bölgelerin amplifikasyonu için düzenlenmiş, protein genleri gibi hedef bölgeler içeren primer aralığı geliştirildi. Nükleaz (*nuc*), koagülaz (*coa*), protein A (*spA*) ve yüzey-ilişkili fibrinojen-bağlayan protein genleri gibi genler de *S. aureus*'un tanımlanmasında önemlidir. Ayrıca stafilocokal metisilin direncinin tespiti için *mecA* ve 16S rRNA gibi spesifik gen bölgelerini değerlendiren multipleks PZR yöntemi de mevcuttur (28-35). Ticari olarak bulunan real-time PZR ile başarı sağlanmıştır (35). Real-time PZR, ekipmanı olmayan rutin laboratuvarlarda PZR'ye alternatif sunmak için bir kolorimetrik mikrokuyucuk formatında, *coa* geninden mRNA transkripsiyonunun izotermal sinyal aracılı amplifikasyonu kullanan yeni moleküler bir yöntem de gösterilmiştir (27,36).

## **Epidemiyoloji**

Stafilocoklar her yerde bulunabilirler. İnsanların derilerinde koagülaz negatif stafilocoklar vardır ve nemli deri kıvrımlarının *S. aureus*'la geçici kolonizasyonu yaygındır. Yeni doğanda kesilmiş göbek kordonu, deri ve perineal bölgenin *S. aureus*'la kolonizasyona sık rastlanır. *S. aureus* ve CoNS'ler orofarinks, gastrointestinal sistem

(GİS) ve ürogenital sistemde de bulunurlar. Büyük çocuk ve erişkinlerde kısa süreli veya kalıcı *S. aureus* taşıyıcılığı, ön nazofarinkste orofarinksten daha yaygındır. Normal sağlıklı erişkinlerin yaklaşık %15'inde nazofaringial *S. aureus* taşıyıcılığı bulunmakla birlikte yatan hastalar, sağlık personeli, ekzematöz deri hastalığı olanlar ve sürekli ilaç kullananlarda daha yüksektir. Mukozal epitele bu mikroorganizmaların yapışması stafilokokal hücre yüzey adezinleri tarafından sağlanır (7).

Stafilokokların deri ve nazofarinkste bulunmalarından dolayı yayılması kolaydır ve birçok hastane kaynaklı infeksiyondan sorumludurlar. Stafilokoklar yüksek ısı, dezenfektanlar ve antiseptik solüsyonlara duyarlıdır ancak, kuru yüzeylerde uzun süre canlılıklarını sürdürebilirler. Bu mikroorganizmalar duyarlı kişilere direkt temas ve kontamine materyallerle transfer edilebilir (7).

Metisiline dirençli *S. aureus* infeksiyonları 1970'lerin sonlarına doğru öncelikle Avrupa'da daha sonra Amerika'da endemik olarak görülmeye başlanmıştır. Daha az sıklıkta olmakla birlikte, MRSA'lar yaşlı bakım evleri, kreşler ve kronik intravenöz ilaç kullanıcıları gibi toplum kaynaklı infeksiyonlarda da etken olabilmektedir. Nazokomiyal infeksiyonların yaklaşık 2/3'ü yoğun bakım birimlerinde görülmektedir. Metisiline dirençli stafilokokların kolonizasyon veya infeksiyon oluşturmada, uzun süreli hospitalizasyon, çeşitli antibiyotiklerle ve uzun süreli tedavi, metisiline dirençli stafilokoklarla kolonize veya infekte hastalarla aynı kapalı ortamda bulunma hastalara ait önemli risk faktörlerini oluşturmaktadır (37). Yanık birimlerindeki hastalarda bu risk oldukça yüksektir. Bu nedenle, nazokomiyal kökenli *S. aureus* infeksiyonlarının identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık paternlerinin erken ve doğru olarak tespiti son derece önemlidir (37). Son yıllarda, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de hastanede yatan hastalardan izole edilen *S. aureus* suşlarında metisilin direncinde ciddi artışlar saptanmaktadır (4).

### ***S. aureus*'un Yaptığı Hastalıklar**

*S. aureus* basit deri infeksiyonlarından, hayatı tehdit eden ciddi infeksiyonlara kadar çeşitli hastalıklara sebep olabilir. *S. aureus*'un sebep olduğu infeksiyonlar Tablo 2'de özetlenmiştir.

**Tablo 2.** *S. aureus*'un sebep olduğu infeksiyonlar (7).

<i>Hastalık</i>	<i>Klinik görünüm</i>
Haşlanmış deri sendromu	Eksfoliyatif toksin tarafından oluşturulur. Yenidoğanlarda yaygın epitelyum deskuamasyonu vardır. Deri döküntüleri lökosit ve mikroorganizma içermez.
Gıda zehirlenmesi	Isıya dayanıklı enterotoksin ile kontamine gıda tüketiminden kaynaklanır. Kusma isal ve karın ağrısıyla seyrederek. Semptomlar 24 saat içerisinde geçer.
Toksik şok sendromu	TSST-1 ile oluşur. Septik şoka benzer bir klinik tablodur.
İmpetigo	Derinin yüzeysel tabakalarında kabuklu püstüllerin oluşumuyla karakterizedir.
Folikülit	Kıl follikülünün yüzeysel infeksiyonudur.
Fronkül	Kıl follikülünün yoğun olduğu bölgelerde lokalize olan büyük, ağrılı, irinli deri nodülleridir.
Karbonkül	Fronküllerin subkutan dokuya yayılımı ile oluşan deri infeksiyonudur.
Bakteriyemi ve endokardit	Bakterinin infeksiyon odağından kana yayılımıyla oluşur. Endokardit kalbin endotel tabakasının hasarıyla karakterizedir.
Pnömoni ve ampiyem	Akciğerlerde konsolidasyon ve abse oluşumuyla karakterizedir.
Osteomyelit	Uzun kemiklerin metafizinde kemik harabiyetiyle seyreden infeksiyonudur.
Septik artrit	Eklem bölgesinde pürülan materyal toplanması sonucunda oluşan ağrılı ve eritemli eklem infeksiyonudur.
Yara infeksiyonu	Travmatik ya da cerrahi kesilerin infekte olmasıyla oluşur.

### **Antimikrobiyal Duyarlılık**

Bir antibiyotiğin antimikrobiyal aktivitesinin saptanması için uygulanan in vitro işlemlere, genel olarak duyarlılık testleri adı verilmektedir. Duyarlılık testleri klinik açıdan önemli, hızlı üreyen aerop ve fakültatif anaerop bakterilerin tedavisinde uygulanacak antibakteriyel ajana duyarlılığın öngörülemediği durumlarda yapılmalıdır.

Antimikrobiyal ilaçlara karşı duyarlılık testleri iki gruba ayrılır:

**I) Direnç fenotipinin belirlendiği yöntemler:** Direnç genlerinin ekspresyonu sonrası ortaya çıkan fenotipin duyarlılık düzeyini belirleyen yöntemlerdir.

#### **a ) İnhibitör aktivite testleri**

**1- Katı ve sıvı besiyerinde dilüsyon yöntemleri:** İn vitro duyarlılık testleri arasında “altın standart” olarak kabul edilen bu yöntemde, standart sayıda bir bakteri topluluğu (inokulum), iki katlı dilüsyonlar şeklinde değişen yoğunluklardaki



antimikrobiyal ajan ile karşılaştırılır. İnkübasyon süresi sonunda gözle görülür üremeyi engelleyen en düşük antimikrobiyal ilaç konsantrasyonu hesaplanır. Buna Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) denir. MİK değerinin duyarlılığı mı, direnci mi temsil ettiğini belirlemek için, bulunan konsantrasyon “duyarlılık sınırı” adı verilen bir değer ile karşılaştırılır. Bulunan MİK değeri, duyarlılık sınırından düşük ise mikroorganizma o ajana “duyarlı” olarak değerlendirilir. Genel olarak tedaviye başlanabilmesi için MİK değerinin serum düzeyinden 4-16 kez daha düşük bir değere sahip olması istenir. Dilüsyon temeline dayanan testler kantitatif sonuç verdiği için objektif bir değerlendirmeye olanak sağlar (16). Günümüzde otomatik olarak MİK değerlerini saptayabilen “Phoenix ve Vitek” gibi otomatize sistemler de kullanılmaktadır.

- 2- **Disk difüzyon yöntemi:** Mikroorganizmadan hazırlanan standart süspansiyonun yayıldığı agar plakların yüzeyine, belirli bir miktar antimikrobiyal ajan içeren diskler yerleştirilir. Sonuçta, diskteki antibiyotik agar içerisine yayılır ve etkili olduğu düzeylerde bakterinin üremesini engeller. Buna bağlı olarak, disk çevresinde bakterilerin üremediği dairesel bir inhibisyon zonu oluşur. Oluşan inhibisyon zon çapı ölçülerek her antibiyotik için farklı olabilen duyarlılık sınır değerleri ile karşılaştırılır. İnhibisyon zon çapının büyüklüğüne göre “duyarlı”, “orta duyarlı” veya “dirençli” şeklinde duyarlılık kategorisi belirlenir. Gerek dilüsyon yöntemleri gerekse disk difüzyon testi uluslararası standartlara göre ve kalite kontrolü yapılarak uygulanmalıdır (16).
- 3- **E testi:** Plastik stripler üzerinde bulunan ve yayılım temeline dayanan antimikrobiyal ajanın MİK değerinin saptanabildiği yöntemdir. Bu yöntemde, stripin bir yüzünde bulunan, ilaç konsantrasyonunun belirli ve sürekli değişimi olacak şekilde düzenlenmiştir. Diğer yüzünde de ise antimikrobiyal ajanın konsantrasyonlarına karşılık gelen değerleri sıralanmıştır. Standart bakteri inokulumu katı ve test için uygun besiyeri üzerine yayıldıktan sonra stripler yerleştirilir. İnkübasyon süresinin sonunda elips şeklindeki inhibisyon zonunun stripi kestiği konsantrasyon MİK değeri olarak belirlenir (16).
- 4- **Antimikrobiyal ajanları inaktive eden enzimlerin saptanması**
  - b) **Bakterisidal aktivite ile ilgili testler**

Bakterisidal testler özellikle tolerans saptanması veya endokardit, osteomyelit, septik artrit, ampiyem, bakteriyemi gibi durumlarda antibiyotik tedavisine cevabın incelenmesinde kullanılan testlerdir. Bu etkinlik üç yöntemle belirlenir:

- 1- Minimal bakterisidal konsantrasyon (MBK): bir mikroorganizmayı öldürmek için gereken en düşük ilaç konsantrasyonudur.
- 2- İlacın mikroorganizmayı zamana bağlı öldürme hızı
- 3- Mikroorganizmayı öldürmek için gerekli hasta serumunun bakterisidal konsantrasyonunun saptanması (16).

**II) Genotipik yöntemler:** Son yıllarda, birçok antibiyotik direnç geni tanımlanmıştır. Bu genlerin ekspresyonu sonucunda klinik tedavide kullanılan tüm antimikrobiyal ajanlara karşı direnç gelişebilmektedir. Günümüzde gen ekspresyonu sonucunda direnç gelişimini saptayan fenotipik yöntemler dışında, direnç genlerinin varlığını saptayan genotipik yöntemlerde geliştirilmiştir (16).

#### **Metisilin direncinin saptanması**

Metisiline dirençli stafilokok suşları metisilin klinik uygulamaya girmesinden kısa bir süre sonra tanımlanmıştır (38). Mikroorganizmanın, yapısal bir özellik nedeniyle, ilacın hedefi olan yapıyı taşınamaması veya ilacın hedefine ulaşamamasından kaynaklanan bu direnç şekli intrinsik direnç olarak adlandırılır (39).

*S. aureus*'ta metisilin direncinin hızlı tespiti, türün tanımlanması kadar önemli bir iştir. *mecA* geni, MRSA suşlarında bulunan düşük affiniteli penisilin bağlayıcı protein (PBP 2' veya PBP 2a) leri kodlayan yapısal gendir (40,41). MRSA suşlarında PBP2a'nın tespiti için siklik prop amplifikasyon tekniği kullanan ticari tespit metotları, floresan teknoloji ve lateks aglütinasyon yöntemleri geliştirilmiştir. Bu testlerin sonuçları geleneksel veya otomatize duyarlılık testlerinden daha hızlı ve doğru olarak alınabilmektedir (42-44).

PBP2a lateks aglütinasyon testinde, PBP2a'ya karşı monoklonal antikorlar ile kaplanmış lateks partikülleri, metisiline dirençli stafilokoklar ile özellikle reaksiyona girerek çıplak gözle gözlenebilen bir aglütinasyon oluşturur. PBP2a lateks aglütinasyon testi yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip ve dünya çapında yaygın olarak kullanılan bir testtir (69-71). PBP2a lateks aglütinasyon testi, *mecA* genine sahip olduğu halde genin protein ürünü olan PBP2a'yı üretemeyen suşlarda, metisilin direncini saptamada sadece *mecA* geninin saptanmasından daha doğru sonuç verme potansiyeline sahiptir. Ancak bu test aşırı beta-laktamaz (72) ya da PBP üreten suşları (39,52) saptayamaz. MRSA'nın tespiti için altın standart olan *mecA*'nın saptanmasına kıyasla *mecA*'nın ürünü olan PBP2a'nın lateks aglütinasyon testi ile belirlenmesinin zaman, işgücü, maliyet ve

rutinde kullanılabilirlik açısından son derece büyük avantajlara sahip olduğu görülmektedir ( ).

### **Beta-Laktam Antibiyotiklerin Etki Mekanizması**

Penisilinler ve sefalosporinler henüz bağlanmamış pentapeptit yan dalının ucundaki dipeptit rezidisünün (D-alanil-D-alanin grubu) yapısal analogu olduklarından, hücre duvarı sentezinde peptidoglikan zincirler arasındaki çapraz bağlanmayı sağlayan transpeptidaz enzimlerine kovalent bağla selektif bir şekilde bağlanıp enzimi irreversibl olarak inhibe ederler. Sonuçta peptidoglikanlardan murein oluşumu bozulur. Transpeptidaz, transglikozilaz ve karboksipeptidaz enzimleri serin proteaz ailesinden olup, periplazmik aralıkta bulunur ve penisilinleri yüksek afiniteyle bağlarlar (7). Transpeptidazların çeşitli türleri vardır; penisilinle birleşmek suretiyle inhibe edilen transpeptidazlara ve diğer bazı enzimlere (bazı karboksipeptidazlar gibi) penisilin bağlayan proteinler (PBP) adı verilir. Bunların çeşitli tipleri vardır. PBP1a ve 1b peptidoglikan zincirinin oluşmasını sağlayan transpeptidazlardır. PBP2 ve PBP3, bakteriyal hücre duvarının sırasıyla belirli bir şekle girmesini ve ara bölmelerinin oluşmasını sağlayan enzimlerdir. PBP'lerin inhibisyonu bakterilerde karakteristik morfolojik bozukluklara ve sonuçta onların lizisine sebep olur. Penisilinler genellikle PBP1 ve PBP3'e bağlanırlar (2).

Penisilinlere duyarlı bakterilerde otolizinler veya murein hidrolazlar denilen litik enzimler de bulunur. Penisilinler ve sefalosporinler doğal otolizin inhibitörlerini bloke etmek suretiyle otolizinlerin etkinliğini artırırlar. Bu olay, hücrenin lizise uğratılmasında rol oynar. Bazı *S. aureus* ve *S. pneumoniae* suşlarında otolizin bulunmadığı ve anılan antibiyotiklerin bu suşların üremesini durdurdukları fakat lizise neden olmadıkları saptanmıştır; bu suşlara penisiline toleran suşlar denir (2).

### **Stafilokoklarda Metisilin Direnç Mekanizmaları**

Beta-laktam antibiyotiklere direnç gelişimi genel olarak üç mekanizmayla gerçekleşir:

- 1- Antibiyotik ile hedef PBP arasındaki ilişkinin engellenmesi (sadece Gram negatiflerde görülür)
- 2- PBP'ye antibiyotiğin bağlanmasındaki modifikasyonlar
  - a) PBP'nin aşırı üretimi (nadir görülür).
  - b) Yeni bir PBP'nin kazanımı (örneği *S. aureus*'taki metisilin direncinde görülür)

c) Rekombinasyon yoluyla mevcut PBP'nin modifikasyonu (ör. *Streptococcus pneumoniae*'deki penisilin direnci) ya da nokta mutasyon (ör. *Enterococcus faecium*'daki penisilin direnci).

### 3- Antibiyotiklerin beta-laktamazlar tarafından hidrolizi (7).

MRSA suşlarının hemen hemen hepsi MSSA suşlarında bulunmayan, PBP2a olarak adlandırılan ek bir PBP üretirler. PBP2a, beta-laktam antibiyotikleri metisilinin önemli hedef bölgesi olan PBP2'den daha düşük bir afiniteyle bağlar (45,46). *S. aureus*'daki metisilin direnci, *mec* stafilokokal kaset kromozomu (SCC*mec*) olarak adlandırılan mobil bir element üzerine yerleşmiş durumdaki *mecA* geninin kazanılması sonucu elde edilir (39,47-49). MRSA'ların tanımlanmasında polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile *mecA* geninin varlığının gösterilmesi altın standarttır (39,42,50-52). *mecA* geni, *mecI* ve *mecRI* denilen iki düzenleyici gen ile birlikte SCC*mec* üzerinde *mec* kompleksini oluşturur. *mec* kompleksi *S. aureus*'daki metisilin direncinin belirlenmesinde anahtar element olarak kabul edilir. *mecRI* bir sinyal dönüştürücü gen, *mecI* ise baskılayıcı gen fonksiyonuyla *mecA* ekspresyonunu büyük ölçüde kontrol etmesine karşılık *mecA* ekspresyonunu başka genler de regüle edebilmektedir (48,53,54). Beta-laktam antibiyotiklerin yokluğunda *mecI* geni, *mecA* ve *mecRI-mecI*'nin transkripsiyonunu baskılar. Beta-laktam antibiyotiklerin varlığında *mecRI* otokatalitik olarak ayrılır, *mecRI*'nin stoplazmik parçasında yer alan metalloproteaz bölgesi aktive olur. Metalloproteaz *mecA*'nın operatör bölgesine bağlanan *mecI*'yi ayırır ve böylece *mecA*'nın transkripsiyonu gerçekleşir ve sonuçta PBP2a'nın üretimi sağlanır (55).

*mecI* ve *mecRI*, moleküler organizasyon, yapı, fonksiyon ve düzenleme mekanizmaları bakımından beta-laktamaz regülatör elemanları olan *blaI* ve *blaRI* ile benzerdir. *BlaI*, beta-laktamaz gen transkripsiyonunu baskılayan DNA'ya bağlı bir proteindir. *BlaRI*, beta-laktam antibiyotiklerin varlığında beta-laktamaz gen transkripsiyonuna neden olan bir sinyal dönüştürücü PBP'dir (39,56).

*S. aureus*'un bazı izolatları koagülaz ve diğer biyokimyasal testlerde kuşku sonuçlar verebilir. Bu durumda alternatif metotlarla tanının doğrulanmasına ihtiyaç vardır. Ayrıca oksasilin duyarlılık sonuçları kuşku olabilir ve bu örneklerin ileri moleküler testlerle doğrulanması gerekir. Hızlı moleküler testler, oksasilin duyarlılığının saptanması için, MRSA izolatlarının hızlı tespitini sağlayan bir *S. aureus*'a spesifik hedef bölgenin eş zamanlı tespitiyle kombine edilebilir (27).

*mecA* intrinsik metisilin direncinin esas belirleyici faktörüdür. Fakat yüksek düzeyli direnç fenotipinin gelişmesi için çevresel faktörlerin yanında ek genler de gereklidir (39,53,57-60). Bu genler *S. aureus* genomunun doğal bileşenleri olup, çoğunlukla hücre duvarı sentezi ve onun devamlılığına katkıda bulunurlar. Metisilin direnci için temel faktörlere (*femA-F*, *femR* ve *femX* genleri ya da mutantları) ek olarak *murF*, *fntA-C*, *sigB*, *hmrA* ve *hmrB*, *dlt*, *pbp2* ve *ctaA*, diğer adıyla yardımcı genler (*aux*) tanımlanmıştır (39,58). *lytH* gen ürünü gibi stafilokokal murein hidrolazlar peptidoglikan sentez ve döngüsünde litik enzim olarak rol oynarlar. Virulans faktörlerinin üretimini kontrol eden *sar* ve *agr* global regülatörleri tarafından kodlanan bazı faktörlerin metisilin direncindeki etkisi çok kısadır. Ancak, *llm* ve *aux16*'nın kodladığı protein gibi diğer gerekli gen veya gen ürünlerinin fonksiyonlarının tespiti zordur (53,57,61).

MRSA izolatlarının % 90'dan fazlası, kromozomları üzerinde *mecA* genini taşırlar. *mec* kompleksi içerisinde herhangi bir mutasyon bu genlerin fonksiyonunu etkileyerek metisilin direncinde değişikliklere yol açabilir. Rosato ve ark. (62) tarafından, *mecI* içerisindeki 202 numaralı nükleotid pozisyonunda aynı sitozin-timin mutasyonunu içeren farklı klinik MRSA suşlarının değişken miktarlarda *mecA* kopyaları ürettiği ve bu durumda, MRSA suşları içerisinde değişken reseptör aktivitesinin görülmesine sebep olduğu belirtilmiştir (48,55). Son zamanlarda, Katayama ve ark.(63) *mecA*'daki çoklu mutasyonların beta-laktamlara karşı yüksek düzeyli direnç oluşturduğunu göstermiştir.

*mecI* genellikle *mecA* ekspresyonunu baskı altında tutarken, bakterilerin beta-laktam ajanlara maruz kalmasıyla bu fonksiyon ortadan kalkar. Bununla birlikte, *mec* regülatörü bölgelerinde ortaya çıkan mutasyonlar ve sonuçta *mecI*'nin baskı fonksiyonunun kaybı nedeniyle yeni MRSA izolatlarının beta-laktamlara karşı yapısal olarak dirençli hale geldiği bilinmektedir. Bu mutasyonlar *mecI* ya da *mecA* promoter bölgelerindeki nükleotidlerin yer değiştirmelerinden veya *mecI*'daki nükleotid kayıplarından kaynaklanmaktadır (55,64).

MRSA'lar ek direnç determinantları biriktirme eğilimi gösterirler. Bu durum çoklu dirençli MRSA'ların oluşumuna sebep olup tedavi sorunlarının artmasına yol açmaktadır. sonuçta çoklu antibiyotik direnci gösteren MRSA'ların tedavisinde kullanılan en son antibiyotik olan vankomisin'in etkinliğini tehdit eden vankomisin dirençli MRSA'nın izolasyonu ile en tehlikeli noktaya doğru ilerlemektedir. Bu yüzden

antibakteriyel tedavide başarının devamı ve etkin direnç kontrolü için yeni hedeflerin belirlenmesine ihtiyaç vardır. (58).

MRSA'lar kromozom içerisindeki *mec* element olarak adlandırılan geniş bir yabancı DNA uzantısının ve 76 kD penisilin bağlayıcı protein olan PBP2a'yı kodlayan *mecA*'nın varlığı nedeniyle metisiline duyarlı *S. aureus* izolatlarından genetik açıdan farklılık göstermektedir. *mecA*'nın orjini henüz tam olarak belirlenememiştir. Metisiline dirençli stafilokokların *mecA*'sıyla %88 aminoasit benzerliğine sahip bir homolog *mecA* *Staphylococcus sciuri*'de tanımlanmıştır (65). İlginç olarak, bu *mecA* homologunun varlığına rağmen *S. sciuri*, fenotipik olarak metisiline duyarlıdır. Bu bilgiler, *mecA*'nın koagülaz negatif stafilokoklardaki *mecA*'dan, muhtemelen de *S. sciuri*'den orjinlenmesi hipotezini desteklemektedir (66). Tüm MRSA'ların *mecA* kazanmış az sayıdaki ata suşun klonal kalıntısı olabileceği düşünülmektedir (39). Bu türden gen kazanımıyla ilgili mekanizmanın tam olarak bilinmemesine rağmen, bir izolatın alınan *mec* elementi üzerinde bulunan *ccrA* ve *ccrB* adında iki genin *mec* elementini kesip çıkararak kromozom içerisine entegre edebilen rekombinaz proteinlerini kodladıkları görülmüştür. Çok sayıda MRSA izolatının incelenmesi sonucu *mecA* geni kazanımının bir kez meydana geldiği ve MRSA izolatlarının da tek bir klondan gelen türevler olduğu sonucuna varılmıştır. *mec* elementinin dizi ve bileşimi izolatlar arasında çeşitlilik göstermesine rağmen *mecA* geninin kendisi oldukça korunumludur. Diğer PBP'ler ile ortak olarak PBP2a, penisilin bağlayıcılık özelliğiyle ilişkili genel yapısal motiflere sahip olmakla birlikte beta-laktam antibiyotiklere afinitesi büyük ölçüde azalmıştır. Sonuç olarak diğer PBP'lerin transpeptidasyon faaliyetlerini inhibe eden metisilinin tedavi düzeylerinde PBP2a, peptidoglikan zincirlerinin çapraz bağlanmasını sağlayarak hücre duvarı sentezini devam ettirir. (55,58,67).

*S. aureus*, oksasilin minimum inhibitör konsantrasyonuna (MİK) göre iki alt gruba ayrılmıştır. Bu mikroorganizmaların, 4 mg/l'den daha yüksek oksasilin MİK'ine sahip olanları MRSA, 2 mg/l'den daha düşük oksasilin MİK'ine sahip olanlar MSSA olarak adlandırılmıştır (68). Ayrıca MRSA'ların tespiti için *mecA* geninin varlığının saptanması referans olarak kabul edilmektedir.

Metisilin direncinin ayırıcı bir özelliği, kullanılan beta-laktam antibiyotik ve kültür ortamlarına göre değişen, heterojen bir yapıya sahip olmasıdır. Heterojen suşlardaki hücrelerin çoğu, metisilinin 1-5 µg/ml gibi beta-laktam antibiyotiklerin düşük konsantrasyonlarına duyarlıdır. Hücrelerin sadece 10<sup>6</sup>'da 1'i gibi küçük bir kısmı 50 µg/ml ya da daha fazla metisilin konsantrasyonlarında üreyebilmektedir. Klinik

izolatların çoğu rutin üreme ortamlarında bu heterojen direnç paternini gösterirler. Heterojen suşlar NaCl veya sukroz eklenmiş hipertonic kültür besiyeri ya da 30 °C'de inkübasyonda homojen görülebilir. Ayrıca EDTA eklenmesi veya inkübasyon ısısının 37-43 °C'ye çıkarılması, heterojen dirence sebep olabilir veya direnci bütünüyle baskılayabilir. Farklı kültür ortamlarından kaynaklanan direnç ekspresyonundaki bu değişiklikler geçici ve tamamen fenotipiktir. Beta-laktam antibiyotiklerin varlığında heterojen suşların pasajlanması direnç fenotipini değiştirerek yüksek dirençli mutant kolonilerin oluşmasına yol açar. Bu klonlar, metisilin 50-100 µg/ml konsantrasyonlarında üreyebilen, yüksek dirençli hücrelerin homojen bir popülasyonunu üretir. Antibiyotiksiz ortamda bu suşların tekrarlanan pasajları yeniden heterojen paternin yerleşmesine neden olur (39).

Heterojen metisilin direncine sahip olan suşlarda *mecA* geni tüm hücrelerde taşındığı halde, *mecA* geni taşımayıp düşük düzeyli metisilin direnci gösteren suşlar da tanımlanmıştır. Bu suşların metisilin MİK değerleri, duyarlılık değerinin çok az bir miktar üzerindedir ve bu suşlar fenotipik yöntemlerle metisiline dirençli olarak tanımlanmaktadır. Bunlardan borderline-resistant *S. aureus* (BORSA) olarak adlandırılan suşlardaki düşük düzeyli direncin aşırı betalaktamaz üretiminden kaynaklandığı düşünülmektedir (45,72-75). Oksasilin MİK'i 1-16 µg/ml arasında olan bu suşlar geleneksel olarak pre-MRSA (76), dormant MRSA olarak da tanımlanmaktadır (73,77-79).

Düşük düzeyde dirence sahip olup *mecA* geni taşımayan bazı suşlarda ise betalaktamaz üretimi ya azdır ya da hiç yoktur. Fakat normal PBP'lere sahip olduğu halde bu proteinlerden PBP3'ün beta-laktam ajanları bağlama kapasitesindeki modifikasyonlar (modified PBP) sebebiyle bu suşlar, MODSA (metisilin intermediate *S. aureus*) suşları olarak adlandırılmışlardır (4,37,39,45,52,80,81). Bu şekildeki düşük düzeyli direnç klinik izolatlarda özellikle sefaleksim, sefradin veya sefaklor için rapor edilmiştir (81,82).

Genetik olarak BORSA ve MODSA suşları MRSA'lardan farklıdır, klinik ve epidemiyolojik önemleri henüz tam olarak bilinmemektedir. Ancak, BORSA ve MODSA suşlarıyla oluşan ağır infeksiyonlar beta-laktamaza dayanıklı penisilinler ve sefalosporinlerle tedavi edilebilmektedir (3).

CLSI kılavuzluğunda geliştirilen, 6 µg/ml oksasilin eklenmiş MRSA agar tarama besiyeri MRSA'yı etkili bir şekilde tanımlayabiliyorken, *mecA* genine sahip ancak düşük oksasilin MİK değerine sahip MRSA'ları muhtemelen kaçıyordu. İlk kez

Hososaka ve ark (73) “oksasiline duyarlı MRSA” (OS-MRSA) olarak yeni bir MRSA suşu tanımladılar. OS-MRSA’lar düşük düzeyli beta-laktam direnci gösterdiği için uygun dozdaki beta-laktam antibiyotikler ile tedavi edilebilirdi. Fakat bu antibiyotik seçeneğinin kullanılması yüksek beta-laktam dirençli MRSA’ların ortaya çıkmasına sebep olabilir. Bu yüzden OS-MRSA olayını değerlendirmek yüksek düzeyli metisilin direnci gelişmesini önlemek açısından çok önemlidir (73).

BORSA, MODSA ve OS-MRSA’nın fenotipik ve genotipik değerlendirmeleri Tablo 3’te verilmiştir.

**Tablo 3.** BORSA, MODSA VE OS-MRSA’nın özellikleri (4,45,76,80,81).

	<i>mecA</i>	Oksasilin	Sefoksitin	Oksasilin MİK	Beta-laktamaz
BORSA	-	dirençli	dirençli	1-16 mg/l	Aşırı
MODSA	-	dirençli	dirençli	?	Az yada hiç yok
OS-MRSA	+	duyarlı	duyarlı	<2	?

*MecA* genine bağlı olarak gelişen fenotipik metisilin direnci homojen veya heterojen direnç olarak ortaya çıkabilir (37). En sık görülen heterojen dirençtir. Heterojen dirençli suşlarda *mecA* geni tüm hücrelerce taşındığı halde hücre topluluğunun sadece  $10^3$  ile  $10^6$ ’sından birinde, yüksek düzeyde metisilin direnci görülür ve bu direnç ancak standart deney koşullarında saptanabilir (4). Heterojen dirençte oksasilin MİK’i 1-100 mg/l arasında değişir (28). Direncin heterojen ekspresyonundan *mecA* geni dışında farklı birçok bölgede bulunan *fem* ve *aux* gibi genetik lokuslar sorumlu tutulmaktadır (3,39). Metisiline intrinsik heterojen direnç gösteren safilokok suşları, beta laktam dışı antibiyotiklerde sıklıkla çoklu direnç göstermektedirler. Bu nedenle, çoklu direnç gösteren suşlarda metisilin direncinin daha dikkatli araştırılmasında yarar vardır (3).

Homojen direnç yüksek düzeyde dirence neden olur ancak daha az sıklıkla görülür (37). Homojen dirençte MRSA popülasyonundaki tüm hücreler *mecA* geni taşıyor olup, oksasilin MİK’i 100 mg/l’den daha yüksektir (28,83).

Bugüne kadar antistafilokokal penisilinaza dayanıklı penisilinlere direnç “metisilin direnci” olarak ifade edilmiştir. Bu nedenle MRSA kısaltması, metisilin artık testlerde veya tedavide tercih edilen ilaç olmamasına rağmen hala kullanılmaktadır (68). Son yıllarda MRSA’ların tespiti için daha stabil olması nedeniyle, asite dayanıklı antistafilokokal penisilinlerden oksasilin (68,84), sefalosporinlerden ise beta-laktamaza



fazlaca dayanıklı olan sefamisin türevi sefoksitin (85,86) yaygın olarak kullanılmaktadır. Sefoksitinin *mecA* regülatör sisteminin penisilinlerden daha potent bir uyarıcısı olduğu bilinmektedir (28,85). Birçok araştırmacı tarafından sefoksitin disk difüzyon testi sonuçlarının oksasilin disk difüzyon testi sonuçlarına göre *mecA*'nın varlığıyla daha uyumlu sonuçlar verdiği de rapor edilmiştir (28,49,85-88).

Sonuç olarak, metisilin direncinin saptanmasının maliyet etkin şekilde, doğru, kısa sürede ve rutin tekrarlanabilir nitelikte olmasına ihtiyaç vardır. Bu amaçla, çalışmamızda ülkemiz gerçeklerine uygun olarak; tüm sağlık kurumlarında uygulanabilir, doğru, hızlı ve ucuz yöntemi belirlemek hedeflenmiştir.

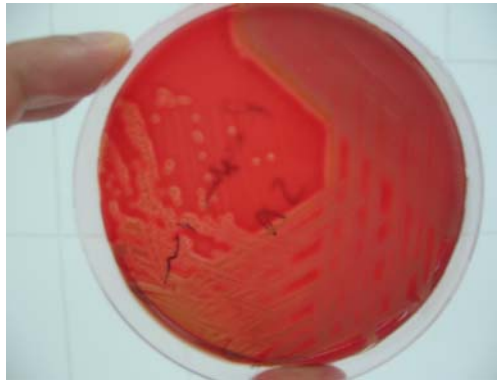
## MATERYAL VE METOD

### Çalışmaya alınan suşlar

Ocak 2005 - Eylül 2007 tarihleri arasında, Turgut Özal Tıp Merkezi'nde poliklinik ve yatan hastaların kan, yara, trakeal aspirat, idrar ve diğer aspiratlar gibi örneklerinden izole edilen, Skim Milk besiyerinde (Oxoid, Hampshire, England) -80 °C'de (Heraeus, Hansu, Germany) stoklanan toplam 214 *S. aureus* suşu çalışmaya dahil edildi.

### *S. aureus* suşlarının üretimi ve saklanması

Çalışmanın başlangıcında Skim Milk besiyerinde stoklanmış olan *S. aureus* suşları kanlı agara ekilip 35° C'de 24 saat inkübe edilerek yeniden saf kültür elde edildi (Resim 1). Koloni morfolojisi, Gram boyama, katalaz testi, mannitol fermentasyon testi ve koagülaz testleriyle, suşların *S. aureus* oldukları doğrulandı ve şüpheli suşlar çalışmadan çıkarıldı. *S. aureus* olduğu doğrulanan suşlar, Triptik Soy Agar besiyerine alınarak 24-48 saat inkübe edildi ve günlük kullanım için +4 °C'de saklandı.



**Resim 1:** Stafilokokların kanlı agar besiyerindeki görünümleri.

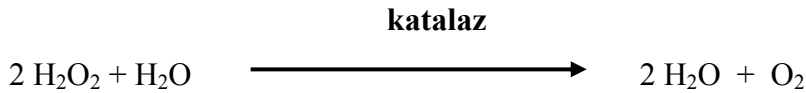
Kanlı agar besiyeri, Tablo 4'te içeriği verilen Triptik Soy Agar'ın (Himedia, Milano, Italy) 80 °C'de ısıtılarak eritilip 121 °C'de 15 dakika otoklavlanmasından (Trans, Ankara, Türkiye) sonra 50 °C'ye soğutulup içerisine %5-10 oranında defibrine koyun kanı katılmasıyla elde edildi.

**Tablo 4.** Triptik Soy Agar besiyerinin içeriği

<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>
Pancreatic digest of caseine	15 gr
Pancreatic digest of soybean meal	5 gr
NaCl	5 gr
Agar	15 gr
Distile su	1000 ml

#### **Katalaz testi**

Kanlı agar besiyerinde üretilen *S. aureus* kolonileri besiyeri yüzeyinden, besiyerine dokunulmaksızın eküvyon yardımıyla dikkatlice alınarak bir lam üzerine bırakıldı. Üzerine bir iki damla %3'lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) damlatılıp bir kürdan ile karıştırıldı. Aşağıdaki reaksiyonda da gösterildiği gibi katalaz enzimine sahip olan bakterilerin hidrojen peroksitten su ve oksijen oluşturması sonucunda gaz kabarcıkları gözlemlendi (19,24). Stafilokoklar katalaz pozitif reaksiyon vermeleriyle streptokoklardan ayırt edildi.



#### **Koagülaz testi**

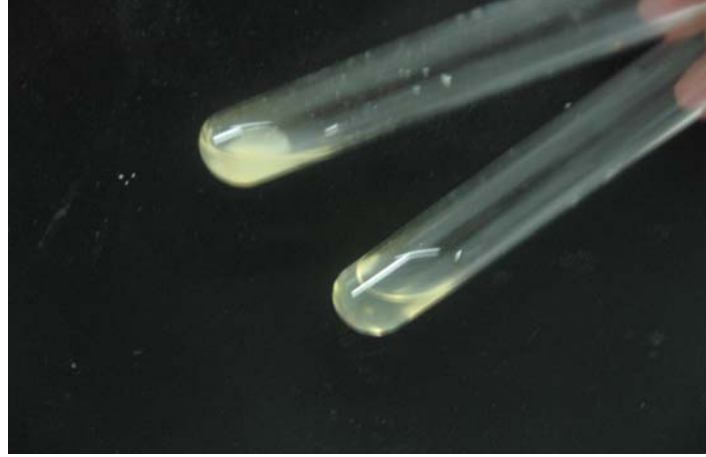
*S. aureus*'un diğer stafilokoklardan ayırt edilmesinde kullanılan en önemli testdir. Koagülaz deneyi tüp ve lam şeklinde iki temel yöntem ile yapılır. Bu çalışmada tüp koagülaz yöntemi kullanıldı. Bu yöntem uluslararası alt komite tarafından önerilen standartlar doğrultusunda aşağıdaki sıra takip edilerek yapıldı.

1- Bir deney tüpü içerisinde serum fizyolojik ile 1/5 oranında sulandırılmış plazma konuldu.

2- Kanlı agar besiyerinde 24 saatlik inkübasyon sonrasında üremiş bir koloni, öze ile alınıp plazma içerisinde ezilerek emülsifiye edildi.

3- Tüpler 35 °C’de inkübasyonda tutulurken 4’üncü saate kadar her yarım saatte bir pıhtı oluşup oluşmadığına bakıldı. Pıhtı oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirildi (Resim 2).

4- İlk 4 saat sonunda pıhtı oluşmayan tüpler bir gece oda ısısında bekletildikten sonra yeniden okundu. Bu süre içerisinde de koagülasyon vermeyen suşlar koagülaz negatif olarak kabul edildi (24).



**Resim 2:** Koagülaz testi görünümü. Üstte pozitif, alta negatif örnek görülmektedir.

### **Disk difüzyon yöntemi**

Bu yöntem rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında en çok kullanılan bir difüzyon yöntemi olan kuru disk yöntemidir. Yöntemin temeli, standart ve birçok bakterinin üreyebildiği Mueller-Hinton Agar besiyeri yüzeyine yayılarak yapılan ekim üzerine yine standart olarak hazırlanmış ve çeşitli antibiyotikler emdirilip kurutulmuş, kuru disklerin yerleştirilmesi ve 35 °C’de bir gecelik inkübasyondan sonra disk etrafında oluşan inhibisyon zonlarının ölçülmesiyle mikroorganizmaların antibiyotiklere duyarlılığının test edilmesine dayanır (24).

Bu çalışmamızda izole edilen *S. aureus* suşlarında metisilin direncinin incelenmesi için oksasilin ve sefoksitin duyarlılıkları kuru disk difüzyon yöntemi olan Kirby-Bauer yöntemi ile gerçekleştirildi. Bakteri süspansiyonu, CLSI önerileri doğrultusunda 24 saatlik bakteri kültüründen %0.9’luk NaCl içinde 0.5 McFarland ( $1 \times 10^8$  CFU/ml) bulanıklığına eşit olacak şekilde, direkt koloni süspansiyonu yöntemi ile hazırlandı ve 4 mm kalınlığındaki Mueller-Hinton agar besiyeri yüzeyine eküvyon yardımıyla yayıldı. Besiyeri yüzeyi kuruduktan sonra oksasilin (1µg) ve sefoksitin (30

$\mu\text{g}$ ) (Oxoid) diskleri yerleştirildi. Mueller-Hinton agar besiyerinde 35 °C’de 24 saatlik inkübasyondan sonra disklerin zon çapları ölçüldü.

Disk difüzyon testlerinin değerlendirilmesinde oksasilin için dirençli ve duyarlı zon çapları sırasıyla  $\leq 10$  mm ve  $\geq 13$  mm olarak kabul edilirken sefoksitin için ise inhibisyon zon çapları  $\leq 21$  mm ve  $\geq 22$  mm olarak kabul edildi (68). Kalite kontrol suşu olarak *S. aureus* ATCC 25923 kullanıldı.

### **Oksasilin Salt Agar tarama testi**

İçeriği Tablo 5’te verilen Mueller-Hinton agar (Himedia, Milano, Italy) besiyerine %4 NaCl ve 6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  oksasilin (SIGMA, O 1002) ilave edilerek hazırlandı. Kanlı agar besiyerinde üreyen 4-5 koloni, steril eküvyon yardımıyla alınarak %0.9 NaCl içinde 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlandı. Standart bakteri süspansiyonu içindeki eküvyon, tüpün kenarında bastırılarak çevrilip fazla sıvı atıldı. Steril eküvyonla plağın yüzeyine 10-15 mm çapında spot inokülasyon yapıldı. Kalite kontrol suşları olarak *S. aureus* ATCC 29213 (oksasiline duyarlı) ve ATCC 43300 (oksasiline dirençli) kullanıldı. Plaklar ters çevrilerek 35 °C’de inkübe edildi. Plaklar, bir gecelik inkübasyon sonrası incelendi ve herhangi bir üreme gözlenmediğinde, inkübasyon 24 saate tamamlandı. Besiyerinde bir koloniden fazla üreme görülmesi oksasiline dirençli olarak kabul edildi. Plakta tek koloni ürediğinde veya herhangi bir üreme gözlenmediğinde ise oksasiline duyarlı olarak yorumlandı. Üremenin varlığı, el lensi kullanılarak daha net olarak gözlendi (89).

**Tablo 5.** Muller-Hinton agar besiyerinin içeriği

<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>
Sığır et suyu	300 ml
Casein hydrolysate	17,5 gr
Nişasta	1,5 gr
Agar	10 gr
Distile su	1000 ml’ye tamamlanır

Yüksek ısı ve uygunsuz koşullar, oksasilin hızla bozulmasına sebep olacağından Oksasilin Salt Agar tarama besiyerinin 35°C’nin üstünde inkübasyona

birakılması, oksasiline dirençli *S. aureus*'un saptanmasını olumsuz yönde etkileyebilir (89). Bu nedenle inkübasyon ısısının 35° C'nin üzerine çıkmamasına dikkat edildi.

Ayrıca, başka mikroorganizmalar da oksasilin salt agar tarama besiyerinde üreyebildiği için saf kültür alınımına dikkat edildi.



**Resim 3:** Oksasilin agar tarama plağında görünüm. Üst kısım MRSA alt kısım MSSA.

#### **Lateks aglütinasyon testi**

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

PBP2a'ya karşı monoklonal antikolar ile kaplanmış lateks partikülleri, gözlenebilir bir aglütinasyon oluşması için PBP2a üreten stafilokoklar ile reaksiyona girecektir.

Testin uygulanmasında üretici firmanın talimatları takip edildi. Pozitif kontrol olarak MRSA suşu olduğu bilinen ATCC 43300 (Oxoid) ve negatif kontrol olarak MSSA suşu olduğu bilinen ATCC 25923 (Oxoid) kullanıldı.

#### **İnokulumun hazırlanması**

Primer izolasyon plağındaki birkaç koloni, kanlı agara inoküle edilerek 4 saha ekim yapıldı. Plaklar etüvde 35° C'de en az 24 saat (48 saati aşmayacak şekilde) inkübasyona bırakıldı.

#### **PBP2a ekstraksiyon prosedürü**

- Mikrosantrifüj tüpüne 4 damla reagent-1 (NaOH, %0.4 w/v) eklendi.
- Tüp içerisine 5 µl öze kullanılarak özenin iç çapını dolduracak kadar bakteri kolonisi ( $1.5 \cdot 10^8$  hücre) alınıp süspanse edildi.
- Tüpte kümelenme olduğunda karışım vortekslendi.
- Tüp kaynayan suya konulup 3 dakika beklendi.

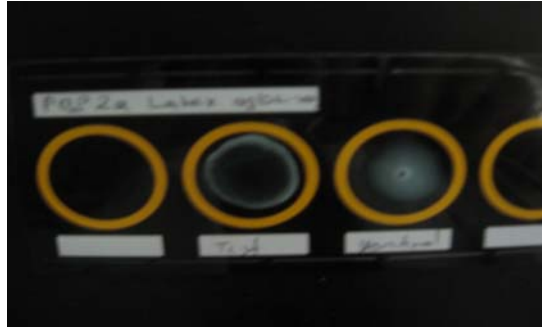
- Tüp oda ısısında soğumaya bırakıldı.
- Tüp içerisine ekstraksiyon reagent-2 den 1 damla eklenip karışım vortekslendi
- 1500 X g de 5 dakika santrifüj edildi.
- Test için bakteri süspansiyonunun süpernatant kısmı kullanıldı.

#### **Lateks aglütinasyon prosedürü**

- Hazır lateks kartları kontrol ve test reagenti ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , %20.4 w/v) ile test etmek için işaretlendi.
- Lateks reagentleri birkaç kez çevrilerek karıştırıldı.
- Her halkaya test lateksin veya kontrol lateksin 1 damlası eklendi.
- Halkalara 50 µl süpernatant konuldu.
- Süpernatant ve lateks reagentleri karıştırıldı ve 3 dakika içinde aglütinasyon oluşumunun gözlenmesi için ışık altında incelendi.
- Test bitiminde kartlar dezenfektan içine atıldı.

#### **Lateks aglütinasyon testinin okuma ve yorumlanması**

Aglütinasyon reaksiyonu 3 dakika içinde test lateksle görülüp, kontrol lateksle görülmediğinde PBP2a pozitif (MRSA), her iki lateks reagenti ile de aglütinasyon oluşmadığında PBP2a negatif (MSSA) olarak değerlendirildi (Resim 4). Ayrıca kontrol lateks reagenti ile aglütinasyon görüldüğünde test belirsiz olarak yorumlandı.



**Resim 4:** PBP2a lateks aglütinasyon testinin görünümü. İkinci daire test, üçüncü daire kontrol.

#### **Aglütinasyon reaksiyonunun şiddeti**

Hafif bulanık zeminde büyük ve küçük kümelenmeler ya da çok açık zeminde büyük kümelenmeler güçlü pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi.

Bulanık zeminde küçük fakat görülebilir kümelenmeler, zayıf pozitif reaksiyon ve kümelenmenin olmadığı homojen süspansiyon ise negatif reaksiyon olarak yorumlandı.

Belirsiz sonuçlar taze kültür alınarak yeniden test edildi.

### **BD Phoenix otomatize sistemle değerlendirme**

Phoenix sistemle değerlendirme, üretici firmanın (Becton Dickinson and Company, Sparks, Maryland, ABD) talimatları doğrultusunda yapıldı.

- İzole edilen örnekler Gram boyama ve katalaz testi yapılarak doğrulandı.
- Her bir örnek için Phoenix ID Broth tüpü etiketlendi.
- Kanlı agar besiyerinde 18-24 saatte üremiş aynı morfolojideki koloniler, aseptik olarak steril eküvyonlu çubuk ile alınarak Phoenix ID Broth içerisine aktarıldı.
- Tüp kapatılarak 5 saniye vortekslendi.
- Hava kabarcıklarının yüzeye çıkması için 10 saniye beklendi.
- Tüp, CrystalSpec nefelometreye yerleştirildi ve 0.5 McFarland bulanıklığa ayarlandı. Bakteri süspansiyonunun yoğunluğu düşükse izole edilen kolonilerden eklendi ve tekrar bulanıklık ölçüldü.

ID Broth içerisinde standart hale getirilmiş bakteri süspansiyonu, hazırlandıktan sonra 60 dakika içerisinde kullanıldı.

- Hastanın Phoenix AST Broth tüpü etiketlenip içerisine 1 damla AST indikatör solüsyonu eklendi ve alt-üst edilerek karıştırıldı.

AST indikatör solüsyonu ışıktan etkilendiğinden, solüsyona indikatör eklenmesinden sonraki iki saat içinde kullanıldı.

- Bir pipet yardımıyla 25 µl standardize bakteri süspansiyonu ID tüpünden AST Broth'una aktarıldı
- AST tüpü kapağı kapatılıp birkaç kez çevrilerek karıştırıldı. Hava kabarcıklarının yüzeye çıkması için birkaç saniye beklendi.
- ID Broth tüpünün tamamı panelin ID tarafındaki, AST Broth tüpü ise AST Broth tarafındaki doldurma yuvasına boşaltıldı ve panel kapağı sıkıca kapatıldı.
- Paneller inokülasyondan sonraki 30 dakika içerisinde cihaza yerleştirildi.
- Programın sonlanmasından sonra örneklere ait raporlar alındı.

### **Sonuçların değerlendirilmesi**

Program sonunda elde edilen raporlardan tür tanımlanması ve MİK değerleri elde edildi. Elde edilen oksasilin MİK değerlerinin  $\leq 0,5$  µg/ml olanlar MSSA ve  $> 2$  µg/ml olanlar MRSA olarak kabul edildi.



### **Mannitol salt agar**

İçeriği Tablo 6'da verilen mannitol salt agar besiyeri, stafilokokların karışık bakteri florası içeren materyallerden izole edilmesi için kullanılan ayırtıcı ve seçici bir besiyeridir. Birçok Gram negatif ve bazı Gram pozitif bakterilerin üremeleri, içerdiği tuz miktarı nedeniyle baskılanır. Ayrıca *S. aureus*, mannitolü fermante ederek besiyerinin içerdiği fenol kırmızısı ayırıcının rengini sarıya çevirir (24).

**Tablo 6.** Mannitol salt agar besiyerinin içeriği

<b>İçerik</b>	<b>Miktar</b>
Sığır eti ekstresi	1 gr
Pepton	10 gr
NaCl	75 gr
D-Mannitol	10 gr
Fenol kırmızısı	25 mg
Agar	15 gr
Distile su	1000 ml

Tablo 6'da verilen maddeler ısıtılarak eritildi ve besiyeri pH'sı 7,2'ye ayarlandı. Besiyeri, otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edildikten sonra plaklara dağıtıldı.

### **Ekim ve değerlendirme:**

Kanlı agar besiyerinde üreyen kolonilerden, steril eküvyonla tek koloni alınarak mannitol salt agar besiyerine çizgi ekimi yapıldı. 24 saatlik inkübasyon süresi sonunda ekim çizgisi boyunca üreyen stafilokok kolonileri çevresinde mannitolden asit oluşumunu gösteren sarı bir zon varlığında *S. aureus* olarak değerlendirildi. Çevresinde pembe zon oluşturan koloniler ise CoNS olarak kabul edildi (Resim 5).



**Resim 5:** *S. aureus* örneklerinin mannitol salt agarda CoNS ile karşılaştırmalı görünüşleri.

### **PZR ile *mecA* Saptanması**

#### **Ekstraksiyon (DNA eldesi)**

*S. aureus* izolatları Kanlı agar besiyerinde 24 saatte, 35 °C’de üretildi. Saf kültür halinde üreyen bakteri kolonileri yaklaşık 4 McFarland bulanıklığında olacak şekilde 1 ml steril distile su içerisinde süspansiyon edildi. Her bir örnek en az 30 saniye vorteksenerek homojen hale getirildi. Ependorf tüp içerisindeki örnekler -80 °C’de bir saat dondurulduktan sonra 10 dakika kaynatıldı. Tekrar vortekslendi ve sonrasında 3000 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant kısım PZR işlemi için kullanıldı.

Uyumsuz sonuçlar için slika membran yöntemi (Qiagen GmbH, Germany) ile ekstraksiyon tekrarlandı. Yöntemin başlıca basamakları;

- 1,5 ml’lik ependorf tüpüne 25 µl proteinaz K (20 µg/ml) ve 4 McFarland bulanıklığında hazırlanmış olan bakteri süspansiyonundan 200 µl eklendi.
- Bunların üzerine 200 µl “AL tamponu” eklendi ve 10-20 saniyeden az olmamak üzere iyice vorteksenerek, 56 °C’de 10 dakika bekletildi. İnkübasyondan sonra kısa bir santrifüj yapıldı.
- Sonra 200µl %96-100’luk etanol eklenerek vorteks ve ardından kısa süreli santrifüj yapıldı.
- Örneğin tamamı silika membran kolonuna (Qiagen GmbH, Germany) aktararak 6000X g’de bir dakika santrifüj edildi.
- Silika membran kolonu çıkarılarak atık tüpleri yenisi ile değiştirildi. Slika membran kolonun üzerine 500 µl “Buffer AW1” yıkama tamponu eklenerek 1 dakika 6000X g’de santrifüj edildi.

- Atık tüpü yenisi ile değiştirilerek kolon üzerine 500 µl “Buffer AW2” eklenerek 20000Xg’de üç dakika santrifüj edildi. Slika membran kolonu yeni bir tüpü takılarak boş bir şekilde 20000X g’de bir dakika santrifüj edilerek, kalan sıvının da kolondan atık tüpüne geçmesi sağlandı.
- Slika membran kolonu bu kez 1.5 ml’lik ependorf tüpüne yerleştirilerek üzerine 50 µl “AE tamponu” konularak bir dakika bekletildikten sonra 6000X g’de bir dakika santrifüj edildi.
- Slika membran kolonu atılarak, tüpte biriken sıvı DNA kaynağı olarak kullanıldı.

### **Amplifikasyon**

PZR ile *mecA* geninin çoğaltılması için standardize edilmiş yöntem (90) aşağıdaki gibi minimal modifikasyonlar yapılarak uygulandı.

**Tablo 7.** 2X amplifikasyon karışımının hazırlanması.

<b>Solüsyon</b>	<b>Miktar</b>
10X buffer	100 µl
25 mM MgCl <sub>2</sub>	200 µl
10 mM dNTP	200 µl
Distile su	500 µl
Toplam hacim	1000 µl

**Tablo 8.** 50 µl olan amplifikasyon karışımının hazırlanması

<b>Solüsyon</b>	<b>Miktar</b>
2X amplifikasyon karışımı	25 µl
Primer I (10 pmol/ µl)	1 µl
Primer II (10 pmol/ µl)	1 µl
Steril DNaz ve RNaz içermeyene su	17,7 µl
<i>Taq</i> DNA polimeraz (5 U/µl)	0,3 µl
Toplam hacim	45 µl

*mecA* primerleri

primer1 - 5’ - AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C- 3’

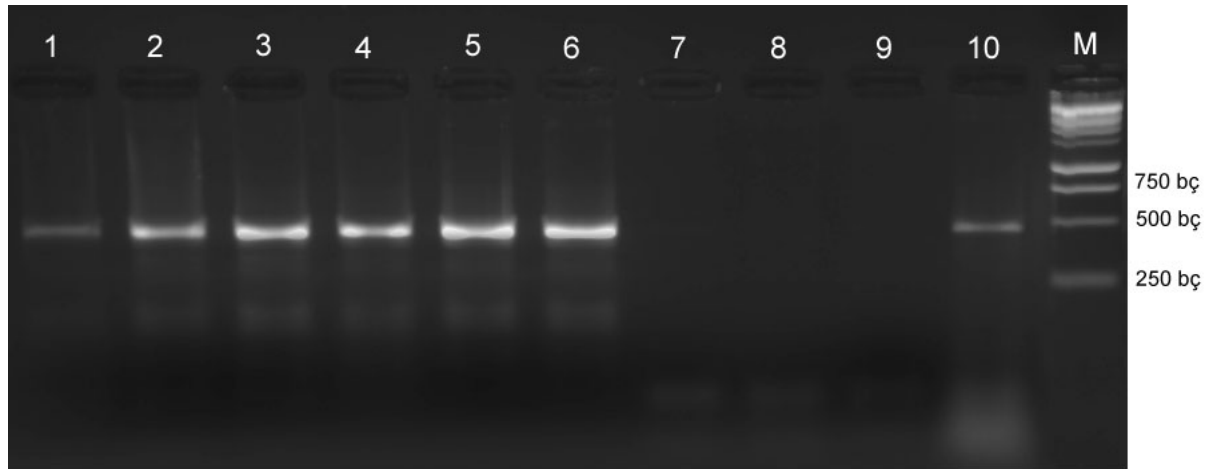
primer2 - 5’ - AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C- 3’

**Tablo 9.** Amplifikasyon programı

Evre	Sıcaklık	Süre	Siklus sayısı
Denaturasyon	94°C	4 dakika	1
Denaturasyon	94°C	45 saniye	
Bağlanma	50°C	45 saniye	30
Uzama	72°C	1 dakika	
Final uzama	72°C	2 dakika	1

### Sonuçların gözlenmesi

Oniki mikrolitre amplifikasyon ürününe 3/4 oranında brom fenol mavisi eklendikten sonra %2 agaroz jel içerisinde 1X TBE (Tris, Borik asit ve EDTA) tamponu ile bir saat 100 V akım olmak üzere elektroforez uygulandı. Elektroforezden sonra jel EtBr ile boyanarak UV transillimünatörde değerlendirildi. Elde edilen 448 bp'lik DNA fragmentleri *mecA* geni pozitif olarak değerlendirildi.



**Şekil 2.** Jel elektroforezde *mecA* sonuçlarının görünümü. 1-6 arası örnekler; *mecA* pozitif, 7-8. örnekler; *mecA* negatif, 9; negatif kontrol, 10; *mecA* pozitif kontrol (448 bç), M; 1 kb DNA Ladder (Promega)

### Verilerin değerlendirilmesi:

*S. aureus* suşları içerisinde MRSA ve MSSA görülme sıklığı, bunların bölümlere ve örnekler göre dağılımı yüzde oranı şeklinde belirtildi. MRSA tarama yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllükleri ile pozitif ve negatif yorumlama güçleri aşağıdaki formüllere göre yapıldı.

$$\text{Duyarlılık} = \frac{\text{mecA (+) örnekler içerisinde testin (+) saptadığı örnek sayısı}}{\text{Toplam mecA (+) örnek sayısı}} \times 100$$

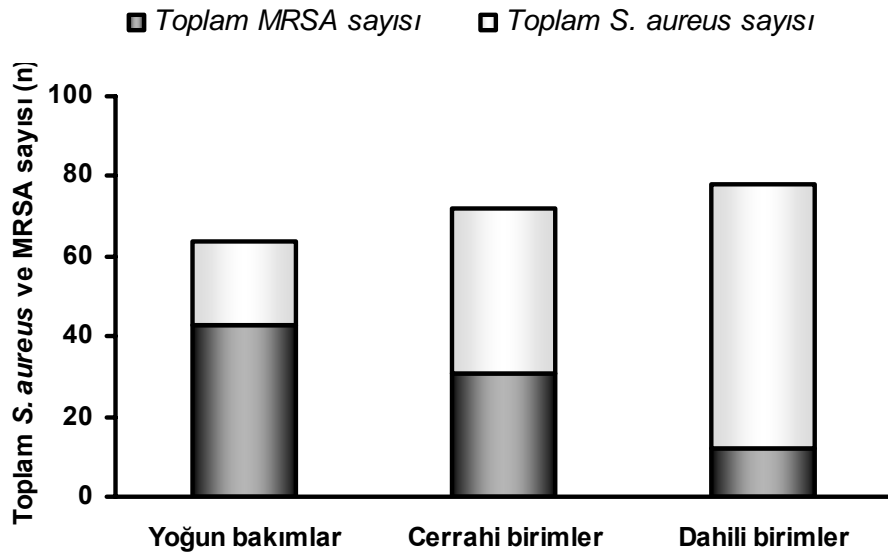
$$\text{Özgüllük} = \frac{\text{mecA (-) örnekler içerisinde testin (-) saptadığı örnek sayısı}}{\text{Toplam mecA (-) örnek sayısı}} \times 100$$

$$\text{Pozitif Yorumlama Gücü} = \frac{\text{mecA (+) örneklerde testin (+) saptadığı örnek sayısı}}{\text{Testin (+) saptadığı toplam örnek sayısı}} \times 100$$

$$\text{Negatif Yorumlama Gücü} = \frac{\text{mecA (-) örneklerde testin (-) saptadığı örnek sayısı}}{\text{Testin (-) saptadığı toplam örnek sayısı}} \times 100$$

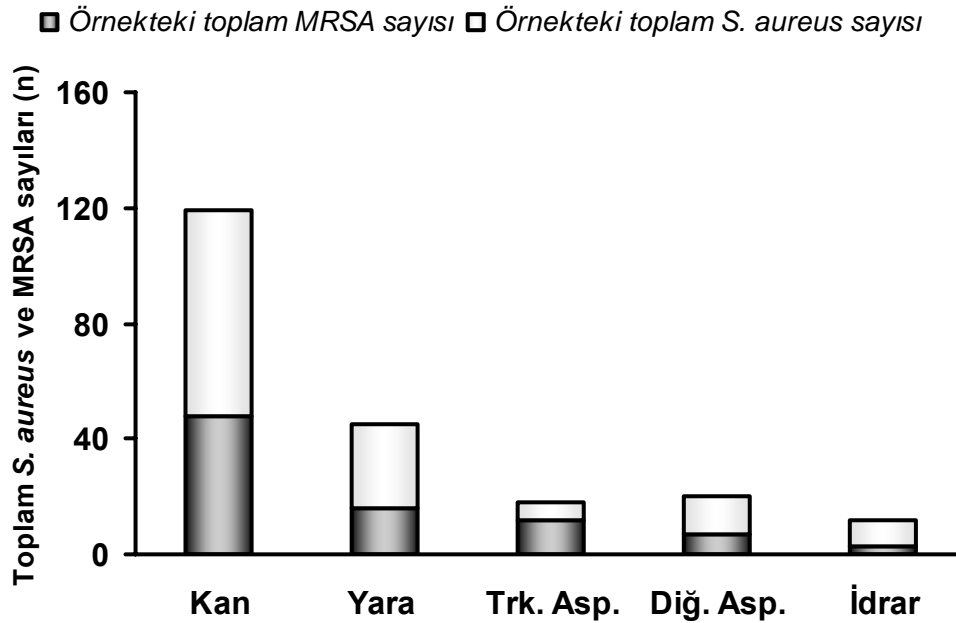
## BULGULAR

Çalışmaya alınan toplam 214 *S. aureus* suşunun 64 (%30)'ü yoğun bakım ünitelerinden, 72 (%34)'si cerrahi ve 78 (%36)'i dahili birimlerden gönderilen örneklerden izole edildi. *MecA* pozitifliği referans alındığında 214 *S. aureus* suşunun 86 (%40)'sı MRSA olarak saptandı. Toplam 86 MRSA'nın 43 (%67), 31 (%43) ve 12 (%15)'si sırasıyla yoğun bakımlar, cerrahi ve dahili birimlerden izole edilen suşlardı (Şekil 3).



Şekil 3. *S. aureus* ve MRSA örneklerinin yoğun bakımlar, cerrahi ve dahili birimlere göre dağılımı

Örneklere göre *S. aureus* ve MRSA dağılımı Şekil 4'tedir. Çalışılan örneklerden 119'u kan, 45'i yara, 18'i trakeal aspirat, 20'si diğer aspiratlar (periton, plevra, BOS vb.) ve 12'si idrar materyalinden oluşmaktaydı. En yüksek MRSA oranı %67 ile trakeal aspirat ve %40 ile kan örneklerinde saptandı.



**Şekil 4:** *S. aureus* ve MRSA'ların klinik örneklere göre dağılımı. Trk.Asp. (trakeal aspirat), Diğ. Asp. (periton, plevra, BOS gibi diğer aspiratlar).

En fazla örnek gönderilen yoğun bakım ünitelerindeki MRSA oranı; Dahili Yoğun Bakım %64, Reanimasyon Yoğun Bakım'da %75 ve Cerrahi Yoğun Bakımda %92 olarak saptandı. En fazla örnek gönderilen üç cerrahi birimdeki MRSA oranı; Genel Cerrahi'de %63, Ortopedi'de %43 ve Acil ünitesinde %20 olarak saptandı. En fazla örnek gönderilen üç dahili birimdeki MRSA oranı; Nefroloji'de %37 Hematoloji %13 ve Pediatri'de %4 olarak saptandı.

OS-MRSA olarak değerlendirilen dört suş dışında kalan toplam 210 *S. aureus* izolatında *mecA* varlığı referans alınarak yapılan klasik MRSA tarama yöntemlerinin sonuçları Tablo 10'da gösterilmiştir.

**Tablo 10.** Suşların *mecA* geni varlığına göre dağılımı ve kullanılan yöntemlerin MRSA, MSSA olarak belirledikleri suş sayıları

Yöntemler	<i>mecA</i> (+) (82)		<i>mecA</i> (-) (128)	
	MRSA	MSSA	MSSA	MRSA
Oksasilin disk difüzyon	78	4	122	6*
Sefoksitin disk difüzyon	79	3	126	2
Oksasilin agar tarama	78	4	126	2
PBP2a lateks aglütinasyon	79	3**	126	2
Phoenix	81	1	125	3

\* : *mecA* negatif olup oksasilin disk difüzyonuyla MRSA olarak değerlendirilen suşların oksasilin disk difüzyon çapları 11-12 mm arasındaydı ve tekrarlanan ölçümde zon çaplarında değişiklik olmadı.

\*\* : *mecA* (+) olupta lateks aglütinasyon testiyle MSSA olarak saptanan 3 suş

MRSA tespitindeki en yüksek duyarlılık % 98,7 ile Phoenix sisteminde saptanmış olup, bunu %96,3 ile Lateks aglütinasyon ve sefoksitin disk difüzyon, %95,1 ile oksasilin disk difüzyon ve oksasilin agar tarama yöntemleri izlemiştir. En yüksek özgüllük değeri sırasıyla; %98,4 ile sefoksitin disk difüzyon, oksasilin agar tarama ve lateks aglütinasyon yöntemleri, %97,6 ile Phoenix sisteminde gözlenmiştir. En düşük özgüllük ise %95,3 ile oksasilin disk difüzyon yönteminde saptanmıştır.

Pozitif yorumlama gücü; %97,5 ile sefoksitin disk difüzyon, oksasilin agar tarama ve lateks aglütinasyon, %96,4 ile Phoenix sistemi, %92,8 ile oksasilin disk difüzyon yöntemi şeklinde sıralanmıştır. En yüksek negatif yorumlama gücü ise %99,2 ile Phoenix sisteminde saptanırken, bunu %97,6 ile lateks aglütinasyon, sefoksitin disk difüzyon yöntemleri izlemiştir. En düşük negatif yorumlama gücü ise %96,8 ile oksasilin disk difüzyon yönteminde bulunmuştur (Tablo 11).



**Tablo 11.** *mecA* geni varlığına göre yöntemlerin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif yorumlama gücü değerleri

Yöntemler	Duyarlılık	Özgüllük	Pozitif yorumlama gücü	Negatif yorumlama gücü
Oksasilin disk difüzyon	95,1	95,3	92,8	96,8
Sefoksitin disk difüzyon	96,3	98,4	97,5	97,6
Oksasilin agar tarama	95,1	98,4	97,5	96,9
PBP2a lateks aglütinasyon	96,3	98,4	97,5	97,6
Phoenix	98,7	97,6	96,4	99,2

*mecA* (+) olduğu halde oksasilin MİK'i < 2 olduğundan OS-MRSA olarak değerlendirilen 4 (%5) MRSA suşunun özellikleri Tablo 12'de özetlenmiştir. Tüm suşlar oksasilin ve sefoksitin duyarlı olup, oksasilin salt agarda ürememiştir. PBP2a lateks aglütinasyonu ile bir suş pozitif sonuç verirken diğer üç suş negatif bulunmuştur.

**Tablo 12.** Fenotipik ve genotipik incelemelerde OS-MRSA olarak tespit edilen suşlar

Suş No:	O MİK	<i>mecA</i>	Lateks	OSA	ODD	SDD	Örnek	Bölüm
15	<2S	+	+	S	S	S	Kan	CYB
57	<2 S	+	-	S	S	S	Kan	Nefroloji
130	<2 S	+	-	S	S	S	Yara	Hematoloji
184	<2 S	+	-	S	S	S	Kan	Nefroloji

O MİK (Oksasilin-Minimum İnhibitör Konsantrasyonu), OSA (Oksasilin Salt Agar), ODD (Oksasilin Disk Difüzyon), SDD (Sefoksitin Disk Difüzyon), CYB (Cerrahi Yoğun Bakım), S (Duyarlı).

Lateks aglütinasyon sonuçları negatif olduğu halde *mecA* pozitif olup MSSA olarak değerlendirilen üç örneğe ait veriler Tablo 13'te gösterilmiştir.

**Tablo 13.** *mecA* genine sahip olduğu halde fenotipik yöntemlerle duyarlı bulunan *S.aureus* suşları

Suş No:	O MİK	<i>mecA</i>	Lateks	OSA	ODD	SDD	Örnek	Bölüm
34	>2	+	-	S	S	S	Kan	RYB
109	>2	+	-	S	S	S	Yara	Ortopedi
208	>2	+	-	S	S	S	Kan	GC

O MİK (Oksasilin-Minimum İnhibitör Konsantrasyonu), OSA (Oksasilin Salt Agar), ODD (Oksasilin Disk Difüzyon), SDD (Sefoksitin Disk Difüzyon), RYB (Reanimasyon Yoğun Bakım), GC (Genel Cerrahi), S (duyarlı).

## TARTIŞMA

*Staphylococcus aureus* toplum ve hastane kaynaklı infeksiyonların en önemli etkenlerinden olup, lokal ve sistemik birçok hastalıklara sebep olabilir. Tedavi edilmediği takdirde, bu mikroorganizma çeşitli organlara kan yoluyla yayılarak endokardit, osteomyelit ve septik artrit gibi ciddi klinik tablolara yol açar (91,92). Özellikle MRSA'lar on yılı aşkın bir süredir pandemilere sebep olarak, ciddi stafilokok infeksiyonlarındaki artışın en önemli kaynağını oluşturmaktadır (93). Günümüzde, MRSA suşları tedavi seçeneklerinin kısıtlılığı, tedavide kullanılan antibiyotikler ve infeksiyon kontrol önlemlerinin maliyeti nedeniyle tüm dünyada ciddi bir sağlık sorunu haline gelmiştir (3,4).

Başta MRSA olmak üzere, çoğul antimikrobiyal dirençli stafilokok infeksiyonlarının morbidite ve mortalitesinin yüksek olması, yüksek tedavi maliyetini de beraberinde getirmesi, bu infeksiyonların prevalansının hemen her ülkede izlenmesine sebep olmuştur. Sanayileşmiş ülkeler başta olmak üzere birçok ülke konuya ilişkin çok merkezli çalışma programları düzenlemiş ve MRSA yayılımını önlemek için kendi ulusal rehberlerini oluşturmuşlardır (94).

MRSA'ya rastlanma oranı hastanede yatan hastalarda, toplumdaki hastalara oranla daha yüksektir (4,95,96). Özellikle invaziv işlemler başta olmak üzere, uzun süreli hospitalizasyon, ileri yaş, altta yatan ciddi hastalıklar ve önceden antimikrobiyal ajan kullanımı, bu mikroorganizmalara bağlı gelişen infeksiyonlar açısından en önemli risk faktörleridir. Risk faktörleri arasında özellikle yoğun bakım üniteleri, cerrahi birimler, diyaliz üniteleri ve AIDS hastalarının tedavi edildiği üniteler yer almaktadır (4,7).

Amerika Birleşik Devletleri'nde, MRSA epidemiyolojisindeki değişiklikler National Nosocomial Infections Surveillance System tarafından sürekli olarak takip edilmektedir. Amerikan hastaneleri yoğun bakım ünitelerindeki 1992-2003 yılları arasında infeksiyonların tarandığı bir çalışmada, *S. aureus* izolatlarının %64'ünün MRSA ve yıllık artışın %3,1 olduğunu ortaya çıkarmıştır (97). Orrett ve ark.'ları (91) Trinidad bölgesinde, 1999-2004 yılları arasında 2430 *S. aureus* izolatu arasında MRSA oranını dünya çapında daha önce yapılmış birçok surveilans çalışmasına benzer olarak %18.6 olarak tespit etmişlerdir. Oysa aynı bölgedeki oran daha önceki yayınlarda %9.8 olarak bildirilmiştir. Ülkeler ve bölgeler arasında ciddi farklılıklar bulunabilmektedir. *S. aureus*'lar arasında MRSA oranının en yüksek görüldüğü bölge, batı Pasifik bölgesi olarak bildirilmektedir (98). Bu oran Kore'de %64 (99), Tayvan'daki bir hastanede direnç oranı yaklaşık %77 olarak bulunmuştur (100). Kuzey Amerika'da %38-50 (101,102), Orta Doğu'da %33-40, Hindistan'da %18-43 ve Kanarya Adaları'nda %25 olarak rapor edilmiştir. Jamaika ve Küba'daki oran %10'un altındadır (91). Bu oran Güney Amerika'da %10-66 (103), Avrupa'da %25-58 (104,105) olarak bildirilmiştir. Ülkelere ve bölgelere göre değişen MRSA oranındaki bu farklılık hasta popülasyonuna, *S. aureus* suşlarının biyolojik özelliklerine ve infeksiyon kontrol önlemlerindeki çeşitliliğe bağlı olabilir.

Avrupa'da; The European Antimicrobial Resistance Surveillance System rutin olarak *S. aureus*'a ait antimikrobiyal duyarlılık verilerini toplamaktadır. İngiltere, İrlanda, İtalya, Bulgaristan, Yunanistan ve Malta'da 1999-2002 yılları arasında bakteriyemiye neden olan *S. aureus* vakalarının %30'dan fazlasını MRSA'ların oluşturduğu bilinmektedir (106).

Türkiye'de 1996-1999 yılları arasında yapılan çalışmada bildirilen metisiline direnç oranlarının ortalaması %47.5 olarak hesaplanmış, 2000-2003 yılları arasındaki çalışmalara ait sonuçlarının ortalaması bu orana çok yakın (%46.6) bulunmuştur (107). Bu oranlar ülkemizde *S. aureus* suşlarındaki metisiline direnç oranının 1996'dan itibaren yedi yıllık periyotta benzer olduğunu ve önemli bir değişime uğramadığını göstermektedir. Ancak 2003-2004 yıllarında, hastanede yatan hastalardan izole edilen *S. aureus* suşlarında metisilin direncinin %52'ye yükseldiği saptanmıştır (107). Bu oran Stefani ve Varaldo (108) tarafından bildirilen ve diğer Avrupa ülkelerine ait olan direnç oranlarından (%0.8-50.5) daha yüksektir. Ülkemizdeki MRSA prevalansının (%52) birçok Avrupa ülkesi ile karşılaştırılamayacak kadar yüksek olduğu ve ne yazık ki bu

yüksek prevalans, birçok hastanemizde MRSA infeksiyonlarının artık endemik duruma geldiği düşüncesini desteklemektedir.

Vardar-Ünlü ve ark.'ları (109) 2004-2005 yılları arasında, bir üniversite hastanesinde çeşitli klinik örneklerden izole edilen 183 *S. aureus* suşu içerisinde 98 (%53,6)'ini MRSA olarak rapor etmişlerdir. Sipahi ve ark.'nın (110) 2001-2005 yılları arasında, hastane kaynaklı *S. aureus* infeksiyonu olarak tanımlanan 825 suşun yıllara göre direnç oranlarının incelendiği bir çalışmada, metisilin direncinin en yüksek düzeye % 76.7 ile 2003 yılında ulaştığı, 2004'ten itibaren düşüşün başladığı ve 2005 yılında bu direncin % 55.3'e düştüğü rapor edilmiştir.

Ülkemizde son yıllarda yapılan çalışmalarda da MRSA oranları oldukça farklı sonuçlar içermektedir. Bozca ve ark.'larının (111) 2005-2006 yılları arasında çeşitli hasta örneklerinden elde edilen 720 *S. aureus* izolatının %34'ünü MRSA olarak saptamışlardır. Güner ve Gürler'in (112) 2001-2006 yılları arasında cerrahat ve yara örneklerinden izole edilen toplam 1373 *S. aureus* suşunun %29'unu MRSA olarak saptamışlardır. Ayrıca MRSA sıklığını 2001'den 2006'ya doğru sırasıyla %35, %39, %34, %18, %23 ve %20 olarak bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda, poliklinik ve yatan hastalardan izole edilen toplam 214 *S. aureus* suşundan 86 (%40)'sı MRSA olarak saptandı. Bu oran predispozan faktörlerin daha fazla olduğu yoğun bakım ünitelerinde %67, cerrahi birimlerde %43 olarak bulunmuşken; risk faktörlerinin daha az olduğu dahili birimlerde %15 olarak tespit edilmiştir. Bu oranlar Türkiye genelindeki *S. aureus* infeksiyonlarının MRSA oranlarıyla örtüşmektedir. Çalışmamızdaki MRSA görülme oranı, yoğun bakımlar ve cerrahi birimlerde yüksek iken; toplum kökenli olma ihtimali daha yüksek olan dahili birimlerde düşüktür.

Nazokomiyal infeksiyonların önemli bir etkeni olan MRSA'lar önce Avrupa'da sonra Amerika'da endemik olmaya başlamıştır. Son yıllarda, toplum kaynaklı MRSA infeksiyonlarında da bir artış göze çarpmaktadır. Ülkemizde ise gerek hastane kökenli gerekse toplum kökenli MRSA infeksiyonları artık endemik kabul edilebilir düzeylere ulaşmıştır. Türkiye'deki bu artışta, hasta odalarının koşulları, kateter gibi gereçlerin kullanımı, nazal kolonizasyon, kronik ilaç kullanımı, hastanede uzun süreli yatış, toplu yaşam yerleri ve yaş gibi klasik predispozan sebeplerin yanı sıra; ülkedeki antibiyotik kullanım politikaları, reçetesiz antibiyotik satışı, kolonize insanlarla sık temas, ampirik tedavi oranının yüksekliği, yetersiz veya yanlış tedaviler, infeksiyon kontrol talimatlarına yetersiz uyum gibi toplumumuza ait bazı faktörler rol oynuyor olabilir.

Nazokomiyal MRSA infeksiyonlarının yaklaşık üçte ikisi yoğun bakım ünitelerinde görülmektedir. MRSA infeksiyonlarındaki mortalite oranı % 20-84 arasında değişmektedir (37). Bu mikroorganizmalarla oluşan infeksiyonların morbidite ve mortalitesindeki bu ciddiyet nedeniyle etkin bir tedavi için doğru ve hızlı tanı son derece önemlidir.

*S. aureus* izolatlarındaki metisilin direncinin hızlı ve doğru tespiti, uygun antimikrobiyal tedaviye başlamak için çok önemlidir. Metisilin direncinin saptanmasında yalancı negatif sonuçlar tedavide yetersizliğe ve MRSA suşlarının yayılmasına neden olurken; yanlış pozitif sonuçlar glikopeptid antibiyotiklerin aşırı kullanımı ve gereksiz izolasyon tedbirleri nedeniyle, bu infeksiyonların tedavisinin aşırı maliyetle sonuçlanmasına yol açmaktadır (42,113). Enterokoklar yanında *S. aureus* suşlarında da vankomisin direnci hakkında artan raporlar, geriye kalan tek seçenek olarak görülen glikopeptid antibiyotiklerin kullanımını da sorunlu hale getirmektedir. Bakteriyel üreme görülür görülmez metisilin direncinin tespitiyle uğraşmak, duyarlı izolatlarda glikopeptid sınıfı antibiyotiklerin gereksiz kullanımını sınırlamanın tek yoludur (114). Metisilin direncinin tespiti için rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında oksasilin disk difüzyon, sefoksitin disk difüzyon, oksasilin agar tarama, PBP2a lateks aglütinasyon, otomatize sistemler ve referans yöntem olarak *mecA* geninin PZR ile saptanması kullanılmaktadır.

İlk kez 1962 yılında, penisilinaza dayanıklı metisilinin kullanıma girmesinden iki yıl sonra metisiline dirençli *S. aureus* suşları saptanmıştır. İlk zamanlarda, bu dirençli suşların tespitinde her ne kadar metisilin kullanıldıysa da takip eden yıllarda, saklama sırasında parçalanmaya daha dirençli olması nedeniyle yerini oksasiline bırakmıştır. Ancak bu direnç, ilk olarak metisiline karşı saptanmış olması nedeniyle isimlendirmede değişiklik yapılmaksızın “metisilin direnci” olarak devam etmiştir. Son yıllarda ilave bazı avantajları nedeniyle oksasilin yerine sefoksitin diskinin kullanımının daha avantajlı olacağı belirtilmektedir (68).

Günümüzde MRSA izolatlarının saptanmasında sıklıkla kullanılan oksasilin disk difüzyon testi, bazı faktörlere bağlı olarak heterorezistan bakterilerin saptanmasında yanlış sonuçların ortaya çıkmasına sebep olabilmektedir. Yaygın olarak kabul edilen görüşe göre; 35 °C ve daha düşük ısıda inkübasyon, inokulumun artırılması, inkübasyon süresinin 18 saatten 24 saate uzatılması ve besiyerine %2-4 oranında NaCl ilavesi oksasilin disk difüzyon testinin bu suşları saptamadaki başarısını artırabilir (49,115).

Yapılan bir çalışmada, 37 °C’de, 5 µg oksasilin diskiyle yapılan disk difüzyon yönteminde duyarlılık, yüksek dansiteli inokulum kullanıldığında %95.2 iken düşük dansiteli inokulum kullanıldığında %41 olarak tespit edilmiştir. İnkübasyon ısısı 30 °C’a düşürüldüğünde, düşük dansiteli inokulum kullanılmasıyla oksasilin disk difüzyon testinin duyarlılığı %31.3 olarak saptanmış, aynı çalışmada, 37 °C’de, 1 µg oksasilin diskiyle yapılan disk difüzyon testinde duyarlılık, yüksek dansiteli inokulum kullanımıyla %96.4 olarak tespit edilmiştir. Tüm bu sonuçlar, *S. aureus*’larda oksasilin duyarlılığının inkübasyon sıcaklığı ve inokulum yoğunluğundan etkilendiğini göstermektedir (49).

Boubaker ve ark.(86)’ları, 115’i *mecA* pozitif ve 350’si *mecA* negatif toplam 465 *S. aureus* izolatını iki farklı ortam içeren oksasilin disk difüzyon ve sefoksitin disk difüzyon metoduyla test etmişlerdir. Çalışmada kullanılan iki farklı oksasilin disk difüzyon metodunun birinde Mueller-Hinton agar 30 °C’de inkübe edilirken, diğesinde besiyerine %4 NaCl eklenerek 37 °C’de inkübe edilmiş. Her iki ortamda da 11 izolat MSSA olarak yanlış tanımlanmış olup (%90.4 duyarlılık). Yine her ikisinde de 3 izolat MRSA olarak yanlış tanımlanmış olup (%99,1 özgüllük), iki farklı ortam için de kullanılan oksasilin disk difüzyon testinin duyarlılık ve özgüllüğü, sefoksitin disk difüzyon testinden daha düşük bulunmuştur.

Cauwelier ve ark. (28)’nin yaptığı çalışmada, oksasilin disk difüzyon ve oksasilin agar tarama testinin duyarlılığı sırasıyla %83,5 ve %91,7 iken, her iki testin özgüllüğünü %100 olarak saptamıştır. Cavassini ve ark.(42)’lerinin yaptığı çalışmada ise oksasilin disk difüzyonunun duyarlılığı %61,3 ve oksasilin agar tarama testinin duyarlılığı ise %82,5 olarak ve oldukça düşük rapor edilmiştir.

Daha önce yapılan çalışmalarla benzer şekilde, bizim çalışmamızda da metisilin direncini saptamak amacıyla kullandığımız oksasilin disk difüzyon ve oksasilin agar tarama yöntemlerinin duyarlılığı %95.1 olarak, özgüllüğü ise sırası ile %95.3 ve %98.4 olarak saptanmıştır.

Oksasilin disk difüzyon metodunun düşük duyarlılığı, (her ne kadar günümüzde CLSI tarafından önerilmese de) stafilokokların üremesini destekleyen tuz ilavesinin olmayışından kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca *mecA* pozitif *S. aureus* popülasyonundaki heterojen direncin yüksek prevalansı, oksasilin disk difüzyon metodunun düşük duyarlılığında etken olabilir. Bu heterojen *mecA* pozitif *S. aureus* popülasyonundaki koloniler, oksasilin disk difüzyon metodu kullanıldığında kolaylıkla kaçırılmaktadır. Heterojen MRSA popülasyonunun saptanmasında oksasilin agar tarama metodunun

düşük duyarlılığı, PBP2a ekspresyonundaki değişkenliğe de bağlanabilir. Aşırı PBP2a üreten bakteri hücrelerinin sadece küçük bir subpopülasyonu oksasilin agar tarama yöntemi ile saptanabilmektedir. Oksasilin agar tarama metodunun, heterojen MRSA popülasyonunu saptamada duyarlılığının düşük olması daha önceki çalışmaları destekler niteliktedir (42,49). Oksasilin salt agar tarama testi kolay, ucuz ve güvenilir olması nedeniyle diğer yöntemlerin doğruluğunu değerlendirmede de kullanılır. İntrinsik oksasilin dirençli *S. aureus* suşlarını saptayabildiği halde genellikle BORSA suşlarını saptayamamaktadır. İntrinsik olarak oksasiline-dirençli *S. aureus* izolatları *mecA* genine ve yüksek oksasilin MİK (>16 µg/ml)'ine sahiptir, genellikle antimikrobiyal ajanlara çoklu direnç gösterir. Fakat çoklu dirence sahip olmayan MRSA izolatları da hastalardan izole edilebilmektedir. Çoklu antibiyotik direncine sahip olmayan BORSA suşları, nadiren oksasilin salt agar tarama besiyerinde üreyebilir. Bu izolatların klinik önemi bilinmemekle birlikte, bir bölümünün beta-laktam ajanlarla tedavi edilebileceği ileri sürülmüştür (89).

*S.aureus*'ta *mecA* kontrolündeki oksasilin direncini saptamada sefoksitin disk difüzyon testi, oksasilin disk difüzyon testiyle benzer sonuçlar vermektedir ancak sefoksitin disk testinin okunması daha kolaydır ve tercih edilen bir yöntemdir (68).

Beta-laktam bir antibiyotik olan sefoksitin, *S. aureus*'un PBP4'e karşı yüksek bir afiniteye sahiptir. Daha önce yapılan çalışmalarda; PBP2, PBP4 ve metisilin direnci arasında bir ilişki olduğu gösterilmiştir. Oksasilin PBP2a üretiminin zayıf bir indükleyicisi, sefoksitin ise *mecA* gen ekspresyonunun güçlü bir indükleyicisi olduğu (116) göz önünde tutularak, heterojen MRSA popülasyonunun tespitinde, *mecA* gen ekspresyonundaki değişiklik nedeniyle sefoksitin disk difüzyon testinin daha etkin olabileceği düşünülmektedir (28). Bazı çalışmalarda, düşük düzeyde metisilin direnci gösteren suşlarda, sefoksitin PBP2a üretimini indüklediği ve lateks aglütinasyon testinin duyarlılığını artırdığı vurgulanmıştır. Rohrer ve ark (116) MRSA lateks tarama testinin duyarlılık ve özgüllüğünü, sefoksitin ile indüksiyon öncesi sırasıyla % 93.5, %97.7 olarak, indüksiyon sonrası ise sırasıyla %100 ve %95.5 olarak rapor etmişlerdir. Cauwelier ve ark. (28)'larına göre sefoksitin disk difüzyon testinin tek dezavantajı diğer antibiyotiklere duyarlılık testleri için 35 °C olarak önerilen inkübasyon sıcaklığının bu yöntemde 30 °C olarak öneriliyor olmasıdır. Oksasilin yerine sefoksitin disk difüzyon testinin kullanılması, *mecA* aracılı olmayan direncin ortaya çıkma ihtimalini azaltabilir. Swenson ve ark.(117), *mecA* aracılı metisilin direncini tahmin etmede sefoksitin duyarlılığını %99 ve özgüllüğünü %100 olarak bulmuşlardır. *mecA* aracılı metisilin



direncinin tespitinde sefoksitin disk difüzyon testinin, oksasilin disk difüzyon testinden daha etkin olduğunu belirtmişlerdir.

Bizim çalışmamızda sefoksitin disk difüzyon testinin duyarlılığı %96,3 özgülüğü ise %98,4 olarak bulundu. Cauwelier ve ark. (28) gibi Felten ve ark.(49)'ları da bu testlerin duyarlılığını %100 olarak rapor etmişlerdir. Başka bir çalışmada, sefoksitin disk difüzyon testinin duyarlılığı %96,5 olarak tespit edilirken; yanlış dirençli sonuç saptanmamıştır. Ancak aynı çalışmada oksasilin disk difüzyon testinin duyarlılığı %90.4 iken özgülüğü %99.1 olarak tespit edilmiştir (86). Bu bulgular sefoksitin disk difüzyon yönteminin oksasilin disk difüzyon yöntemine iyi bir alternatif olduğunu göstermektedir.

Son yıllarda, *mecA* gen ürünü olan PBP2a'nın tespiti için zaman kaybını azaltan daha yeni metotlar geliştirilmiştir (43,71). Bu yöntemlerden birisi olan PBP2a lateks aglütinasyon testi 20 dakikada sonuç verebilen, uygulanması kolay bir yöntemdir (95). Aynı anda çok sayıda örneği test edebilme avantajına sahip olan bu yöntemin duyarlılığı çeşitli çalışmalarda %93.5-%100, özgülüğü ise %96.5-%100 olarak bildirilmiştir (50,118). MODSA ve BORSA suşları *mecA* genine sahip olmadığından, PBP2a ürününe de sahip değildirler. Bu suşların, PBP2a lateks aglütinasyon testi ile pozitif reaksiyon vermesi beklenmez.

Griethuysen ve ark. (119) *mecA* gen analiz sonuçları ile oksasilin agar tarama ve PBP2a lateks aglütinasyon testi sonuçlarını karşılaştırdıkları bir çalışmada PBP2a lateks aglütinasyon testini (%98.5) oksasilin agar tarama testinden (%93.6) daha duyarlı olarak bulduklarını bildirmişlerdir. Louie ve ark. (70) PBP2a lateks aglütinasyon testi, otomatize sistem ve Velogene hızlı MRSA identifikasyon testi sonuçları ile oksasilin agar tarama ve *mecA* gen analizi sonuçlarını karşılaştırdıkları çalışmaya göre, Velogene ve PBP2a lateks aglütinasyon testinin duyarlılık (%98.5) ve özgüllüklerini (%100) eşit olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada kullanılan otomatize sistemden BORSA izolatları için hatalı sonuçlar aldıklarını da rapor etmişlerdir. *mecA* gen ürünü PBP2a'nın lateks aglütinasyon testi ile negatif saptanması nedeniyle, BORSA izolatlarının tanımlanmasında daha iyi bir alternatif olabileceğini belirtmişlerdir. Aynı şekilde, van Leeuwen ve ark. (120) rutin laboratuvarlarda kullanım için PBP2a lateks aglütinasyon testinin çok yüksek duyarlılık (%96.7) ve özgüllüğe (%100) sahip olduğunu rapor ederken; Cavassini ve ark.(42)'lerinin yaptığı bir çalışmada PBP2a lateks aglütinasyon testi, 80 MRSA izolatının tamamını doğru saptarken 120 MSSA izolatının yalnızca birini MRSA olarak yanlış saptamıştır. Bu çalışmada PBP2a lateks aglütinasyon testinin

duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %100 ve %99,2 olarak oldukça yüksek saptanmıştır. Aynı çalışmada, oksasilin disk difüzyon ve oksasilin salt agar tarama yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllükleri sırasıyla %61,3, %96,7; %82,5, %98,3 olarak bulunmuştur. Telli ve ark.(113)'larının yaptığı çalışmada, lateks aglütinasyon testinin duyarlılığı %97,7 özgüllüğü %97,4 olarak saptanırken pozitif ve negatif yorumlama güçleri ise sırasıyla %98,3 ve %96,6 olarak rapor edilmiştir. Ancak çalışmada MRSA lateks aglütinasyon testine ait bütün değerler, oksasilin ve sefoksitin disk difüzyonu ve oksasilin agar taramaya ait değerlerden düşük bulunmuştur (113). *mecA* gen analizi ve %2 NaCl eklenmiş oksasilin disk difüzyon testinin kullanıldığı, 155 *S. aureus* ve 261 koagulaz negatif stafilokok izolatu ile yapılan başka bir çalışmada, özellikle *S. aureus* izolatlarında saptanan *mecA* sonuçlarının disk difüzyon sonuçları ile uyumlu olduğu rapor edilmiştir (121).

Skulnick ve ark. (122)'ları çalışmasında ise, *mecA* gen analizi ile standart ve ticari MRSA tanı metotlarını karşılaştırdığı bir çalışmada, otomatize Vitek sisteminde 254 oksasiline direçli izolatu % 14.2'sinde ve 252 oksasiline duyarlı izolatu %0.4'ünde major hata olduğunu saptamıştır. Bu çalışma sonucunda, oksasilin direncinin tespitinde otomatize Vitek sisteminin yeterli olmadığına karar verirken; *mecA* gen analizi ve diğer metotlara karşı Vitek sistemini karşılaştıran başka bir çalışmada ise metisilin direncinin tespitinde bu otomatize sistemin oldukça başarılı olduğu gösterilmiştir (123).

Yamazumi ve ark. (71) tarafında yürütölen başka bir çalışmada, otomatize Vitek GP sistemi ve MRSA lateks aglütinasyon testi sonuçları mikrodilüsyon, oksasilin agar tarama ve *mecA* gen varlığı ile karşılaştırılmıştır. MRSA lateks aglütinasyon testi, otomatize Vitek GP sistemi ve oksasilin agar tarama testlerinin sırasıyla duyarlılıkları %96.9, %98, %98 ve özgüllükleri %100, %100 ve %98 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak, MRSA lateks aglütinasyon testinin rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılabilecek pratik bir yöntem olduğu ifade edilmiştir.

Felten ve ark.(49)'ları 83'ü MRSA olan 152 *S. aureus* klinik izolatuyla yaptıkları çalışmada, düşük ve yüksek düzeyli beta-laktam direnci gösteren bütün MRSA suşlarını saptamada MRSA lateks aglütinasyon testinin duyarlılığını %97,6 olarak bildirirken; sefoksitin disk difüzyon testi %100 duyarlılık ile fenotipik MRSA tarama yöntemleri içerisinde en duyarlı yöntem olarak tespit edilmiştir.

Benzer şekilde Atay ve ark. (114)'ları da oksasilin disk difüzyon, Vitek otomatize sistem ve MRSA lateks aglütinasyon testinin duyarlılık ve özgüllüğünü,

*mecA* varlığını referans olarak sırasıyla; %100, %90; %100, %80 ve %100, %88 olarak saptamışlar, otomatize sistem ve lateks aglütinasyon testini, MRSA taraması için güvenilir testler olarak değerlendirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda MRSA saptamak amacıyla 5 farklı yöntem kullanıldı (Oksasilin disk difüzyon, Sefoksitin disk difüzyon, Oksasilin agar tarama, PBP2a lateks aglütinasyon ve Phoenix otomatize sistemi). Yöntemlerin başarısı PZR ile *mecA* geninin saptanması baz alınarak karşılaştırıldı. PBP2a lateks aglütinasyon testi 82 MRSA izolatının 79'unu doğru saptarken üç suş yanlış negatif sonuç verdi. 128 MSSA izolatından yalnızca iki tanesini dirençli olarak saptadı. Kullandığımız diğer fenotipik yöntemlerle karşılaştırıldığında, duyarlılığı (%96,3) oksasilin disk difüzyon ve oksasilin agar tarama yöntemlerinden daha yüksek, sefoksitin disk difüzyon yöntemi ile aynıydı. Lateks aglütinasyon testi, oksasilin agar tarama ve sefoksitin disk difüzyon testiyle birlikte en yüksek özgüllük değeri (%98,4) ve pozitif yorumlama gücüne (%97,5) sahipti. Oksasilin disk difüzyon ve oksasilin agar tarama yöntemlerinden daha yüksek ve sefoksitin disk difüzyon yöntemiyle de aynı negatif yorumlama gücüne (%97,6) sahipti. Bu sonuçlar daha önce yapılan çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu olarak değerlendirildi. Çalışmamızda toplam 214 *S. aureus* izolatından dördünü, *mecA* pozitif olduğu halde, fenotipik yöntemlerle MSSA olarak bulduk. Bu örneklerden sadece birinde lateks aglütinasyon testi pozitif. Buna benzer bir durumu ilk olarak Hososaka ve ark.'ları (73) 11 farklı hastaneden topladığı 480 *S. aureus* suşunda, oksasiline duyarlı ve *mecA* geni pozitif altı suşu tespit ederek göstermişlerdir. Bu tip suşların beta-laktam antibiyotiklerle tedavisi yüksek antibiyotik direncine sahip MRSA'ların ortaya çıkmasına neden olabilir (124).

*S. aureus*'lar, beta-laktam antibiyotiklere direncin seviyesine göre iki alt gruba ayrılırlar: oksasilin MİK'i 4 µg/ml'den yüksek olanlar MRSA, 2 µg/ml'den düşük olanlar ise MSSA olarak sınıflandırılırlar (68). CLSI'nın önerdiği 6 mg/l oksasilin içeren oksasilin agar tarama testi ile MRSA'lar etkin bir şekilde tanımlanabilir. Oksasilin duyarlı MRSA (OS-MRSA) gibi, oksasilin MİK'i 2 mg/l'den küçük fakat *mecA* genine sahip *S. aureus* izolatlarının kaçırılması muhtemeldir. OS-MRSA'lar düşük düzeyde beta-laktam direnci gösterdiği için beta-laktam antibiyotiklerle tedavi edilebilirler. Fakat bu yüksek düzeyli beta-laktam direncine sahip MRSA'ların ortaya çıkmasına neden olabilir. Bu nedenle OS-MRSA suşları ile infekte hastalarda beta-laktam antibiyotiklerin kullanımından kaçınılmalıdır (73).

MRSA'ların beta-laktam antibiyotiklere direnci *blaI*, *blaRI*, *blaZ*, *mecI*, *mecRI* ve *mecA* gibi net olarak tanımlanmış direnç genlerinin varlığından kaynaklanmaktadır. Fakat henüz tam olarak tanımlanamamış faktörlerin de bu direnç olayında rol alabileceği ileri sürülmektedir (53,125-127). Referans MRSA ve OS-MRSA suşlarındaki beta-laktam antibiyotiklerin yüksek MİK değerleri sadece *blaI*, *blaRI*, *blaZ*, *mecI*, *mecRI* ve *mecA* genlerinin varlığı ya da yokluğu ile açıklanamamaktadır (73).

Günümüzde rutin mikrobiyoloji laboratuvarları, MRSA tanısı için çoğunlukla fenotipik yöntemlerden birini kullanmaktadır. OS-MRSA'ların tanımlanabilmesi için de *mecA* genine bakılması gerekmektedir. Bunun yapılabilmesi ek donanım, iş gücü, eğitilmiş personel ve ek maliyet gerektirir. Bu ise rutin laboratuvarlar için pratik bir çözüm değildir. Sonuç olarak MRSA taramasının sadece fenotipik yöntemlerle yapılması OS-MRSA'ların saptanmasında yetersiz kalıp, yüksek düzeyli beta-laktam dirençli MRSA'ların ortaya çıkışını artırıyor olabilir.

MRSA'nın tanımlanmasında en güvenilir yöntem *mecA* geninin varlığının moleküler yöntemlerle gösterilmesidir. Son yıllarda rutin tanı laboratuvarlarında muhtemel kullanım amacıyla identifikasyon ve duyarlılık testleriyle kombine edilmek için geliştirilen moleküler yöntemler de mevcuttur. Fakat bu testlerin rutin tanıdaki performansını değerlendiren çok az çalışma yayınlanmıştır. Bu testlerin çokluğu, maliyeti, sınırlı sayıda örnek çalışabilme kapasitesi dezavantajlarından dolayıdır. Bu sebeple moleküler testler sadece, diğer metotlar şüpheli sonuç verdiğinde ya da klinik örneklerde, yüksek MRSA enfeksiyonu şüphesinde spesifik doğrulama amacıyla kullanılabilir. Ticari PZR testleri laboratuvar içi geliştirilmiş protokoller için uygun kontroller sağlar. Hedef genler için pozitif ve negatif kontrol suşlarının dahil edilmesi gereklidir (27).

Metisilin direncinin düzenlenmesinde *mecA* geni yanında *fem* ve *aux* genleri gibi birçok faktör de yer almaktadır (53). *mecA* gen ekspresyonundaki çeşitlilik MRSA'nın homojen ve heterojen popülasyonunun varlığını açıklar. Nazokomiyal MRSA suşları sıklıkla oksasiline yüksek düzeyde direnç ve çeşitli antibiyotiklere de çapraz direnç göstermekte, bu yüzden standart antimikrobiyal duyarlılık testleriyle kolaylıkla saptanabilmektedir. Fakat toplum kaynaklı enfeksiyonlara sebep olan MRSA'larda, *mecA* geninin ekspresyonuna bağlı olarak oksasiline değişik düzeylerde direnç daha sık görülür. Bu yüzden rutin duyarlılık test metodlarıyla toplum kökenli MRSA'ları saptamak daha zor olmaktadır (49).

Kazanılmış *mecA* genine sahip suşların genetik altyapısına bağlı olarak direnç düzeyleri, fenotipik olarak duyarlıdan yüksek dirençliye kadar değişmektedir. MRSA'nın en önemli karakteristiği, direncin heterojen ekspresyonudur. Hücre duvarındaki peptidoglikan prekürsörlerin doğru ve etkin sentezi, PBP2a tarafından direncin maksimum ekspresyonu için gereklidir. *S. aureus*'taki metisiline direnç seviyesi, hücre duvarı prekürsörlerinin oluşumu, döngüsü, regülasyonu, transportu ve sinyal iletiminde rol oynayan genler tarafından belirlenir. Ancak, klinik izolatlarda bu tür faktörlerin fonksiyonelliği ya da etkisi hakkında henüz net bir bilgi yoktur (53).

Bizim çalışmamızda, 214 *S. aureus* suşu içerisinde 3 izolat *mecA* genine sahip olduğu halde oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon, oksasilin salt agar, PBP2a lateks aglütinasyon yöntemleriyle duyarlı olarak saptandı. Bu suşların oksasilin MİK değerleri 2 µg/ml'nin üzerindeydi. *mecA* pozitif bu 3 suşun hepsini, *mecA* geni eksprese edilmeyen suşlar olarak değerlendirdik. Yani *mecA*'nın varlığına rağmen bu genin ürünü olan PBP2a'nın üretiminin olmadığı düşünüldü. *mecA* gen ekspresyonunun olmaması ise muhtemelen *mecA* geninin ekspresyonunu düzenleyen *blaI*, *blaR1* ve *mecI*, *mecR* olarak isimlendirilen iki regülatör gen grubuyla ilişkili olabilir. Ayrıca *femA*, *femB* ve *fmhB* gibi genlerin mutasyonları sonucu *mecA* geninin fonksiyonelliğinde meydana gelecek değişikliklere de bağlı olabilmektedir (53).

Geleneksel olarak, *S. aureus* tarafından oluşturulan infeksiyonlarda mikroorganizmanın identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılık testleri için ortalama iki gün gerekmektedir. Benzer şekilde, moleküler yöntemle *mecA*'nın saptanması da aynı süre ve ek teknolojik donanım gerektirmektedir (128-135). MRSA infeksiyonlarında etkenin hızlı ve doğru tanımlanması mortalite, hastanede yatış süresi ve tedavi maliyetinde önemli bir azalmayı da beraberinde getirmektedir (128,136). Otomatize sistemin önemli bir avantajı tür düzeyinde identifikasyon ve metisilin direncinin saptanmasında geleneksel fenotipik metotlara kıyasla zaman kazancı sağlamasıdır. Bu yöntemle *S. aureus* izolatlarının identifikasyonu için ortalama 4 (2-12) saat, antibiyotik duyarlılık sonuçları için ise ortalama 6 (3-15) saat yeterli olabilmektedir (137). Phoenix otomatize sisteminin kullanımı oldukça basittir. Ancak, önemli bir dezavantajı; plakların manuel olarak inoküle edilmesini gerektirmesidir. Bu sistemde aynı anda duyarlılık testleri yapılabilir, sonuçların bilgisayar ortamında saklanmasına olanak verir. Son yıllarda, rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında, kültürlerin değerlendirmesini yapan otomatize sistemler hızla yaygınlaşmaktadır. Bu otomatize sistemler, örneklerin inceleme sürecindeki bireysel hataları, eğitimli personel ihtiyacını azaltmaktadır. Ayrıca

hızlı sonuç vermeleri de mikrobiyolojik etkenin erken tanınması sonucunda tedavi başarısını artırmaktadır. Fakat tanı sürecinde maliyet artışlarına da sebep olmaktadır. Otomatize sistemlerin kullanımı yaygınlaştıkça, bu sistemlerin başarı oranını sorgulayan yayınların sayısı da hızla artmaktadır. Otomatize sistemlerin *S. aureus*'larda MRSA oranını saptamadaki başarısını değerlendiren birçok çalışma bulunmasına karşın, bizim laboratuvarımızda bulunan tam otomatize sistemin (Phoenix) MRSA tespitindeki başarısını değerlendiren çok az çalışma bulunmaktadır (117,128,137-141).

Spanu ve ark.(137)'lerinin yaptığı çalışmada, 223 *S. aureus* izolatının tamamında *mecA* gen pozitifliği ile uyumlu olarak otomatize sistemin duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif yorumlama gücü %100 olarak saptanmıştır. Başka bir çalışmada, otomatize sistemdeki sefoksitin MİK değeri kullanılarak sistemin duyarlılığı %91 ve özgüllüğü ise %100 olarak tespit edilmiştir. Aynı çalışmada, oksasilin MİK değerleri kullanıldığında aynı otomatize sistemin duyarlılığı %67.1 ve özgüllüğü ise %96.4 olarak bulunmuştur (117).

Bizim çalışmamızda, tam otomatize sistemin duyarlılık ve negatif yorumlama gücü diğer yöntemlere göre daha yüksek, özgüllük ve pozitif yorumlama gücü oksasilin disk difüzyon testinden daha yüksek, ancak diğer testlerden daha düşük saptandı. Otomatize sistem 82 *mecA* pozitif suştan sadece bir tanesini MSSA olarak yanlış tanımlarken, 128 *mecA* negatif izolattan üç tanesi MRSA olarak yanlış tanımlandı. Çalışmamızda kullandığımız yöntemler içerisinde otomatize sistem, en duyarlı (%98,7) yöntem olarak dikkati çekmektedir. Ancak, otomatize sistemin  $\leq 0,25$   $\mu\text{g/ml}$  MİK değerlerine sahip izolatları MSSA ve  $\geq 2$   $\mu\text{g/ml}$  MİK değerlerine sahip izolatları ise MRSA olarak değerlendirmesi, düşük düzeyde dirence sahip BORSA ve MODSA gibi izolatları değerlendirmede yetersiz kalmıştır. Bu da otomatize sistemin, *S. aureus*'lardaki metisilin direncini saptamada ve tedaviye yön vermede yetersiz kalabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda, *S. aureus*'lardaki metisilin direncini saptamada kullanılan beş farklı yöntemin hepsinin de duyarlılık ve özgüllüğü %95'in üzerindeydi. Bu yöntemler içerisinde sefoksitin disk difüzyon testi; *mecA* geni için iyi bir indükleyici olması, maliyet etkinliği ve doğru sonuç vermedeki başarısı nedeniyle rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanım için elverişli bir yöntem olarak göze çarpmaktadır.

## SONUÇLAR

Tüm dünyada toplum ve hastane kaynaklı ciddi infeksiyonlara sebep olabilen *S. aureus* suşlarının uygun bir yöntemle doğru ve kısa zamanda saptanması son derece önemlidir. Bu çalışmamızda, *mecA* varlığını referans olarak, fenotipik yöntemlerden oksasilin ve sefoksitin disk difüzyonu ile oksasilin agar taramanın, serolojik bir yöntem olan lateks aglütinasyon testinin ve bir otomatize sistemin *S. aureus*'larda metisilin direncini saptamadaki başarısını karşılaştırdık. Çalışmamıza göre:

- Rutin laboratuvarlarda MRSA suşlarının tespitinde sıklıkla kullanılan oksasilin disk difüzyon yöntemine göre sefoksitin disk difüzyon yönteminin kullanılması daha faydalı olacaktır.
- *mecA* gen ürünü olan PBP2a'yı saptayan lateks aglütinasyon testinin kullanımı pratik olup sefoksitin disk difüzyon testiyle aynı derecede güvenilirdir.
- Tam otomatize sistemin, MRSA suşlarını saptamadaki başarısı diğer yöntemlerden daha iyi bulunmuştur. Bu sistemin rutin tanı laboratuvarlarında kullanımı faydalı olacaktır. Ancak maliyet etkinliği tartışmalıdır.
- MRSA suşlarının saptanmasında, bir doğrulama testi olan oksasilin agar tarama yönteminin güvenilirliği ise oksasilin disk difüzyon testinden çok farklı değildir.
- Kullanılan testlerin maliyeti de göz önünde bulundurulduğunda sefoksitin disk difüzyon yöntemi rutin kullanım için uygun bir yöntem olabilir.

## ÖZET

### ***STAPHYLOCOCCUS AUREUS*'LARDA METİSİLİN DİRENCİNİN TESPİTİNDE OKSASİLİN-SEFOKSİTİN DİSK DİFÜZYON, OKSASİLİN AGAR TARAMA, LATEKS AGLÜTİNASYON, *mecA* GEN TESPİTİ VE BİR OTOMATİZE SİSTEMİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**Amaç:** Bu çalışmada: Turgut Özal Tıp Merkezi rutin mikrobiyoloji laboratuvarında MRSA saptanmasında kullanılan fenotipik yöntemlerle MRSA lateks aglütinasyon testi ve bir otomatize sistemin karşılaştırılması amaçlandı.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmaya alınan 214 izolatın koloni morfolojisi, Gram boyama, katalaz, mannitol fermantasyonu ve koagülaz testleriyle *S. aureus* oldukları doğrulandı. MRSA'nın tanımlanmasında PZR ile *mecA* genin tespiti referans alındı. Daha sonra, bütün suşlara oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon, oksasilin agar tarama, MRSA lateks aglütinasyon testi ve otomatize sistem uygulandı. Yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüğü değerlendirildi.

**Bulgular:** Çalışmaya alınan suşların %40'ı *mecA* pozitifliğine göre MRSA olarak tanımlandı. Uygulanan oksasilin disk difüzyon, sefoksitin disk difüzyon, oksasilin agar tarama, MRSA lateks aglütinasyon testi ve otomatize sistemin MRSA tespitindeki duyarlılıkları sırasıyla %95.1, %96.3, %95.1, %96.3 ve %98.7; özgüllükleri %95.3, %98.4, %98.4, %98.4 ve %97.6 olarak tespit edildi. Üç suş, *mecA* pozitif ve oksasilin MİK'i >2 µg/ml olup; disk difüzyon, agar tarama ve lateks aglütinasyon yöntemleriyle metisiline duyarlı bulundu. Dört suş ise *mecA* pozitif olduğu halde, bütün testlerde metisiline duyarlı olup, oksasilin MİK'leri <2 µg/ml olarak saptandı ve bu suşlar oksasiline duyarlı MRSA'lar (OS-MRSA) olarak değerlendirildi.



**Sonuç:** Otomatize sistem MRSA suşlarının tespitinde en yüksek duyarlılık değerine sahipken; lateks aglütinasyon ve sefoksitin disk difüzyon testleri aynı duyarlılığa sahipti. Otomatize sistem ve lateks aglütinasyon testinin hızlı sonuç vermesi diğer fenotipik yöntemlerden daha iyi olduklarını düşündürmektedir. Ancak maliyet etkinlik göz önünde bulundurulduğunda sefoksitin disk difüzyon testi rutin laboratuvarlarda kullanım açısından daha uygun görünmektedir. Ayrıca, OS-MRSA suşlarının tespiti için *mecA* varlığı ve oksasilin MİK değerlerinin eşzamanlı olarak araştırılması gereklidir.

**Anahtar Kelimeler:** Sefoksitin disk difüzyon, *mecA*, oksasilin MRSA, lateks aglütinasyon, Phoenix, özgüllük.

## SUMMARY

### COMPARISON OF OXACILLIN-CEFOXITINE DISC DIFFUSION, OXACILLIN AGAR SCREENING, LATEX AGLUTINATION, *mecA* GENE DETECTION AND AN AUTOMATIZED SYSTEM FOR DETECTION OF METHICILLIN RESISTANCE IN *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

**Purpose:** In this study, we aimed to compare the phenotypic methods that are employed at the routine microbiology laboratory of Turgut Ozal Medical Center in determining methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), MRSA latex agglutination test, and an automatized system.

**Materials and Methods:** The of 214 isolates that were included in the study, were verified as *Staphylococcus aureus* using colony morphology, Gram staining, catalase, mannitol fermentation, and coagulase tests. Determination of *mecA* gen by PCR was referred to define MRSA. Later on, oxacillin and cefoxitin disc diffusion, oxacillin agar screening, MRSA latex agglutination test, and the automatized system were applied to all species. Sensitivity and specificity of the methods were evaluated.

**Results:** Of the species included in the study, 40% were determined as MRSA since they were *mecA* positive. The sensitivity of oxacillin disc diffusion, cefoxitin disc diffusion, oxacillin agar screening, MRSA latex agglutination test, and the automatized system in determining MRSA were 95.1%, 96.3%, 95.1%, 96.3% and 98.7%, respectively; the specificity of oxacillin disc diffusion, cefoxitin disc diffusion, oxacillin agar screening, MRSA latex agglutination test, and the automatized system in determining MRSA were 95.3%, 98.4%, 98.4%, 98.4% ve 97.6%, respectively. Three species were *mecA* positive and their oxacillin MIC were greater than 2 µg/ml; and they

were determined as sensitive to methicillin by disc diffusion, agar screening and latex agglutination. Another 4 species were determined as sensitive to methicillin by all tests, though they were *mecA* positive. The MIC values to oxacillin of these 4 species were lower than 2 µg/ml and these species were determined as oxacillin- sensitive MRSA (OS-MRSA).

**Conclusion:** The automatized system had the highest sensitivity values in determining the MRSA species. Also, cefoxitin disc diffusion and latex agglutination tests showed the same sensitivity values. The rapid results achieved by automatized system and latex agglutination tests suggests us that they are superior to the other phenotypic methods. Nevertheless, cefoxitin disc diffusion test seems to be more appropriate to perform at routine laboratories in terms of cost and efficiency. Furthermore, presence of *mecA* and oxacillin MIC values should be performed simultaneously to determine OS-MRSA species.

**Key words:** Cefoxitin disk difüzyon, *mecA*, oxacillin, MRSA, latex agglutination, Phoenix, specificity.

## KAYNAKLAR

- 1- Cengiz AT. Tıp ve diş hekimliğinde genel ve özel mikrobiyoloji; Ankara: Güneş Kitapevi. 2004:343-50.
- 2- Kayaalp SO. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi tedavi yönünden tıbbi farmakoloji. 11. Baskı. Ankara: Hacettepe Taş Yayın Evi. 2005:145-200.
- 3- Dündar V. Metisiline dirençli stafilokok infeksiyonları. Klimik Dergisi. 2000;13:26-7.
- 4- Derbentli Ş. Stafilokoklarda antibiyotik direnci. ANKEM Derg. 2005;19(Ek-2):54-60.
- 5- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin--United States, 2002. MMWR. 2002;51(26):565-7.
- 6- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* -Pennsylvania, 2002. MMWR. 2002;51(40):902.
- 7- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller PA. Medical Microbiology; 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier. 2005:203-12;221-36.
- 8- Ryan KJ; Ray CG. Sherris Medical Microbiology, 4th ed., McGraw Hill. 2004 [http://content.answers.com/main/content/\(31/01/2008\)](http://content.answers.com/main/content/(31/01/2008)).
- 9- Cottagnoud P. Cellular and molecular aspects of drugs of the future: meropenem. Cell Mol Life Sci. 2002;59(11):1928-33.
- 10- Garcia-Bustos JF, Chait BT, Tomasz A. Structure of the peptide network of pneumococcal peptidoglycan. J Biol Chem. 1987;262(32):15400-5.
- 11- Pereira SF, Henriques AO, Pinho MG, de Lencastre H, Tomasz A. Role of PBP1 in cell division of *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol. 2007;189(9):3525-31.
- 12- Georgopapadakou NH, Liu FY. Binding of beta-lactam antibiotics to penicillin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus faecalis*: relation to antibacterial activity. Antimicrob Agents Chemother. 1980 Nov;18(5):834-6.
- 13- Georgopapadakou NH, Liu FY. Penicillin-binding proteins in bacteria. Antimicrob Agents Chemother. 1980 Jul;18(1):148-57.
- 14- Martins A, Cunha M de LRS. methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci: epidemiological and molecular aspects. Microbiol. Immunol 2007;51(9):787-795.
- 15- Livermore DM. Antibiotic resistance in staphylococci. Int J Antimicrob Agents. 2000;16 Suppl 1:S3-10.

- 16- Gülay Z. Antimikrobiyal ilaçlara direnç. In: Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi 1999:49,91-108.
- 17- Kuyucu N. Antibiyotik direnci. Çocuk Enf Derg 2007;1(Özel sayı 1):33-8.
- 18- Zscheck KK, Murray BE. Genes involved in the regulation of beta-lactamase production in enterococci and staphylococci. Antimicrob Agents Chemother. 1993;37(9):1966-70.
- 19- Jr. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6<sup>th</sup> ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. 2006:623-71.
- 20- McDonald CL, Chapin K. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* from blood culture bottles by a classic 2-hour tube coagulase test. J Clin Microbiol. 1995;33(1):50-2.
- 21- Bilgehan H. Temel mikrobiyoloji ve bağışıklık bilimi. 10. baskı. İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi. 2002:361-530.
- 22- Gudding R. Differentiation of staphylococci on the basis of nuclease properties. J Clin Microbiol. 1983;18(5):1098-101.
- 23- Langlois BE, Harmon RJ, Akers K, Aaron DK. Comparison of methods for determining DNase and phosphatase activities of staphylococci. J Clin Microbiol. 1989;27(5):1127-9.
- 24- Bilgehan H. Klinik mikrobiyolojik tanı. 3. baskı. İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi. 2002:425-54;649-712.
- 25- Waller JR, Hodel SL, Nuti RN. Improvement of two toluidine blue O-mediated techniques for DNase detection. J Clin Microbiol. 1985;21(2):195-9.
- 26- Brakstad OG, Maeland JA, Chesneau O. Comparison of tests designed to identify *Staphylococcus aureus* thermostable nuclease. APMIS. 1995;103(3):219-24.
- 27- Brown DF, Edwards DI, Hawkey PM, Morrison D, Ridgway GL, Towner KJ, Wren MW; Joint Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy; Hospital Infection Society; Infection Control Nurses Association. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). J Antimicrob Chemother. 2005; 56(6):1000-18.
- 28- Cauwelier B, Gordts B, Descheemaeker P, Van Landuyt H. Evaluation of disk diffusion method with cefoxitin (30 µg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2004;23:389-92.
- 29- Mason WJ, Blevins JS, Beenken K, Wibowo N, Ojha N, Smeltzer MS. Multiplex PCR protocol for the diagnosis of staphylococcal infection. J Clin Microbiol. 2001;39(9):3332-8.

- 30- Geha DJ, Uhl JR, Gustaferra CA, Persing DH. Multiplex PCR for identification of methicillin-resistant staphylococci in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 1994;32(7):1768-72.
- 31- Vannuffel P, Gigi J, Ezzedine H, Vandercam B, Delmee M, Wauters G, Gala JL. Specific detection of methicillin-resistant *Staphylococcus* species by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 1995;33(11):2864-7.
- 32- Barski P, Piechowicz L, Galiński J, Kur J. Rapid assay for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using multiplex PCR. *Mol Cell Probes.* 1996;10(6):471-5.
- 33- Towner KJ, Talbot DC, Curran R, Webster CA, Humphreys H. Development and evaluation of a PCR-based immunoassay for the rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol.* 1998;47(7):607-13.
- 34- Kearns AM, Seiders PR, Wheeler J, Freeman R, Steward M. Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci by multiplex PCR. *J Hosp Infect.* 1999;43(1):33-7.
- 35- Grisold AJ, Leitner E, Mühlbauer G, Marth E, Kessler HH. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous confirmation by automated nucleic acid extraction and real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2002;40(7):2392-7.
- 36- Levi K, Bailey C, Bennett A, Marsh P, Cardy DL, Towner KJ. Evaluation of an isothermal signal amplification method for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from patient-screening swabs. *J Clin Microbiol.* 2003;41(7):3187-91.
- 37- Durupınar B. Antibiyotiklere dirençte yeni eğilimler. *Klinik Dergisi* 2001;14(2):47-56.
- 38- Barber M. Methicillin-resistant staphylococci. *J Clin Pathol.* 1961;14:385-93.
- 39- Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(4):781-91.
- 40- Shimaoka M, Yoh M, Segawa A, Takarada Y, Yamamoto K, Honda T. Development of enzyme-labeled oligonucleotide probe for detection of *mecA* gene in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 1994;32(8):1866-9.
- 41- Ubukata K, Nakagami S, Nitta A, Yamane A, Kawakami S, Sugiura M, Konno M. Rapid detection of the *mecA* gene in methicillin-resistant staphylococci by enzymatic detection of polymerase chain reaction products. *J Clin Microbiol.* 1992;30(7):1728-33.

- 42- Cavassini M, Wenger A, Jaton K, Blanc DS, Bille J. Evaluation of MRSA-screen, a simple anti-PBP 2a slide latex agglutination kit, for rapid detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 1999;37(5):1591-94.
- 43- Nakatomi Y, Sugiyama J. A rapid latex agglutination assay for the detection of penicillin-binding protein 2'. Microbiol Immunol. 1998;42(11):739-43.
- 44- Qadri SM, Ueno Y, Imambaccus H, Almodovar E. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by Crystal MRSA ID System. J Clin Microbiol. 1994;32(7):1830-2.
- 45- Gerberding JL, Miick C, Liu HH, Chambers HF. Comparison of conventional susceptibility tests with direct detection of penicillin-binding protein 2a in borderline oxacillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 1991;35(12):2574-9.
- 46- Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1991;29(10):2240-4.
- 47- Okuma K, Iwakawa K, Turnidge JD et al. Dissemination of new methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in the community. J Clin Microbiol. 2002;40(11):4289-94.
- 48- Shukla SK, Ramaswamy SV, Conradt J et al. Novel polymorphisms in mec genes and a new mec complex type in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates obtained in rural Wisconsin. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(8):3080-5.
- 49- Felten A, Grandry B, Lagrange PH, Casin I. Evaluation of three techniques for detection of low-level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the Vitek 2 system, and the MRSA-screen latex agglutination test.. J Clin Microbiol. 2002;40(8): 2766-71.
- 50- Sakoulas G, Gold HS, Venkataraman L, Degirolami PC, Eliopoulos GM, Qian Q. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains. J. Clin. Microbiol. 2001;39(11):3946-51.
- 51- Araj GF, Talhouk RS, Simaan CJ, Maasad MJ. Discrepancies between *mecA* PCR and conventional tests used for detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Int J Antimicrob Agents. 1999;11(1):47-52.
- 52- Bignardi GE, Woodford N, Chapman A, Johnson AP, Speller DC. Detection of the *mec-A* gene and phenotypic detection of resistance in *Staphylococcus aureus* isolates with borderline or low-level methicillin resistance. J Antimicrob Chemother. 1996;37(1):53-63.
- 53- Berger-Bachi B, Rohrer S. Factors influencing methicillin resistance in Staphylococci. Arch Microbiol 2002;178:165-71.

- 54- McKinney TK, Sharma VK, Craig WA, Archer GL. Transcription of the gene mediating methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (*mecA*) is corepressed but not coinduced by cognate *mecA* and beta-lactamase regulators. *J Bacteriol.* 2001;183(23):6862-8.
- 55- Şalvarcı Ş. *Staphylococcus aureus* suşlarında metisilin direncinden sorumlu *mecA*, *mecRI* ve *mecI* genlerinin PZR (polimeraz zincir reaksiyonu) metodu ile saptanması. Yüksek lisans tezi, 2006; Isparta.
- 56- García-Castellanos R, Mallorquí-Fernández G, Marrero A, Potempa J, Coll M, Gomis-Rüth FX. On the transcriptional regulation of methicillin resistance: MecI repressor in complex with its operator. *J Biol Chem.* 2004;279(17):17888-96
- 57- Mallorquí-Fernández G, Marrero A, García-Piquè S, García-Castellanos R, Gomis-Rüth FX. Staphylococcal methicillin resistance: fine focus on folds and functions. *FEMS Microbiol Lett.* 2004;235(1):1-8.
- 58- Berger-Bächli B. Genetic basis of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Cell Mol Life Sci.* 1999;56(9-10):764-70.
- 59- Katayama Y, Zhang HZ, Hong D, Chambers HF. Jumping the barrier to beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2003;185(18):5465-72.
- 60- Hartman BJ, Tomasz A. Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1986;29(1):85-92.
- 61- De Lencastre H, Wu SW, Pinho MG at al. Antibiotic resistance as a stress response: complete sequencing of a large number of chromosomal loci in *Staphylococcus aureus* strain COL that impact on the expression of resistance to methicillin. *Microb Drug Resist.* 1999;5(3):163-75.
- 62- Rosato AE, Craig WA, Archer GL. Quantitation of *mecA* transcription in oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates. *J Bacteriol.* 2003;185(11):3446-52.
- 63- Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of IS431-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(7):1955-63.
- 64- Kobayashi N, Alam MM, Urasawa S. Genomic rearrangement of the *mec* regulator region mediated by insertion of IS431 in methicillin-resistant staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(1):335-8.
- 65- Wu S, Piscitelli C, de Lencastre H, Tomasz A. Tracking the evolutionary origin of the methicillin resistance gene: cloning and sequencing of a homologue of *mecA*



- from a methicillin susceptible strain of *Staphylococcus sciuri*. *Microb Drug Resist*. 1996;2(4):435-41.
- 66- Archer GL, Niemeyer DM, Thanassi JA, Pucci MJ. Dissemination among staphylococci of DNA sequences associated with methicillin resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38(3):447-54.
  - 67- Hanssen AM, Ericson Sollid JU. SCCmec in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2006;46(1):8-20.
  - 68- Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Disc Susceptibility Testing. 16<sup>th</sup> informational supplement. CLSI document. M2-A9, CLSI. 2007. Wayne, Pa.
  - 69- Hussain Z, Stoakes L, Garrow S, Longo S, Fitzgerald V, Lannigan R. Rapid detection of *mecA*-positive and *mecA*-negative coagulase-negative staphylococci by an anti-penicillin binding protein 2a slide latex agglutination test. *J Clin Microbiol*. 2000;38(6):2051-4.
  - 70- Louie L, Matsumura SO, Choi E, Louie M, Simor AE. Evaluation of three rapid methods for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol*. 2000;38(6):2170-3.
  - 71- Yamazumi T, Marshall SA, Wilke WW, Diekema DJ, Pfaller MA, Jones RN. Comparison of the Vitek Gram-Positive Susceptibility 106 card and the MRSA-screen latex agglutination test for determining oxacillin resistance in clinical bloodstream isolates of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2001;39(1):53-6.
  - 72- Thornsberry C, McDougal LK. Successful use of broth microdilution in susceptibility tests for methicillin-resistant (heteroresistant) staphylococci. *J Clin Microbiol*. 1983;18(5):1084-91.
  - 73- Hososaka Y, Hanaki H, Endo H et al. Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. *J Infect Chemother* 2007;13:79-86.
  - 74- Varaldo PE, Montanari MP, Biavasco F, Manso E, Ripa S, Santacroce F. Survey of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* for borderline susceptibility to antistaphylococcal penicillins. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1993;12(9):677-82.
  - 75- Suggs AH, Maranan MC, Boyle-Vavra S, Daum RS. Methicillin-resistant and borderline methicillin-resistant asymptomatic *Staphylococcus aureus* colonization in children without identifiable risk factors. *Pediatr Infect Dis J*. 1999;18(5):410-4.
  - 76- Ito T, Hiramatsu K. Acquisition of methicillin resistance and progression of multiantibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Yonsei Med J*. 1998;39(6):526-33.

- 77- Sá-Leão R, Santos Sanches I, Dias D, Peres I, Barros RM, de Lencastre H. Detection of an archaic clone of *Staphylococcus aureus* with low-level resistance to methicillin in a pediatric hospital in Portugal and in international samples: relics of a formerly widely disseminated strain? J Clin Microbiol. 1999;37(6):1913-20.
- 78- Wannet WJ, Spalburg E, Heck ME, Pluister GN, Willems RJ, De Neeling AJ. Widespread dissemination in The Netherlands of the epidemic berlin methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clone with low-level resistance to oxacillin. J Clin Microbiol. 2004;42(7):3077-82.
- 79- Kampf G, Adena S, Rüdén H, Weist K. Inducibility and potential role of MecA-gene-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from colonized healthcare workers as a source for nosocomial infections. J Hosp Infect. 2003;54(2):124-9.
- 80- Chambers HF, Archer G, Matsuhashi M. Low-level methicillin resistance in strains of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 1989;33(4):424-8.
- 81- Tomasz A, Drugeon HB, de Lencastre HM, Jabes D, McDougall L, Bille J. New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. Antimicrob Agents Chemother. 1989;33(11):1869-74.
- 82- Georgopapadakou NH. Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to  $\beta$ -lactams. Antimicrob Agent Chemother 1993;37(10):2045-53.
- 83- Wise R, Hart T, Cars O, Streulens M, Helmuth R, Huovinen P, Sprenger M. Antimicrobial resistance. Is a major threat to public health. BMJ. 1998; 317(7159):609-10.
- 84- Swenson JM, Spargo J, Tenover FC, Ferraro MJ. Optimal inoculation methods and quality control for the NCCLS oxacillin agar screen test for detection of oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 2001; 39(10):3781-4.
- 85- Swenson JM, Tenover FC, cefoxitin disk study group. Results of disk diffusion testing with cefoxitin correlate with presence of *mecA* in staphylococcus spp. J. Clin. Microbiol. 2005;43(8):3818-23.
- 86- Boutiba-Ben Boubaker I, Ben Abbes R, Ben Abdallah H et al. Evaluation of a cefoxitin disk diffusion test for the routine detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect 2004;10(8):762-5.
- 87- Skov R, Smyth R, Clausen M, Larsen AR, Frimodt-Møller N, Olsson-Liljequist B, Kahlmeter G. Evaluation of a cefoxitin 30 microg disc on Iso-Sensitest agar for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother. 2003;52(2):204-7.

- 88-** Urbásková P, Melter O, Macková B, Jakubů V, Wünschová M. Detection of MRSA in a group of 752 strains of *S. aureus* using a cefoxitin disk. *Epidemiol Mikrobiol Imunol.* 2004;53(2):62-5
- 89-** Bethel CD, Boonlayangor S. Oxacillin salt agar screen test to detect oxacillin (meticillin)-resistant *Staphylococcus aureus*. In: Isenberg HD. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. 2nd ed. Washington D.C.: ASM press 2004(Vol 2):5.4.1-5.4.4.
- 90-** Persing DH, Smith TF, Tenover FC, White TJ. *Diagnostic molecular microbiology principles and applications*. Washinton DC, American Society for Microbiology, 1993:539-42.
- 91-** Orrett FA, Land M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* prevalence: current susceptibility patterns in Trinidad. *BMC Infectious Diseases* 2006;6:83-8.
- 92-** Laupland KB, Church DL, Mucenski M, Sutherland LR, Davies HD. Population-based study of the epidemiology of and the risk factors for invasive *Staphylococcus aureus* infections. *J Infect Dis* 2003;187:1452-9.
- 93-** Gould IM. MRSA bacteraemia. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2007;30S:S66-S70.
- 94-** Humphreys H. National guidelines for the control and prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* – what do they tell us?. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13:846-53.
- 95-** Stemper ME, Shukla SK, Reed KD. Emergence and spread of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in rural Wisconsin, 1989 to 1999. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42(12):5673-80.
- 96-** Shukla SK, Stemper ME, Ramaswamy SV et al. Molecular characteristics of nosocomial and native American community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones from rural Wisconsin. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(8):3752-57.
- 97-** Klevens RM, Edwards JR, Tenover FC et al. Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units in US hospitals, 1992-2003. *Clin Infect Dis* 2006;42:389-91.
- 98.-** Bell JM, Turnidge JD, SENTRY APAC Participants. High prevalence of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from hospital patients in Asia-Pacific and South Africa: Results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1998-1999. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:879-81.
- 99-** Bin Kim H, Hee-Chang J, Jung Nam H et al. In vitro activities of 28 antimicrobial agents against *Staphylococcus aureus* isolates from tertiary-care hospitals in Korea: a nationwide study. *Antimicrob Agent Chemother* 2004;48:1124-7.

- 100-** Hsueh P-R, Teng LJ, Chen W-H et al. Increasing prevalence of MRSA causing Nosocomial infections at a university hospital in Taiwan from 1986 to 2001. *Antimicrob Agent Chemother* 2004;48:1361-4.
- 101-** Kuehnert MJ, Hill HA, Kupronis BA, Tokars JI, Solomon SL, Jernigan DB. Methicillin-resistant-*Staphylococcus aureus* hospitalizations, United States. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(6):868-72
- 102-** Jones ME, Draghi DC, Karlowsky JA, Sahm DF, Bradley JS. Prevalence of antimicrobial resistance in bacteria isolated from central nervous system specimens as reported by U.S. hospital laboratories from 2000 to 2002. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2004;3:3.
- 103-** de Oliveira Conterno L, Wey SB, Castelo A. *Staphylococcus aureus* bacteremia: comparison of two periods and a predictive model of mortality. *Braz J Infect Dis*. 2002;6(6):288-97.
- 104-** Fluit AC, Wielders CL, Verhoef J, Schmitz FJ. Epidemiology and susceptibility of 3,051 *Staphylococcus aureus* isolates from 25 university hospitals participating in the European SENTRY study. *J Clin Microbiol*. 2001;39(10):3727-32.
- 105-** Salgado CD, Farr BM, Calfee DP. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a meta-analysis of prevalence and risk factors. *Clin Infect Dis*. 2003;36(2):131-9.
- 106-** Tiemersma EW, Bronzwaer SLAM, Lyytikäinen O et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999-2002. *Emerg Infect Dis* 2004;10:1627-34.
- 107-** Derbentli Ş. Cerrahi infeksiyonlarda dirençli Gram pozitif bakteri sorunu. *ANKEM Dergisi* 2004;18(ek2):215-21.
- 108-** Stefani S, Varaldo PE. Epidemiology of methicillin-resistant staphylococci in Europe. *Clin Microbiol Infect*. 2003;9(12):1179-86.
- 109-** Vardar-Ünlü G, Ünlü M, Yağmuroğlu A. Klinik örneklerden soyutlanan *Staphylococcus aureus* ve koagülaz negatif stafilocok izolatlarında mupirosin direnci. *ANKEM Derg*. 2006;20(4):222-5.
- 110-** Sipahi OR, Pullukçu H, Aydemir Ş ve ark. Mikrobiyolojik kanıtlı hastane kökenli *Staphylococcus aureus* bakteriyemilerinde direnç paternleri: 2001-2005 yıllarının değerlendirmesi. *ANKEM Derg*. 2007;21(1):1-4.
- 111-** Bozca B, Coşkuner SA, Biçer KÇ, Genç VE, Özgenç O. Stafilocoklarda metisilin direnç oranlarının saptanması. *ANKEM Derg* 2007;21(Ek1):S26.
- 112-** Güner S, Gürler N. 2001-2006 yıllarında cerehat ve yara örneklerinden izole edilen stafilocok suşlarında metisilin direnci. *ANKEM Derg* 2007;21(Ek1):S27.

- 113-** Telli M, Sümerkan B, Eşel D. *Staphylococcus aureus*'ta metisilin direncinin belirlenmesinde sefoksitin disk, oksasilin disk, oksasilin agar tarama ve PBP2a lateks testlerinin karşılaştırılması. *İnfeksiyon Dergisi* 2006;20(2):93-6.
- 114-** Atay T, Gülay Z. Comparison of PBP2a latex agglutination test with disk diffusion, *mecA* PCR and Vitek for the detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *ANKEM derg.* 2004;18(4):205-8.
- 115-** Kohner P, Uhl J, Kolbert C, Persing D, Cockerill F 3rd. Comparison of susceptibility testing methods with *mecA* gene analysis for determining oxacillin (methicillin) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol.* 1999;37(9):2952-61.
- 116-** Rohrer S, Tschierske M, Zbinden R, Berger-Bächli B. Improved methods for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2001;20(4):267-70.
- 117-** Swenson JM, Lonsway D, McAllister S et al. Detection of *mecA*-mediated resistance using reference and commercial testing methods in a collection of *Staphylococcus aureus* expressing borderline oxacillin MICs. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2007;58:33-9.
- 118-** Swenson JM, Williams PP, Killgore G, O'Hara CM, Tenover FC. Performance of eight methods, including two new rapid methods, for detection of oxacillin resistance in a challenge set of *Staphylococcus aureus* organisms. *J Clin Microbiol.* 2001;39(10):3785-8.
- 119-** van Griethuysen A, Pouw M, van Leeuwen N, Heck M, Willemse P, Buiting A, Kluytmans J. Rapid slide latex agglutination test for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 1999;37(9):2789-92.
- 120-** van Leeuwen WB, Kreft DE, Verbrugh H. Validation of rapid screening tests for the identification of methicillin resistance in staphylococci. *Microb Drug Resist.* 2002;8(1):55-9.
- 121-** Kolbert CP, Arruda J, Varga-Delmore P et al. Branched-DNA assay for detection of the *mecA* gene in oxacillin-resistant and oxacillin-sensitive staphylococci. *J Clin Microbiol.* 1998;36(9):2640-4.
- 122-** Skulnick M, Simor AE, Gregson D et al. Evaluation of commercial and standard methodology for determination of oxacillin susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 1992;30(8):1985-8.
- 123-** Frebourg NB, Nouet D, Lemée L, Martin E, Lemeland JF. Comparison of ATB staph, rapid ATB staph, Vitek, and E-test methods for detection of oxacillin heteroresistance in staphylococci possessing *mecA*. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(1):52-7.
- 124-** Kuwahara-Arai K, Kondo N, Hori S, Tateda-Suzuki E, Hiramatsu K. Suppression of methicillin resistance in a *mecA*-containing pre-methicillin-resistant

- Staphylococcus aureus* strain is caused by the *mecI*-mediated repression of PBP 2' production. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(12):2680-5.
- 125- Weller TM. The distribution of *mecA*, *mecRI* and *mecI* and sequence analysis of *mecI* and the *mec* promoter region in staphylococci expressing resistance to methicillin. *J Antimicrob Chemother.* 1999;43(1):15-22.
  - 126- Lewis RA, Dyke KG. MecI represses synthesis from the beta-lactamase operon of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 2000;45(2):139-44.
  - 127- Suzuki E, Kuwahara-Arai K, Richardson JF, Hiramatsu K. Distribution of *mec* regulator genes in methicillin-resistant *Staphylococcus* clinical strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 1993;37(6):1219-26.
  - 128- 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):2191-96.
  - 129- Fujita S, 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.
  - 130- Grisold AJ, Kessler HH. Use of hybridization probes in a real-time PCR assay on the LightCycler for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Methods Mol Biol.* 2006;345:79-89.
  - 131- Palka-Santini M, Pützfeld S, Cleven BE, Krönke M, Krut O. Rapid identification, virulence analysis and resistance profiling of *Staphylococcus aureus* by gene segment-based DNA microarrays: application to blood culture post-processing. *J Microbiol Methods.* 2007;68(3):468-77.
  - 132- Paule SM, Pasquariello AC, Thomson RB Jr, Kaul KL, Peterson LR. Real-time PCR can rapidly detect methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from positive blood culture bottles. *Am J Clin Pathol.* 2005;124(3):404-7.
  - 133- Sabet NS, Subramaniam G, Navaratnam P, Sekaran SD. Simultaneous species identification and detection of methicillin resistance in staphylococci using triplex real-time PCR assay. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006;56(1):13-8.
  - 134- Thomas LC, Gidding HF, Ginn AN, Olma T, Iredell J. Development of a real-time *Staphylococcus aureus* and MRSA (SAM-) PCR for routine blood culture. *J Microbiol Methods.* 2007;68(2):296-302.
  - 135- Zhang K, Sparling J, Chow BL et al. New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol.* 2004;42(11):4947-55.

- 136-** Cosgrove SE. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Clin Infect Dis.* 2006;15(42 Suppl 2):S82-9.
- 137-** Spanu T, Sanguinetti M, D’Inzeo T et al. Identification of methicillin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci responsible for bloodstream infections with the Phoenix™ system. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2004;48:221-27.
- 138-** Archer GL, Pennell E. Detection of methicillin resistance in stafilococci by using a DNA probe. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990;34:1720-4.
- 139-** Bekkaoui F, McNevin JP, Leung CH, Peterson GJ, Patel A, Bhatt RS, Bryan RN. Rapid detection of *mecA* gene in methicillin resistant staphylococci using a colorimetric cycling probe technology. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1999;34:83-90.
- 140-** Cloney L, Marlowe C, Wong A, Chow R, Bryan R. Rapid detection of *mecA* in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* using cycling probe technology. 1999;13:191-7.
- 141-** Carrol KC, Borek AP, Burger C et al. Evaluation of the BD Phoenix automated microbiology system for identification and antimicrobial susceptibility testing of staphylococci and enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 2006;44(6):2072-7.