

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KİSTİK FİBROZİS HASTALARININ
SOLUNUM YOLU ÖRNEKLERİNDE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS KÜÇÜK KOLONİ
VARYANTLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Server YAĞCI

UZMANLIK TEZİ
OLARAK HAZIRLANMIŞTIR

Ankara
2008

T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KİSTİK FİBROZİS HASTALARININ
SOLUNUM YOLU ÖRNEKLERİNDE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS KÜÇÜK KOLONİ
VARYANTLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Server YAĞCI

UZMANLIK TEZİ

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. A. Gülşen HASÇELİK**

Ankara
2008

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleŐmesinde emeği geçen başta Prof. Dr. GölŐen Hasçelik olmak üzere Prof. Dr. Burçin Őener, Doç. Dr Banu Sancak, Doç. Dr. Mutlu Hayran ve Dr. Belgin Altun'a, öğrenim hayatım süresince katkıları ile her zaman yanımda olan anabilim dalımızın tüm değerli hocalarına, bugünlere gelmemde büyük emekleri olan sevgili aileme ve bana daima destek olan eŐime içtenlikle teşekkür ederim.

Bu tez Hacettepe Üniversitesi AraŐtırma Fonu tarafından desteklenmiŐtir.

Proje no: 06 D03 101 007

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	iv
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. TARİHÇE	3
2.2. EPİDEMİYOLOJİ	5
2.3. METABOLİZMA	6
2.4. ELEKTRON TRANSPORTU YETERSİZ KKV	8
2.5. TİMİDİN BİYOSENTEZİ YETERSİZ KKV	9
2.6. PATOGENEZ	11
2.7. VİRULANS ÖZELLİKLERİ.....	12
2.8. KLİNİK ÖZELLİKLER	13
2.9. KİSTİK FİBROZİS HASTALARINDA KKV	14
2.10. LABORATUVAR TANISI	15
2.11. TEDAVİ	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. OLGULAR	20
3.2. ÖRNEKLER	20
3.3. ÖRNEKLERİN ALINMASI	20
3.4 MİKROBİYOLOJİK İNCELEME.....	20
3.4.1. Direkt yayma.....	20
3.4.2. Kültür	21
3.4.3. Kültürlerin değerlendirilmesi	23
3.5. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ	24
3.6. OKZOTROFİZMİN ARAŞTIRILMASI	25
3.7.1. MOLEKÜLER MİKROBİYOLOJİK TANI.....	25
3.7.1. DNA izolasyonu	25

3.7.2. DNA Amplifikasyonu	27
3.7.3. PCR Reaksiyonu	27
3.7.4. Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Kontrolü ve Görüntülenmesi	28
3.8. 'PULSED FIELD JEL ELEKTROFOREZİ' (PFGE)	29
3.8.1. PFGE solüsyonlarının hazırlanışı	29
3.8.2. DNA izolasyonu için agaroz disklerin hazırlanışı	32
3.8.3. DNA'nın restriksiyon endonükleaz ile kesimi	33
3.8.4. Boyama ve bant seyirlerinin değerlendirilmesi	34
3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	34
4. BULGULAR	35
4.1. HASTALARIN ÖZELLİKLERİ	35
4.2. <i>S. aureus</i> KKV PREVALANSI.....	35
4.3. <i>S. aureus</i> KKV İZOLE EDİLEN BESİYERLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI.....	37
4.4. <i>S. aureus</i> KKV'NİN FENOTİPİK ÖZELLİKLERİ.....	37
4.5. <i>S. aureus</i> KKV'NİN MİKROSKOBİK DEĞERLENDİRMESİ	38
4.6. <i>S. aureus</i> KKV'NİN DİĞER ÖZELLİKLERİ	40
4.7. <i>S. aureus</i> KKV'NİN OKZOTROFİZM ÖZELLİKLERİ	41
4.8. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK SONUÇLARI	42
4.9. PFGE SONUÇLARI.....	43
4.10. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK SONUÇLARI	44
4.11. PFGE SONUÇLARI	46
5. TARTIŞMA	51
6. ÖZET	63
7. SUMMARY	65
8. KAYNAKLAR.....	67

KISALTMALAR

KF	:	Kistik fibrozis
KKV	:	Küçük koloni varyantları
MRSA	:	Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
PBP2a	:	Penisilin-bağlayan-protein-2a
AIDS	:	"Acquired Immunodeficiency Syndrome"
ATP	:	Adenozintrifosfat
ADP	:	Adenozindifosfat
$\Delta\Psi$:	Hücre zarı potansiyeli
<i>hemB</i>	:	Hemin biyosentezinde görevli gen bölgesi
dTMP	:	Deoksitimidin monofosfat
dUMP	:	Deoksiurasil monofosfat
<i>thyA</i>	:	Timidilat sentazı kodlayan gen bölgesi
<i>clfA</i>	:	"Clumping factor A"
<i>fnb</i>	:	"Fibronectin-binding protein"
SAID	:	<i>S. aureus</i> ID agar
BKIA-% 5 NaCl	:	% 5 sodyum klorürlü beyin-kalp infüzyon agarı
OFBBL	:	Polimiksin, Basitrasin, Laktoz eklenmiş Oksidasyon- Fermentasyon besiyeri
VIA	:	Vankomisin, İmipenem, Amfoterisin-B'li besiyeri
MSA	:	Mannitol tuzlu agar
SXT	:	Trimetoprim-sülfametoksazol
MİK	:	Minimum inhibe edici konsantrasyon
EDTA	:	Etilendiamin-tetra-asetik asit
TE	:	Tris-EDTA
PCR	:	Polimeraz Zincirleme Tepkimesi
RT-PCR	:	Gerçek zamanlı PCR
PFGE	:	'Pulsed Field' Jel Elektroforezi

TABLolar DİZİNİ

	<u>Sayfa No:</u>
Tablo 1: Değerlendirilen hastaların yaş dağılımı	35
Tablo 2: <i>S. aureus</i> KKV saptanan hastaların yaş dağılımı	36
Tablo 3: <i>S. aureus</i> KKV'nın izole edildikleri besiyerleri	37
Tablo 4: Normal fenotipik görünümdeki <i>S. aureus</i> ve <i>S. aureus</i> KKV'nın MİK sonuçları.....	38
Tablo 5: Normal fenotipik görünümdeki <i>S. aureus</i> ve <i>S. aureus</i> KKV'nın antibiyotik duyarlılıkları	45
Tablo 6: <i>S. aureus</i> KKV saptanan hastaların KKV ve eş zamanlı olarak izole edilen <i>S. aureus</i> suşlarının genotipik olarak karşılaştırılması ve antibiyotik duyarlılıkları.....	46
Tablo 7: <i>S. aureus</i> KKV saptanan hastaların KKV ve eş zamanlı olarak izole edilen <i>S. aureus</i> suşlarının genotipik olarak karşılaştırılması ve antibiyotik duyarlılıkları (D: Dirençli, I: orta derecede duyarlı, H: Hassas).	48

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

- Şekil 1:** *S. aureus* KKV fenotipi ile elektron transportu arasındaki ilişki 10
- Şekil 2:** Mannitol-tuzlu agarda normal fenotipte *S. aureus* ve *S. aureus* KKV 39
- Şekil 3:** 48 saatlik inkübasyon sonrasında %5 sodyum klorürlü beyin-kalp infüzyon agarında normal fenotipte *S. aureus* ve *S. aureus* KKV..... 39
- Şekil 4:** Tek koloni pasajları sonrası Columbia agarda *S. aureus* KKV "iğne ucu" koloni ve "sahanda yumurta" şeklinde *S. aureus* KKV 40
- Şekil 5:** *S. aureus* KKV'nin pigment özellikleri 41
- Şekil 6:** *S. aureus* KKV'nin mikroskopik incelemesinde normal *S. aureus*'a göre daha büyük gram pozitif pleomorfik koklar 42
- Şekil 7:** PCR sonrası amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeldeki görünüşleri..... 43
- Şekil 8:** Mueller-Hinton agarda timidin bağımlı KKV 44
- Şekil9:** PFGE sonrası suşların oluşturdukları bant seyirleri ... 47

1. GİRİŞ

Stafilokoklara bağlı hastalıkların ilk kez 1880'de Ogston tarafından tanımlanmasının üzerinden 100 yıldan daha uzun bir süre geçmiş olmasına rağmen, *Staphylococcus aureus* önemli bir patojen olma özelliğini sürdürmektedir. *S. aureus* deri, yumuşak doku, solunum sistemi, kemik, eklem ve endovasküler sistemlerde en önemli hastalık etkenleri arasında yer almaktadır [1]. Toplumdan kazanılmış ve hastane kaynaklı *S. aureus* enfeksiyonlarının görülme sıklığı yıllar içerisinde sürekli artış göstermektedir [2].

S. aureus'un bir alttipi olan küçük koloni varyantları (KKV), ilk kez yaklaşık 100 yıl önce tanımlanmıştır [3]. Yapılan çalışmalarda bu varyantların yavaş ürediği, küçük, pigmentsiz, hemoliz yapmayan koloniler oluşturdukları ve *S. aureus* ile karşılaştırıldığında atipik bazı özellikler gösterdikleri belirlenmiştir. Bu bakterilerin en belirgin özelliği normal fenotip gösteren bakterinin onda biri büyüklüğünde koloniler oluşturmasıdır. Bugün klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında KKV'nın, yavaş üreme göstermeleri nedeniyle saptanamayabildikleri ve buna bağlı olarak tanıda zorluklarla karşılaşıldığı gösterilmiştir [2].

S. aureus küçük koloni varyantları (KKV), enfeksiyon bölgesinden direkt izole edilebildikleri gibi, aminoglikozidler, beta-laktam antibiyotikler [4] ve trimetoprim-sülfametoksazol (SXT) [5] etkisi altında da *in vitro* veya *in vivo* koşullar altında saptanabilmektedirler.

Klinik örneklerden *S. aureus* KKV'nın izolasyon oranının farklı çalışmalarda %1 ile %30 arasında değiştii gösterilmiştir [6]. Yapılan bir çalışmada, genel mikrobiyoloji laboratuvarında izole

edilen 1100 suştan yaklaşık %1'i *S. aureus* KKV olarak saptanmıştır [7]. Bu bakterinin, özellikle solunum yollarının inflamasyonu ve ağır bronkopulmoner enfeksiyonlar ile seyreden ve mikroflorada *Pseudomonas aeruginosa* ve *S. aureus*'un bulunduğu kistik fibrozis (KF) tanısı almış hasta grubunda [8] görülme oranının yüksek olduğu belirlenmiştir. Kistik fibrozisli 72 hastanın balgam örneklerinin incelendiği bir çalışmada, 72 hastadan 52'sinde (%72,2) *S. aureus* ile kolonizasyon saptanmış ve bu 52 hastadan 24'ünde (%46) KKV izole edildiği gösterilmiştir [9].

Bu çalışmada Hacettepe Üniversitesi Pediatrik Göğüs Hastalıkları bölümüne başvuran KF hastalarından alınan balgam ve boğaz sürüntüsü örnekleri prospektif olarak incelenerek, bu hasta grubundaki *S. aureus* KKV'nin sıklığının saptanması, *S. aureus* KKV izole edilen hastaların klinik örneklerinin mikroskopik olarak incelenmesi, kültürde üreyen *S. aureus* KKV'nin diğer bakteriler ile birlikteliği, bu suşların izole edildikleri besiyerlerindeki fenotipik özelliklerinin belirlenmesi ve bu bakterilerin antimikrobiyal direnç patternlerinin incelenmesi hedeflenmiştir. Aynı zamanda KKV suşları ile eş zamanlı izole edilen normal fenotipteki *S. aureus* bakterilerinin genotipik yönden karşılaştırılması ve genetik yakınlıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

S. aureus küçük koloni varyantları (KKV), yavaş üreme göstermeleri nedeniyle normal fenotip gösteren *S. aureus* suşlarına göre daha küçük, pigmentsiz, hemolizsiz koloniler oluşturmaktadırlar [2]. KKV'nın menadion ve hemin okzotrofları oldukları ve bu maddelerin varlığında ve/veya CO₂ ilave edilmesi durumunda normal koloni formuna dönüştükleri gösterilmiştir [4]. Bu suşlar koloni morfolojilerinin farklılığı nedeniyle laboratuvar incelemelerinde normal flora üyesi zannedilerek, kolayca gözden kaçabilmektedirler. KKV, düşük düzeyde ekzotoksin üretmeleri nedeniyle bağışıklık sisteminden ve bazı antibiyotiklerden korunarak konak hücre içerisinde saklanabilmekte ve uzun süre canlı kalabilmektedirler [10].

2.1. TARİHÇE

Bakteriyel küçük koloni varyantları (KKV) ilk kez 1910 yılında *Eberthella typhosa* (yeni adı *Salmonella enterica* serovar Typhi, *S. Typhi*) 'nın atipik (olağan dışı) bir şekli olarak tanımlanmıştır [11]. İlk tanımlandıkları zamandan günümüze dek KKV *S. aureus*, metisiline dirençli *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus capitis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Salmonella* serovarıları, *Vibrio cholerae*, *Shigella* türleri, *Brucella melitensis*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus acidophilus*, *Serratia marcescens* ve *Neisseria gonorrhoeae*'yı da içermek üzere çok çeşitli bakteri cins ve türlerinde tarif edilmiştir. Bunun yanısıra apse, kan, eklem, kemik, solunum yolu ve yumuşak doku gibi klinik örneklerden de pek çok cins ve türden KKV izole edilmiş, ancak en kapsamlı çalışmalar stafilokoklar ile yapılmıştır [6].

S. aureus KKV, 1930'lu yıllarda yapılan ilk çalışmalarda cüce koloniler veya G-formları olarak tanımlanmıştır [12]. G-formlarının bakteri yaşam döngüsünün doğal bir parçası oldukları görüşüne rağmen, daha ileri çalışmalar bu varyantların zorlu metabolik gereksinimlerinin olduğunu ve G fenotipinin kolayca büyük koloni şekline geri döndüğünü göstermiştir [13]. Bunu takip eden yıllarda ise karbonhidrat kullanım kısıtlılığı olan, fermentasyonu ve solunumu azalmış, düşük ATP düzeyine ve azalmış sitokrom aktivitesine sahip farklı fenotiplerde KKV bildirilmiştir [14].

1990'ların ortalarından itibaren, *S. aureus* KKV ile persistan ve tekrarlayan enfeksiyonlar arasında bir bağlantı olduğu anlaşılmıştır [4, 8, 15-17]. *S. aureus* KKV'nın fenotipik özelliklerindeki ve elektron transport sistemindeki birçok değişikliğin bu enfeksiyonların klinik bulguları ile ilişkili olduğu 1995'de bildirilmiştir [4]. Daha ileri çalışmalar KKV'nın okzotrof olduğunu ve menadion, hemin ve/veya CO₂ ilavesi ile normal koloni şekillerine geri döndüğünü göstermiştir [4]. Bu çalışmanın ardından *S. aureus* KKV ve koagülaz negatif stafilokoklarla ilgili çalışmalar artmış ve pek çok olgu ve özellikle kronik osteomyelit ve kistik fibrozis hastalarında prospektif çalışmalar yapılmaya başlanmıştır [9, 18-28].

Bilinen ilk klonal olarak farklı *S. aureus* KKV'nı içeren *S. aureus* 'un farklı fenotip ve genotiplerine bağlı persistan ve antibiyotik dirençli deri enfeksiyonu olgusu 1999'da tanımlanmıştır. Bu olgunun 39 yaşında bir Darier hastası olduğu, derinin sürekli kötüye gitmesi nedeniyle hastanın hastaneye birkaç kez yattığı ve deriden *S. aureus* KKV izole edildiği gösterilmiştir [22].

Genetik olarak tanımlanmış KKV'nın konak dokularında sürekliliğini gösteren ilk hayvan modeli 2003 yılında ortaya konmuştur [29]. Yine KKV'da metabolik yollarda meydana gelen

değişikliklerle ilgili ilk ayrıntılı çalışma 2003 yılında bir *hem* mutantında gerçekleştirilmiştir [30].

2.2. EPİDEMİYOLOJİ

Klinik örneklerdeki *S. aureus* KKV oranı farklı çalışmalarda %1 ile %30 arasında değişmektedir [6]. Yapılan bir çalışmada mikrobiyoloji laboratuvarındaki 1100 suştan yaklaşık %1'i *S. aureus* KKV olarak bulunmuştur [7]. Osteomyelit tanısı alan hastaların kemik dokusu örneklerinden ve derin doku aspiratlarından *S. aureus*'un izole edildiği bir çalışmada, hastaların %29'unda (4/14) *S. aureus* KKV saptanmıştır. Bu çalışmada KKV'nın nadir olmadığı ancak izole edilmelerinin oldukça güç olduğu belirtilmiştir [17].

S. aureus KKV'nın, kistik fibrozis (KF) olgularının solunum yolu örneklerinde görülme oranının yüksek olduğu saptanmıştır. KF hastalarında *S. aureus*'un prevalansını inceleyen prospektif bir çalışmada hastaların %72,2'sinin *S. aureus* ile enfekte olduğu, bunların %46'sında *S. aureus* KKV bulunduğu belirlenmiştir [9].

Toplam 252 KF hastasının *S. aureus* KKV varlığı açısından araştırıldığı diğer bir çalışmada, 120 *S. aureus* taşıyıcısı arasında 20 olgunun KKV taşıdığı (prevalans oranı %17) saptanmıştır. KKV taşıyıcıları arasında, 15 hastada KKV ile birlikte normal fenotipte *S. aureus* bulunurken, 5 hastada KKV tek başına belirlenmiştir [5].

Kistik fibrozis hastalarındaki *S. aureus* prevalansını ve MRSA kolonizasyonunu araştıran çok merkezli başka bir çalışmada, 627 hastanın 275'inden (%44) (merkezler arasındaki oranlar %20-%72 arasında değişmek üzere) *S. aureus* izole edilmiştir. KKV kolonizasyon oranı %4 olarak bulunmuş, ancak bunların çoğu KKV araştırmasının yapıldığı iki merkezdeki hastalardan izole edilmiştir [31].

S. aureus KKV'na bağlı enfeksiyonlarda cinsiyet ile ilgili bir özellik bulunmamaktadır. Kalça protezi ile ilişkili beş enfeksiyon olgusunun incelendiği bir çalışmada hastaların ortalama yaşı 62,2 olarak saptanmıştır [32]. *S. aureus* KKV'nın KF hastalarındaki prevalansının ve klinik öneminin incelendiği başka bir çalışmada ise, *S. aureus* KKV pozitifliğinin daha ileri yaşlardaki hastalarda görüldüğü belirtilmiştir [5].

S. aureus KKV'na bağlı enfeksiyonu olan hastalar arasında ırk, mevsim ya da bölge açısından anlamlı bir farkın olduğuna dair herhangi bir veri bulunmamaktadır.

2.3. METABOLİZMA

S. aureus'da bakteriyel elektron transport sistemindeki aksamaların sebep olduğu birçok fenotipik değişikliğin, klinik küçük koloni varyantı suşlarının fenotipik özellikleri ile benzerlik gösterdiği bildirilmiştir [10].

KKV'nda karbonhidrat kullanımında azalma ve virulans faktörlerinin üretiminde genel bir düşüş bulunmaktadır [33]. *S. aureus*'da hem glikoliz, hem de solunumda *E. coli*'de bulunana benzer metabolik yollar kullanılmaktadır [34].

S. aureus'da menakinon ve prostetik grup olan hem, elektronların transferi için gereklidir [35]. Menakinon FADH₂ veya NADH oksidaz kompleksinden elektronları alan moleküller dizisi içerisinde ilk elektron alıcısıdır. Hem, menakinondan elektronları alan sitokromların parçasıdır. Menakinon ve hem, *men* ve *hem* operonlarının kodladığı çeşitli enzimler kullanılarak sentezlenmektedirler [36]. Bu operonların gen ürünleri, tRNA^{glu} ve aromatik bileşenlerin prekürsörlerini, menakinon ve heme uyan ürünlere çeviren bir dizi reaksiyonu katalize etmektedirler [33].

KKV için tipik olan fenotipik değişikliklerin elektron transportundaki bir aksama ile ilişkili olabileceği belirtilmektedir

(Şekil 1). KKV'nın küçük koloni boyutunun, hücre duvarında yer alan teikoik asidin biyosentezinin azalmasına bağlı olabileceği öne sürülmektedir. Teikoik asit ve fosfatidil gliserol prekürsörlerinin sentezleri için elektron transportu gerekmektedir [37-39]. Ayrıca ATP, amino asit ve karbonhidratların hücreye alınması, hücre duvar biyosentezi ve nükleik asitlerin yapım ve onarımını içeren pek çok hücre fonksiyon için gereklidir. Bu nedenle, düşük ATP üretimi kapasitesi büyümeyi yavaşlatmakta ve bakteride küçük kolonilerin yapımı ile sonuçlanmaktadır. Elektron transportu karotenoid pigment oluşumu ve glukoz ve fruktoz dışı karbonhidratların kullanımı ile doğrudan bağlantılı bulunmuştur [10].

Menadion ve hemin ilavesi ile klinik suşlarda ve laboratuvarında üretilen bir *hemB* mutantında küçük koloni varyantı fenotipinin tamamen geriye döndürüldüğü gösterilmiştir [3, 40, 41]. Hem üretimindeki eksiklik, elektron transportunda kullanılan sitokromların sentezini engellemektedir. Porfirin biyosentezini kontrol eden genlerdeki mutasyonlar, hemin veya sitokromlar içerisine katılmış hemin prekürsörlerinin verilmesi ile geri döndürülebilmektedir [42]. Yapılan çalışmalarda saptanan ilginç bir bulgu ise, anaerobik koşullarda görülen üremenin de *S. aureus* KKV fenotipine benzemesidir. Bunun sebebi anaerobik koşullarda menakinonun sentezlenememesidir [3, 4].

Bakteriyel metabolizmada meydana gelen birçok değişikliğin bakterinin yavaş üremesine yol açmasına rağmen, klinik örneklerden izole edilen KKV'nda sınırlı sayıda metabolik yetersizlik bulunmuştur. Bunlar iki grup olarak incelenebilir: Elektron transportunda yetersizlik olan KKV ve timidin biyosentezinde yetersizlik olan KKV.

2.4. ELEKTRON TRANSPORTU YETERSİZ KKV

Elektron transportunda yetersizlik bulunan KKV'nın menadion ve hemin biyosentezi yetersizdir. Bu fenotip menadion ve hemin eklenmesi ile geri döndürülebilir. Tipik *S. aureus* KKV fenotipinin diğer özellikleri; azalmış solunum, pigmentasyonda ve hemolitik aktivitede azalma, azalmış koagülaz aktivitesi, aminoglikozidlere karşı artmış direnç ve değişken koloni fenotipi olarak sıralanabilir [4]. Tiamin menadion biyosentezi için gerekli olduğundan, tiamin gereksinimi olan KKV, menadion gereksinimi olanların bir alttipidir [6].

Aminoglikozid duyarlılığındaki azalmayı incelemek üzere yapılan bir çalışmada, klinik örneklerden izole edilmiş KKV suşları ve bunlara uyan ana suşlarda aminoglikozidlerin hücre içine alınımını kolaylaştırdığı bilinen hücre zarı potansiyeli ($\Delta\Psi$) 'nde düşüş saptanmış ve bunun nedeni araştırılmıştır. Glukoz içeren besiyerinde üretilen KKV başlangıçta ana suşa benzer $\Delta\Psi$ (-120 ila -140 mV) 'ne sahip iken ortamdaki glukoz kullanıldıktan sonra $\Delta\Psi$, -60 mV'a düşmüştür. $\Delta\Psi$, ana suşta da düşüş göstermesine rağmen Krebs döngüsü metabolizmasının kurulması ile hemen düzelmiştir. Ancak KKV Krebs döngüsünü etkinleştiremediğinden [30], $\Delta\Psi$ 'nin eski haline dönmesi KKV'da mümkün olmamıştır. Bu nedenle KKV'nın aminoglikozidlere duyarlılığı ana suşun onda biri ile onüçte biri kadar bulunmuştur [43, 44]. Benzer sonuçlar stafilokoklara karşı etkinlik gösterebilmek için $\Delta\Psi$ gereksinimi gösteren katyonik peptidlerde de saptanmıştır. Bu durum konak hücrelerinde yer alan katyonik peptidlerin KKV'nın fenotipini korumasına yardım ediyor olabileceği fikrini akla getirmektedir [45]. *S. aureus* KKV'nın, hücre duvarı üzerinden etki gösteren antibiyotiklere karşı daha dirençli olduğu bulunmuştur. Örneğin, bu suşların yavaş üremeleri ve dolayısıyla azalmış hücre duvarı

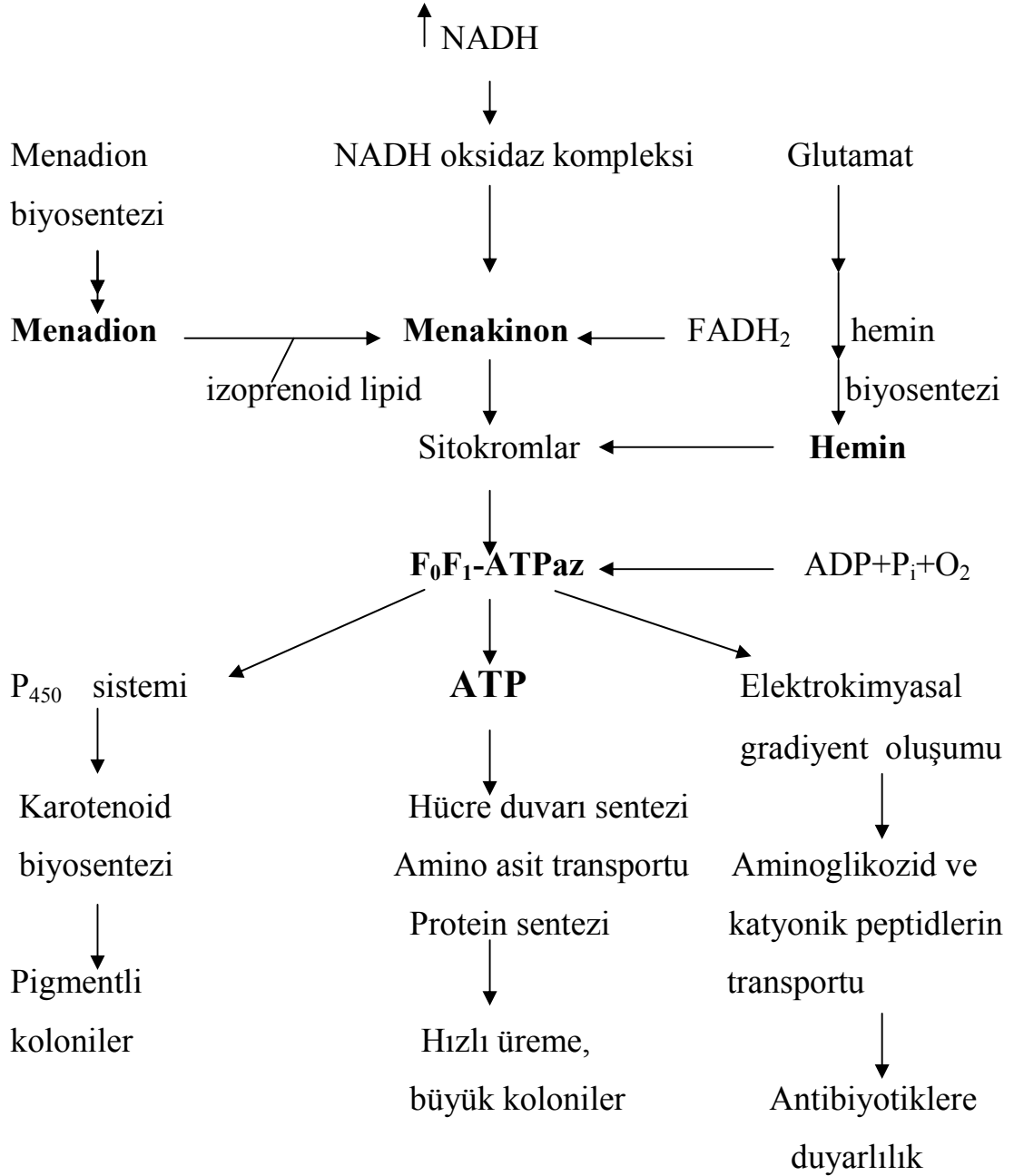
bölünmesi göstermeleri nedeniyle bu suşlara karşı β -laktam antibiyotiklerin etkinliğinde azalma görülmektedir [13, 46].

2.5. TİMİDİN BİYOSENTEZİ YETERSİZ KKV

Yapılan bir çalışmada, kistik fibrozis hastalarının solunum yolu örneklerinden izole edilen KKV'nın incelenmesi sonucunda 176 KKV'nın 122'sinin timidin-bağımlı olduğu gösterilmiştir. Bu hastalarda enfeksiyonları baskılamak amacıyla uygulanan uzun süreli trimetoprim-sülfametoksazol (SXT) tedavisi sonucunda aynı hastada SXT'ye duyarlı olan ana suşların tersine SXT'ye dirençli timidin-bağımlı KKV ortaya çıkmıştır [8, 9]. SXT tetrahidrofolik asit yolağını engellemektedir. Tetrahidrofolik asit dTMP'den dUMP sentezlenmesini katalize eden timidilat sentazın ko-enzimidir [47]. Tipik KKV'na neden olan timidin-okzotrofik klinik suşlarının, *thyA* (timidilat sentaz geni) ile tamamlanabildiği bulunmuştur [48]. Ayrıca timidin-bağımlı KKV'nda timidinin hücre içine alınmasını yavaşlatan başka bir mutasyonun da (*nupC*) bulunabileceğinden şüphelenilmektedir (Şekil 1). Küçük koloni varyantları pulmoner sekresyonlardan doku ve hücreler içerisine girdiğinde timidin konsantrasyonu KKV fenotipinin sürdürülmesine olanak sağlayacak şekilde düşük bulunmaktadır. Eğer ortamda fazla miktarda timidin mevcut ise, KKV, 'wild' tip *S. aureus*'a benzer şekilde üremektedir [8].

Global virulans regülatörleri *agr* ve *sarA*, alternatif stres regülatörü *sigB* ve *hla* ve *spa* gibi bağımlı virülans genlerinin 'northern-blot' veya RT-PCR ile transkripsiyonel analizi sonucu, *S. aureus*'un izogenik normal suşları ile karşılaştırıldığında timidin-bağımlı KKV'larında bu genlerin ekspresyonunda azalma görülmektedir. Düzenleyici ve virulans genlerinin ekspresyonundaki değişiklikler timidin-bağımlı KKV'larını daha az virulan hale getirerek bu suşların, KF hastalarının solunum yollarının ortamı

içerisinde hayatta kalmalarına olanak vermektedir. Bu durum bakterinin, böyle bir ortamda uzun süre kalması sonucu ortam koşullarına adaptasyonunu göstermektedir [49].



Şekil 1: *S. aureus* KKV fenotipi ile elektron transportu arasındaki ilişki (6 nolu kaynaktan uyarlanmıştır).

2.6. PATOGENEZ

S. aureus KKV'nın hücre içinde yaşayabilme özelliği stafilokoklara bağlı gelişen hastalıkların patogenezinin anlaşılmasında yeni bir bakış açısı sağlamıştır. KKV, bağışıklık sisteminden ve bazı antibiyotiklerden korunarak konak hücre içerisinde saklanabilme yetenekleri ile hayatta kalabilmektedirler [10].

S. aureus fibroblastlar ve endotel hücreleri tarafından fagosite edilmektedir [41]. Hızlı üreyen 'wild' tip *S. aureus*, memeli hücrelerini hızla eriten α -toksin salgılayarak kolayca hücre dışına çıkabilmektedir [50]. Buna karşılık *S. aureus* KKV, daha az miktarda α -toksin ürettiklerinden konak hücre tarafından alınmalarına rağmen, fagositler içerisinde kalmaya devam etmektedirler [51]. Bu hücre içinde kalabilme özelliği, KKV'nın antibiyotiklerle karşılaşmalarını azaltmakta ve konak savunmasından kaçmalarını sağlamaktadır [3]. KKV'nın yavaş üreme özelliği de genellikle hızlı üreyen bakterilere karşı aktif olan hücre duvarı üzerinden etkili antibiyotiklerin etkinliğini azaltmaktadır [52]. KKV çoğu kez stabil olmadıkları için [52], konak hücre içerisinde saklanabilmektedirler. Bu durumda konak bağışık yanıtı azalır, antibiyotik tedavisi bittiği anda virulansları artmakta ve hızlı üreyen şekle dönüşerek konak hücreyi parçalamaktadırlar. Yani, konak hücre KKV için bir Truva atı haline gelmektedir [10].

Yapılan bir çalışmada *hemB* mutanlığı *S. aureus* suşunun, 'wild' tipe göre daha fazla fibrinojen ve fibronektine bağlanabildiği ve bunun bakteri yüzeyindeki adezin ekspresyonunun artışı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca *hemB* mutanlığında 'wild' tipe göre, pıhtılaşma faktörü A "clumping factor A" (*clfA*) ve fibronektin bağlayan protein "fibronectin-binding protein" (*fnb*) genlerinin ekspresyonunun daha yüksek olduğu gösterilmiştir [53].

2.7. VİRULANS ÖZELLİKLERİ

Letal doz ve fatalite oranlarının saptanması amacıyla hayvan modelleri kullanılarak yapılan çeşitli çalışmalar, *S. aureus* KKV'nın 'wild' tip suşlardan daha az virulan olabileceğini göstermektedir [12, 44, 54-56]. Virulanstaki bu belirgin azalmaya rağmen KKV'nın hayvan modellerinde ve insandaki enfeksiyonlarda 'wild' tip suşlar kadar persistan enfeksiyonlara neden olabileceği belirtilmektedir [29, 55-57].

Küçük koloni varyantlarının virulansını belirlemek amacıyla, *hemB* mutanı ve 'wild' tip suş septik artritli fare modelinde çalışılmıştır [58]. *HemB* mutanı ile intravenöz yoldan inoküle edilen farelerde, 'wild' tip suş verilen farelerden daha sık ve daha ağır artrit olduğu saptanmıştır. Buna rağmen mutant suş inoküle edilmiş olan fare, 'wild' tip suş inoküle edilmiş olanla karşılaştırıldığında, böbrek ve eklemlerde önemli oranda daha düşük bakteri yüküne sahip olduğu görülmüştür. Bu çalışmada *in vitro* koşullarda *hemB* mutantının 'wild' tip suştan yaklaşık 20 kat daha fazla proteaz enzimi ürettiği saptanmıştır. Bu yüzden *hemB* mutantının 'wild' tip suşa göre daha virulan olduğu sonucuna varılmıştır [58].

Enfektivite ve antibiyotik cevabı profillerini araştırmak üzere, *hemB* mutanı, *menD* mutanı ve 'wild' tip suş (*S. aureus* 8325-4) tavşan endokardit modelinde karşılaştırılmış, KKV'nın *in vivo* olarak birçok dokuda kolonize olabileceği ve *menD* mutantının dalak ve böbrek dokularında antibiyotik tedavisine direnç gösterdiği saptanmıştır [29].

Küçük koloni varyantı (KKV) fenotipinin oluşumu her zaman her hasta için olumsuz bir durumu ifade etmemektedir. Bu suşlar düşük ekzotoksin üretmeleri nedeniyle hızlı üreyen stafilokoklardan daha az doku hasarına neden olmaktadır. Hızlı üreyen 'wild' tip bakteri suşuyla meydana gelen septik ölümlerle karşılaştırıldığında,

daha az virulan olan KKV'na bağlı enfeksiyonlar, kronik ancak daha hafif bir klinik seyir göstermektedir [10].

2.8. KLİNİK ÖZELLİKLER

S. aureus küçük koloni varyantları (KKV) persistan ve tekrarlayan enfeksiyonlara neden olmaktadır. *S. aureus* KKV'na bağlı nadir görülen persistan ve/veya antibiyotik dirençli enfeksiyonu olan beş hasta ilk defa 1995'de tanımlanmıştır. Bu hastalardan izole edilen suşların daha ileri incelemeler ile menadion ve hemin okzotrofları olduğu ve bu maddelerin varlığında ve/veya CO₂ ilavesi ile normal koloni şekillerine geri döndükleri gösterilmiştir [4].

S.aureus KKV'nın sebep olduğu persistan kalp pili ile ilişkili kan dolaşımı ve ventriküloperitoneal şant enfeksiyonu olguları rapor edilmiştir. Bu olgularda uzamış antimikrobiyal tedaviye rağmen klinik ve mikrobiyolojik yanıtın zayıf olduğu görülmüştür. [23, 27].

Hemin-okzotrofik KKV'nın deri enfeksiyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Yapılan bir çalışmada 28 aylık bir süre içerisinde derinin etkilenen değişik alanlarından ve burundan olmak üzere 53 farklı klinik örnekten izole edilen 119 *S.aureus* suşunun fenotipik tanımlamaları yapılmıştır. Bunun sonucunda normal fenotipteki farklı *S.aureus* suşları ile birlikte KKV'nın da deri enfeksiyonu ile ilişkisi olduğu gösterilmiş ve hücre içinde yer alan *S. aureus* KKV'nın konak savunması ve antibiyotik tedavisinden korunarak bu hastalarda uzamış deri enfeksiyonuna neden olabileceği düşünülmüştür [59].

Yapılan başka bir çalışmada bir AIDS hastasında, MRSA KKV'na bağlı osteomyelit ve kan dolaşımı enfeksiyonunun geliştiği ve klinik tablonun ölümlle sonuçlandığı bildirilmiştir [16].

2001 yılında yapılan bir çalışmada yoğun bakım ünitesinde ilk metisiline dirençli *S.aureus*(MRSA) KKV salgını bildirilmiştir. Onbir

aylık bir dönemi içeren bu retrospektif çalışmada, daha önceden tanımlanmış dokuz MRSA KKV ilişkili sepsis olgusu, MRSA KKV dışı enfeksiyon olguları ile karşılaştırılmıştır. Gerek genel mortalite (%100'e karşılık %50, $P < 0.05$), gerekse yoğun bakım ünitesinde saptanan mortalite (%71,5'e karşılık %12,5, $P < 0.05$) açısından KKV ile enfekte hastaların mortalite oranları daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca, KKV ile enfekte hasta grubunda kontrol grubuna kıyasla daha fazla antimikrobiyal ilaç kullanılmıştır (%85,7'ye karşılık %62.5). Sonuç olarak MRSA KKV enfeksiyonlarının kliniği, KKV dışı MRSA enfeksiyonlarına göre daha şiddetli seyretmekte ve daha yüksek mortaliteye yol açmaktadır [60].

2.9. KİSTİK FİBROZİS HASTALARINDA KKV

Kistik fibrozis (KF) hastalarında özellikle çocuk ve gençlerde olmak üzere sıklıkla *S. aureus* ile kolonizasyon görülmektedir [8].

Proctor ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, KF hastalarının %25'inde, *S. aureus* ile kolonize KF hastalarının ise %50'sinde *S. aureus* KKV saptanmıştır. Çalışılan gruptaki hastalarda uzun süreli aminoglikozid kullanımı dikkati çekmiştir [10]. Kistik fibrozis hastalarında yapılan çalışmalarda timidin-bağımlı KKV'nın özellikle uzun süreli trimetoprim-sülfometakzasol (SXT) tedavisi sonrası ortaya çıktığı gösterilmiştir [8, 9, 61]. DNA sentezinde dTMP gerekli olması nedeniyle, SXT'ye duyarlı *S. aureus* suşları SXT tedavisi ile inhibe olmaktadır. Timidin-bağımlı KKV, SXT'nin inhibe ettiği sentez basamağından etkilenmeden, hücre dışı timidini alarak SXT tedavisine rağmen canlılığını sürdürebilmektedirler. Bu yüzden timidin-bağımlı KKV'nın hayatta kalmaları ekzojen timidin varlığına bağlıdır. Timidin, KF hastalarının solunum sekresyonlarında, ölü hücrelerin (DNA salan ve ardından *S. aureus* DNazı tarafından sindirilen) varlığı nedeniyle bol miktarda bulunmaktadır [6].

Kistik fibrozis hastalarındaki *S. aureus* prevalans ve persistansının incelendiği 6 yıllık prospektif bir çalışmada, 72 hastanın 52'sinin (%72,2) ortalama 37 ay (6-70 ay) boyunca 'wild' tip ve KKV *S. aureus* ile kolonize ya da enfekte olduğu görülmüştür [9]. Yirmisekiz hastada sadece 'wild' tip *S.aureus* fenotipi, 22 hastada izogenik normal ve/veya *S. aureus* KKV ve 2 hastada da sadece KKV saptanmıştır. Başlangıçta hem normal, hem KKV *S. aureus* izole edilen 6 hastada, normal suşlar kaybolmuş, KKV ise uzunca bir süre saptanmaya devam etmiştir. KKV fenotipi normal fenotip ile karşılaştırıldığında, enfeksiyonun daha uzun süre devam etmesi, KKV'nin solunum yollarındaki ortamı en iyi şekilde kullanarak bu ortama adapte olmasına bağlanmıştır [9].

S. aureus KKV fenotipi prevalansını araştırmak için yapılan oniki aylık prospektif bir çalışmada, 252 kistik fibrozis tanısı almış hastanın kültür sonuçları ile klinik bulguları arasındaki ilişki araştırılmış, *S. aureus* taşıyıcıları arasındaki *S. aureus* KKV fenotipi prevalans oranı %17 (%95 güven aralığında %10-25) olarak belirlenmiştir. KKV suşlarında altta yatan okzotrofizm incelendiğinde ise timidin bağımlı olanların çoğunlukta (%63; n=15) olduğu dikkati çekmiştir. KKV fenotipindeki *S. aureus* suşları, normal fenotiptekilere kıyasla önemli oranda daha yüksek antibiyotik direnci göstermiştir. KKV pozitif olan hastaların normal fenotipte *S. aureus* taşıyan hastalara kıyasla daha ileri yaşta (P= 0,0099) oldukları görülmüştür. Yine bu hastalarda *P.aeruginosa* kolonizasyonun daha yüksek (P= 0.0454) olduğu ve azalmış zorlu ekspirasyon hacmi gibi daha ileri hastalık belirtilerinin (P= 0.0148) görüldüğü saptanmıştır [5].

2.10. LABORATUVAR TANISI

S. aureus küçük koloni varyantları (KKV) nın olağandışı morfolojik ve fizyolojik özellikleri klinik mikrobiyologlara izolasyon

ve tanımlama açısından sorun oluşturmaktadır [10, 62]. Bu nedenle laboratuvara hasta ile ilgili ön bilginin verilmesi, bu bakterilerin izolasyon şansını artırmaktadır. *S. aureus* KKV özellikle uzun hastalısız dönemleri olan KF hastalarında, nadir görülen persistan enfeksiyonu olanlarda ve aminoglikozid ve trimetoprim-sülfometaksazolü sürekli kullanan hastalardan izole edildiğinden, KKV olasılığının akla getirilmesi ve uygun besiyeri, uygun inkübasyon süresi kullanılarak laboratuvar incelemesinin KKV üzerine yoğunlaştırılması gerekmektedir [10].

S. aureus küçük koloni varyantları (KKV), normal stafilokok fenotipinin tersine katı besiyerinde küçük koloniler oluşturmakta ve sıvı besiyerinde yavaş üreme özelliği göstermektedirler. Bu bakterilerde pigment oluşumu ve hemolitik aktivite ('wild' tip *S. aureus*'daki %89'a karşılık %0.25) azalmıştır [40]. Timidin-bağımlı KKV, küçük kabarık pigmentli merkezi çevreleyen yarı şeffaf kenarları ile 'sahanda yumurta' şeklinde görülen KKV ve normal *S. aureus* kolonilerinin yaklaşık onda biri büyüklüğündeki 'iğne ucu' koloniler olmak üzere iki tip koloni oluşturmaktadırlar. Timidin-bağımlı KKV'nın Gram boyaması ile yapılan mikroskopik incelemesinde, pleomorfik koklar, elektron mikroskobu incelemesinde ise bozulan hücre bölünmesini işaret eden tamamlanmamış veya çoklu çapraz duvarlara sahip genişlemiş koklar görülmektedir [63]. Bunlara çok benzer hücre duvarı değişiklikleri, hemin-okzotrofik KKV'nda da bulunmaktadır. Tüm fenotipik değişiklikler ortama timidin ilavesi ile geri dönebilmektedir.

Atipik koloni morfolojisinin yanı sıra, bu suşlarda, tipik olarak mannitol tuzlu agarda mannitol fermentasyonu negatif sonuç elde edilmesi gibi biyokimyasal reaksiyonlarda da bir azalma ya da eksiklik görülmektedir [59].

KKV'nın laboratuvar izolasyonunda başlıca yapılması gereken, genişletilmiş konvansiyonel kültür ve tanımlama tekniklerinin uygulanmasıdır. Son yıllarda, *S. aureus* türleri ve KKV fenotipinin saptanması için en doğru ve hızlı yöntemin, örneklerin Columbia kanlı agara ve kromojenik *S. aureus* ID agara (bioMérieux SAID) ekilmesi olduğu gösterilmiştir [64]. Ekim yapılan plakların mutlaka 35°C'de aerobik ortamda 24-48 saat inkübasyonu gerekmektedir. Buradan elde edilen suşları tanımlamak amacıyla, koyun kanlı Columbia agar ve Schaedler agar plaklarına eş zamanlı olmak üzere pasajları yapılmakta, Columbia kanlı agar plağı aerobik ortamda, Schaedler agar plağı ise %5-10 CO₂'li ortamda 35°C'de 24 saat inkübe edilmektedir. Ertesi gün *S. aureus* şüphesi olan kolonilerin boyut, pigmentasyon ve hemoliz özellikleri, Columbia kanlı agar ve Schaedler agar plaklarındaki üremeleri karşılaştırmalı olarak incelenmektedir. Columbia kanlı agardaki *S. aureus* küçük koloni varyantı fenotipindeki koloniler, hemin ve menadiona gereksinimleri olduğundan daha küçük koloni oluşturmakta, bu substratları içeren Schaedler agar plaklarında ise daha büyük, normal fenotipte *S. aureus* olarak üremektedirler. Her iki besiyerinde de *S. aureus* KKV olarak şüphelenilen kolonilerden yapılan Gram boyama, katalaz ve koagülaz testleri ile *S. aureus* tanısı konulmaktadır. *S. aureus* KKV'nın koagülaz aktivitesi azalmış olduğundan, tüpte koagülaz testi ancak 18 saatten uzun inkübasyon sonrasında pozitifleşebilmektedir [10, 62]. Doğru pozitif sonuç elde edilmesi için ise 24 saat inkübasyon gerekmektedir. Ayrıca günümüzde *S. aureus* tanısının doğrulanması için lateks aglütinasyonu yöntemi de kullanılabilir. *S. aureus* KKV olarak şüphelenilen ve yanlış negatif koagülaz testi verebilen suşların, *nuc* ve *coa* gibi türe özgül genler açısından değerlendirilerek doğrulanması gerekmektedir [65].

S. aureus küçük koloni varyantlarının hemin, menadion ve timidine olan gereksinimlerinin araştırılması ile suşların bu maddelerden hangisine okzotrofizm gösterdiği belirlenebilmektedir.

Atipik klinik mikrobiyolojik özellikleri nedeniyle, *S. aureus* KKV'nın tanımlamasında olduğu gibi antibiyotik duyarlılık testlerinde de zorluklar yaşanmaktadır. KKV klinik örneklerde sıklıkla normal *S. aureus* ile karışık olarak bulunmaktadır. Bu bakteriler besiyerinde az miktarda bulunduğundan normal üreyen mikroorganizmalar hızla KKV'nın yerini almakta ve bu nedenle KKV'nın antibiyotik duyarlılık testlerinin değerlendirilmesinde problem yaşanmaktadır [64]. Ayrıca KKV'nın yavaş üreme özelliğinden dolayı, antibiyotik duyarlılık testlerinin standardizasyonu zorlaşmakta ve yavaş üreme, difüzyon testlerini ve duyarlılık saptama zamanını etkilemektedir. Ayrıca, okzotrofizme bakmaksızın oksasiline direnç gösteren varyantlarda, disk-difüzyon, E-test, mikrodilüsyon ve otomatize duyarlılık test sistemlerinde ve bunun yanısıra anti-penisilin-bağlayan-protein-2a (PBP2a) lateks aglütinasyon testinde hatalı sonuçlar elde edilebilmektedir. Sonuç olarak, KKV suşlarında metisilin direncinin kesin olarak belirlenmesi için *mecA* geninin moleküler yöntemlerle saptanması veya anti-PBP2a lateks aglütinasyon testinin kullanılması önerilmektedir. Anti-PBP2a lateks aglütinasyon testinin uygulanması durumunda daha fazla sayıda (100–200 KKV kolonisi ile yaklaşık olarak bir öze dolusu) bakterinin kullanılması ve inkübasyon süresinin 72 saate kadar uzatılması gerektiği vurgulanmaktadır [64, 66].

Çeşitli çalışmalarda KKV'nın aminoglikozid grubu antibiyotiklere daha dirençli olduğu ve buna bağlı olarak *in vitro* koşullarda bu bakterilerin gentamisin veya diğer aminoglikozidlere maruz bırakılmış normal *S.aureus* kültürlerinden sürekli ve hızla izole edilebilecekleri gösterilmiştir [3, 4, 43, 45, 55].

KKV'nın konaktan uzaklaştıktan sonra stabil kalamamaları ve yavaş üreme özelliklerine sahip olmaları nedeniyle *in vitro* duyarlılık çalışmalarında disk difüzyon ya da otomatize sistemlerin kullanılmaması, minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ölçümlerinin sıvı ya da agar dilusyon yöntemleri ile yapılması önerilmektedir [10].

2.11. TEDAVİ

Günümüzde *S.aureus* KKV'na bağlı enfeksiyonların tedavisi için belirlenmiş bir şema bulunmamaktadır. *İn vitro* koşullarda, okzotrofinin geri dönmesi nedeniyle, bu mikroorganizmaların antibiyotiklere daha duyarlı hale geldiği düşünülmektedir. Menadion okzotroflarının izole edildiği durumlarda, bu geri dönüşüm hastalara K vitamini uygulanması ile kolaylıkla başarılabilmektedir. Ancak bunun yararının yapılacak klinik çalışmalarla kanıtlanması gerektiği belirtilmektedir [52]. KKV'nın hücre içinde bulunduğu doku kültürü sistemlerinde trimetoprim-sülfometaksazol ile rifampin kombinasyonunun en etkin tedavi rejimi olduğu saptanmıştır [10]. *S. aureus* KKV'na bağlı prostetik damar içi cihazla ilişkili enfeksiyonların tedavisinde ise yabancı cismin vücuttan uzaklaştırılması gerektiği vurgulanmaktadır [64]. *S. aureus* KKV enfeksiyonlarının en etkin tedavisinin belirlenebilmesi için *in vitro* ve *in vivo* karşılaştırmalı çalışmalara gereksinim bulunmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. OLGULAR

Çalışmaya Şubat 2007- Ocak 2008 tarihleri arasında, Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Göğüs Hastalıkları Ünitesine başvuran ve servislerde yatırılarak izlenen, kistik fibrozis tanılı hastalar alınmıştır.

3.2. ÖRNEKLER

Çalışmada 248 hastadan alınan toplam 519 balgam ve boğaz sürüntüsü örneği değerlendirilmiştir. Olguların tümünün adı, soyadı, cinsiyeti, yaşı, protokol ve dosya numaraları, alınan örneğin tarihi ve cinsi kaydedilmiştir. Örneklerinde *S. aureus* KKV pozitif olarak saptanan olguların dosyaları incelenerek, aldıkları antimikrobiyal tedavi öyküsü değerlendirilmiştir.

3.3. ÖRNEKLERİN ALINMASI

Balgam örnekleri, steril bir kap içerisinde, en kısa sürede ekim yapılmak üzere laboratuvara ulaştırılmıştır [67]. Steril eküvyon ile posterior farenksten alınan boğaz sürüntü örnekleri ise Stuart taşıyıcı besiyeri içinde laboratuvara gönderilmiştir.

3.4 MİKROBİYOLOJİK İNCELEME

3.4.1. Direkt yayma

Alınan tüm örneklerden direkt yayma hazırlanarak Gram boyama yöntemi ile boyanmış, mikroskop altında 100'lük büyütmede incelenmiş, epitel, polimorfonükleer lökosit ve hücre içi ve/veya hakim mikroorganizma varlığı açısından değerlendirilmiştir.

3.4.2. Kültür

Balgam örneklerinin kültürü kantitatif yöntemle yapılmıştır. Bu amaçla koyu kıvamlı balgam homojenize edilmiştir. Homojenizasyon için mukolitik bir ajan olan sputolizin(di-thio-threitol, Sigma) 0,002mg, 10 ml'lik falkon tüp içerisine konmuş, üzerine 9 ml distile su eklenerek 10 ml'ye tamamlanmıştır. Her bir örnek 1/1 oranında sputolizin-distile su karışımı ile sulandırılıp vortekslendikten sonra 15 dakika 35-37 C°'de bekletilip tekrar vortekslenerek ekim için hazırlanmıştır [68].

Boğaz sürüntü örnekleri ise homojenize edilmeden direk olarak ekilmiştir.

Çalışmada kullanılan besiyerleri, içerikleri, firma isimleri ve ülkeleri aşağıda belirtilmiştir:

1. Columbia agar:
 - Columbia agar bazı (Becton, Dickinson and Company, ABD)
 - %5 koyun kanı (45-50°C'de eklenmiştir).
2. Mannitol-tuzlu agar (Becton, Dickinson and Company, ABD)
3. Basitrasinli çikolata agar:
 - Kanlı agar bazı (Fluka, ABD)
 - Basitrasin (Sigma, ABD) 700 U/ml
 - %10 koyun kanı (70-80°C'de eklenmiştir).
4. Eozin Metilen Mavis (EMB) agar (Becton, Dickinson and Company, ABD)
5. *S. aureus* KKV için %5 sodyum klorürlü beyin-kalp infüzyon agarı (BKIA-%5 NaCl) :
 - Beyin-kalp infüzyon agar bazı (Oxoid Ltd, Basingstoke, Hampshire, İngiltere)
 - %5 sodyum klorür (Merck, Almanya)

6. *Burkholderia cepacia* için Polimiksin, Basitrasin, Laktoz eklenmiş Oksidasyon-Fermentasyon (OFPBL) besiyeri:

- Oksidasyon-Fermentasyon (OF) besiyeri bazı (Merck, Almanya) 95 gr/lt
- Polimiksin (Koçak İlaç, Türkiye) 300000 U/lt
- Basitrasin (Sigma, ABD) 200 U/lt
- Laktoz (Becton, Dickinson and Company, ABD) 10 gr/lt

7. *Stenotrophomonas* için Vankomisin, İmipenem, Amfoterisin-B'li (VIA) besiyeri:

- Triptikaz soy agar (Acumedia, ABD) 30 gr/lt
- Mannitol (Becton, Dickinson and Company, ABD) 10 gr/lt
- Bromtimol mavisi (Becton, Dickinson and Company, ABD) 0,06gr/lt
- Vankomisin (Cheil Jedang, Kore) 5 mg/lt
- İmipenem (Merck Sharp & Dohme, Almanya) 32 mg/lt
- Amfoterisin-B (Biomeks İlaç, Türkiye) 25 mg/lt

8. Mantarlar için Sabouroud Dekstroz agar (Becton, Dickinson and Company, ABD)

Alınan tüm örneklerden Columbia agar, mannitol-tuzlu agar, basitrasinli çikolata agar, EMB agar, Sabouroud Dekstroz agar, BKIA-%5 NaCl, *Burkholderia cepacia* için OFPBL besiyeri ve *Stenotrophomonas* için VIA besiyerlerine 10'ar µl ekim yapılmıştır. Columbia kanlı agar plaklarında gram negatif bakterilerin üremesini baskılamak amacıyla ilk ekim alanına aztreonam diski (Becton, Dickinson and Company, ABD) konulmuştur [69].

Ekim yapıldıktan sonra basitrasinli çikolata agar mumlu kavanozda, BKIA-%5 NaCl anaerob kavanozda, diğerleri aerobik ortamda olmak üzere besiyerleri, 35 C°'de 24-48 saat inkübe edilmiştir.

3.4.3. Kùltùrlerin değerlendirilmesi

Columbia kanlı agar ve mannitol tuzlu agar (MSA) plaklarındaki üremeler 24 ve 48 saatlik inkübasyon sonrası birlikte değerlendirilmiştir. Columbia kanlı agarda büyük, düzgün, beyaz veya sarı pigmentli ve genellikle hemoliz yapmış kolonilerle birlikte mannitol tuzlu agarda mannitol fermentasyonu nedeniyle besiyerini turuncudan sarı renge dönüştüren sarı renkli büyük kolonilerin olması *S. aureus* şüpheli olarak tanımlanmıştır.

Columbia kanlı agarda çok küçük (iğne ucu), pigment yapmayan, hemoliz oluşturmayan üremelere paralel olarak mannitol tuzlu agarda da besiyerini sarı renge dönüştürsün ya da dönüştürmesin sarı veya pembe renkli ancak özellikle boyut olarak küçük koloniler [10], Columbia kanlı agarda, küçük, yüzeyden kabarık, pigmentli merkezi çevreleyen yarı şeffaf kenarları ile 'sahanda yumurta' şeklinde görülen koloniler de *S. aureus* KKV açısından şüpheli olarak değerlendirilmiştir [63]. Ayrıca BKIA-%5 NaCl plağındaki 48 saatlik inkübasyon sonrası, boyut olarak küçük koloniler de *S. aureus* KKV açısından şüpheli olarak değerlendirmeye alınmıştır.

S. aureus KKV şüphesi olması durumunda, bu kolonilerden Columbia kanlı agar ve Schaedler agar (Becton, Dickinson and Company, ABD) plaklarına eş zamanlı olmak üzere tek koloni pasajları yapılmıştır. Columbia kanlı agar plağı aerobik ortamda, Schaedler agar plağı ise mumlu kavanozda 35 C°'de 24 saat inkübe edilmiştir. Ertesi gün *S. aureus* KKV şüphesi olan kolonilerin boyut, pigmentasyon ve hemoliz özellikleri, Columbia kanlı agar ve Schaedler agar plaklarında karşılaştırmalı olarak incelenmiştir. Columbia kanlı agarda çok küçük, pigment yapmayan, hemoliz oluşturmayan kolonilerin Schaedler agarda normal büyüklükte, hemolizli ve pigmentli olarak gözlenmesi *S. aureus* KKV açısından anlamlı olarak değerlendirilmiştir.

S. aureus KKV olarak şüphelenilen kolonilerden Gram boyama yöntemi ile boyama yapılarak gram pozitif kok oldukları doğrulanmıştır. *S. aureus* tanımlaması için bu kolonilerden katalaz ve tüpte koagülaz testleri uygulanmıştır. *S. aureus* KKV için, tüpte koagülaz testi 35C°'de 24 saat inkübasyon sonrası değerlendirilmiştir. *S. aureus* KKV suşlarının tümünde doğrulama için *S. aureus* lateks aglütinasyon testi (Slidex Staph Plus, bioMerieux, Fransa) uygulanmıştır.

S. aureus KKV'ları ve normal fenotipik görünümde izole edilmiş *S. aureus* suşları doğrulama testlerinin ardından ileri moleküler çalışmalar için %15 gliserol içeren BKI sıvı besiyeri içerisinde -20C° ve -80C°'de stoklanmıştır.

3.5. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ

Normal fenotipik görünümdeki *S. aureus* suşları için CLSI standartlarına göre ve *S. aureus* KKV için CLSI standartlarından uyarlama yapılarak, antibiyotik duyarlılıkları oksasilin, gentamisin, vankomisin, siprofloksasin, linezolid ve tigesiklin için sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Trimetoprim-sülfometakzasol için MİK değerleri E-test (AB Biodisk, İsveç) yöntemi kullanılarak saptanmıştır. *S. aureus* KKV zor üreyen mikroorganizmalar oldukları için BKI sıvı besiyeri kullanılmıştır [8].

Duyarlılık testi yapılacak olan suşlar stok besiyerinden alınarak Columbia kanlı agar besiyerine ekimleri yapılmış, 35 C°'de 24 saat inkübasyon sonrası saf halde elde edilen koloniler antibiyotik duyarlılık testleri için kullanılmıştır. Bakteriler BKI sıvı besiyeri içerisinde 0,5 MacFarland bulanığa ayarlandıktan sonra sıvı mikrodilüsyon ya da E-test yöntemi uygulanmıştır. E-test yönteminde *S. aureus* için Mueller-Hinton agar, *S. aureus* KKV için ise %5 koyun kanlı Mueller-Hinton agar kullanılmıştır [8].

3.6. OKZOTROFİZMİN ARAŞTIRILMASI

S. aureus olduğu konfirme edilen suşların hemin ve/veya menadion ve/veya timidine olan gereksinimlerinin saptanması amacıyla Mueller-Hinton agarı (MHA) yaygın ekim yapılarak okzotrofizm durumları araştırılmıştır.

Okzotrofizm için kullanılan diskler aşağıdaki şekilde hazırlanmıştır.

- Hemin (5,4 µg) diskleri (Sigma, ABD)
- Timidin (1,5 µg) diskleri:
 - Timidin (Sigma, ABD) 100µg/ml
 - Her disk başına 15µl emdirilmiştir.
- Menadion (1,5 µg) diskleri:
 - Menadion sodyum bisülfid (Sigma, ABD) 100 µg/ml
 - Her disk başına 15µl emdirilmiştir.
- Hazırlanan diskler kullanılabildiği kadar +4⁰C’de tutulmuştur.

Diskler ekim yapılan MHA üzerine yerleştirildikten sonra 35 C⁰’de 24 saat inkübasyon sonrasında değerlendirilmiştir. Besiyerinin diğer yerlerinde üreme olmazken disk etrafında normal üreme zonunun gözlenmesi suşun diskin içerdiği maddeye (hemin, menadion ve timidin) gereksinimi olduğu şeklinde değerlendirilmiştir [8].

3.7. MOLEKÜLER MİKROBİYOLOJİK TANI

İzolatların *S. aureus* oldukları, PCR yöntemi kullanılarak *nuc* A gen bölgesinin çoğaltılması ile moleküler olarak doğrulanmıştır.

3.7.1. DNA izolasyonu

Bakteri DNA’sının izolasyonunda stafilokoklar için tanımlanmış olan hızlı lizis protokolü modifiye edilerek kullanılmıştır [70].

1. İzole edilen suşlar, %5 koyun kanlı Columbia agara ekilerek 24 saat inkübe edilmiştir. *S. aureus* kolonilerinden bir tanesi alınarak öze yardımıyla BKI sıvı besiyerine ekimi yapılarak 35° C de 24 saat inkübe edilmiştir.
2. İnkübasyon sonrasında bakteri süspansiyonları, 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiş ve bakterilerin çökmesi sağlanarak üst sıvı uzaklaştırılmıştır.
3. Çöken bakterilerin üzerine 1 ml TE (10 mM Tris (Applichem, Almanya), 1 mM etilendiamin-tetra-asetik asit (EDTA) (Applichem, Almanya), pH= 8.0) tamponu ilave edilerek steril koşullarda ependorf tüplere aktarılmıştır.
4. Tüpler daha sonra 12000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir.
5. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra kalan bakteri çökeltisi üzerine 100µg/ml'lik stoktan 50 µl lizostafin (Sigma, ABD) eklenip 10 dakika 37°C de bekletilmiştir.
6. Bu süspansiyonun üzerine 100 µg/ml'lik stoktan 50 µl proteinaz K (AppliChem, Almanya) eklenerek 10 dakika daha 37° C de bekletilmiştir.
7. Buradan alınan tüpler kaynamakta olan su içerisinde 5 dakika bekletilmiştir.
8. Tüpler daha sonra 14000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvı pellete dokunulmadan, yeni bir eppendorf tüpe aktarılarak -20° C de saklanmıştır.

Hazırlanan bakteri DNA süspansiyonunun 1 µl'si 50 µl PCR karışımı içinde amplifikasyona alınmıştır.

TE tamponunun hazırlanması:

- 1 M Tris pH 8
 - Trizma Baz (Sigma, ABD) 121,1 gr
 - Distile su 1000 ml

HCl eklenerek pH 8'e ayarlanmıştır. İyice çözüldükten sonra otoklavlanmış ve oda ısısında saklanmıştır.

- 0,5 M EDTA pH 8:
 - EDTA (Applichem, Almanya) 186,1 gr
 - Distile su 1000 ml

Önce 800 ml distile su eklenerek, pH ayarlandıktan sonra 1000 ml'ye tamamlanmıştır (pH 8 için yaklaşık 20 gr NaOH eklenmiştir). Sonra otoklavlanarak, oda ısısında saklanmıştır.

- 1 X TE (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8) :
 - 1 M Tris pH 7,5 10 ml
 - 0,5 M EDTA pH 8 2 ml

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Otoklavlandıktan sonra oda ısısında saklanmıştır.

3.7.2. DNA Amplifikasyonu

S. aureus suşlarının DNA amplifikasyonunda, Brakstad ve arkadaşları tarafından tanımlanmış olan PCR protokolü modifiye edilerek kullanılmıştır [70]. Nükleaz A enzimini kodlayan ve *nuc A* gen bölgesinde (447bç) yer alan 21 ve 24 bazçiftlik (bç) primerlerin baz dizilimi sırasıyla NUCAR-5' GCG ATT GAT GGT GAT ACG GTT 3' (48-70) ve NUCAF-5' AGC CAA GCC TTG ACG AAC TAA AGC 3' (303-328) olarak belirlenmiştir [71]. Primerler ticari olarak elde edilmiştir (Alpha DNA, Kanada).

3.7.3. PCR Reaksiyonu:

- PCR Karışımı
 - Genomik DNA 1 µl
 - 10x PCR Tamponu (MgCl₂) 5 µl
 - 2.5 mM dNTP (dATP,dCTP,dTTP,dGTP) 4 µl

- NUCA Forward primer (100 pmol/ μ l) 1 μ l
- NUCA Reverse primer (100 pmol/ μ l) 1 μ l
- Taq DNA Polimeraz (5 U/ μ l) 0.25 μ l
- Steril distile su 37.75 μ l
- Toplam Hacim 50 μ l
- 10x PCR Tamponu
 - 10mM Tris-HCl (pH 8.3)
 - 50mM KCl
 - 9.0 mM MgCl₂

DNA amplifikasyonu "thermal cycler" (Thermo Scientific, ABD) cihazında gerçekleştirilmiştir.

Sıcaklık döngüleri aşağıda belirtilen şekilde ayarlanmıştır:

1. Ayrılma (Denaturation) 94° C de 1 dakika
2. Ayrılma (Denaturation) 94° C de 1 dakika
3. Bağlanma (Annealing) 58° C de 30 saniye
4. Polimerizasyon (Extension) 72° C de 1.5 dakika
5. 2, 3 ve 4. basamağın 37 kez tekrarlanması
6. Polimerizasyon (Extension) 72° C de 3.5 dakika 1 döngü

3.7.4. Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrezisi ile Kontrolü ve Görüntülenmesi:

%1'lik agaroz (Onbio, Kanada), 1xTBE (pH 7.8) tamponu içerisinde kaynatılarak çözülmüştür. Jel yatay elektroforez tankına dökülmeden hemen önce 10 mg/ml'lik etidyum bromürden 5 μ l eklenerek boyanmıştır. Oda sıcaklığında polimerizasyon işlemi tamamlandıktan sonra içerisinde 1xTBE yürütme tamponu olan yatay elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Elde edilen PCR ürünlerinin 12 μ l'si 1mg/ml Orange-G boyası içeren 4 μ l yükleme tamponu ile karıştırılarak kuyucuklara yüklenmiştir. Bir çukura standart DNA büyüklük işareti (Heliosis®, Metis Biyoteknoloji,

Türkiye) eklendikten sonra 90 volt/saat voltajda 3 saat yürütülmüş ve elektroforez sonlandırılmıştır. Daha sonra, jel görüntüleme sistemi (Kodak EDAS 290, Biolab) ile görüntülenip kaydedilmiştir.

- 10 X TBE tamponu (pH 7.8) :
 - Trizma Baz (Sigma, ABD) 108 gr
 - Borik Asit (Sigma, ABD) 55 gr
 - 0,5 M EDTA pH 8 (Sigma, ABD) 40 ml
 - Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır.
- Yükleme Tamponu (Metis Biyoteknoloji, Türkiye) :
 - Gliserol 55 ml
 - 1XTAE 45 ml
 - Orange-G 100 mg

3.8. 'PULSED FIELD' JEL ELEKTROFOREZİ (PFGE)

İzole edilen KKV suşları ile eş zamanlı olarak izole edilen normal *S. aureus* suşları arasındaki genetik yakınlık PFGE yöntemi ile araştırılmıştır.

Çalışma gününe kadar -80°C'de, %15 gliserol içeren BKI sıvı besiyeri içerisinde stoklanmış örneklerden ekim yapılarak elde edilen saf bakteri kolonilerinden, PFGE işlemi için DNA izolasyonu yapılmıştır. İzole edilen DNA'lar SmaI (Sigma, ABD) restriksiyon endonükleaz ile kesildikten sonra PFGE cihazında yürütülmüş ve daha sonra görüntüleri alınmıştır. Bu çalışmalar daha önceden Goering RV ve arkadaşları tarafından tanımlanan PFGE yöntemi modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir [72].

3.8.1. PFGE solüsyonlarının hazırlanışı:

- 1 M Tris pH 8:
 - Trizma Baz (Sigma, ABD) 121,1 gr
 - Distile su 1000 ml

İyice çözüldükten sonra otoklavlanarak, oda ısısında saklanmıştır.

- 0,5 M EDTA pH 8:
 - EDTA (Sigma, ABD) 186,1 gr
 - Distile su 1000 ml

Önce 800 ml distile su eklenerek pH ayarlandıktan sonra 1000 ml'ye tamamlanmıştır (pH 8 için yaklaşık 20 gr NaOH eklenmiştir). Sonra otoklavlanarak, oda ısısında saklanmıştır.

- PIV solüsyonu (10mM TRIS pH 8,0, 1 M NaCl) :
 - 1M Tris pH 8 5 ml
 - Sodyum klorür (Merck, Almanya) 29,2 gr
 - Distile su 500 ml

İyice çözüldükten sonra otoklavlanmış, oda ısısında saklanmıştır.

- EC solüsyonu:
 - 1M Tris pH 8 3 ml
 - Sodyum klorür (Merck, Almanya) 29,2 gr
 - 0,5 M EDTA pH 8 100 ml
 - Sodyum deoksikolat
(Carlo- Erba Reagenti, İtalya) 1 gr
 - Sodyum laurilsarkozin
(Carlo- Erba Reagenti, İtalya) 2,5 gr

Distile su ile 500 ml'ye tamamlanarak otoklavlanmış, oda ısısında saklanmıştır.

- EC lizis solüsyonu:
 - 10 mg/ml RNaz A (Vivantis, Malezya) 75 µl
 - 20 mg/ml Lizozim (Vivantis, Malezya) 75 µl

- 10 mg/ml Lizostafin (Sigma, ABD) 75 µl
- EC solüsyonu 12,75 ml

- ES solüsyonu:

- 0,5 M EDTA (pH 9) 100 ml
- %1 Sodyum laurilsarkozin
(Carlo- Erba Reagenti, İtalya) 1 gr

Otoklavlanarak oda ısısında saklanmıştır.

ESP solüsyonu kullanımdan hemen önce hazırlanmıştır. 1 mg/ml olacak şekilde Proteinaz K (Applichem, Almanya) eklenmiştir.

- 1 X TE (10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8) :

- 1 M Tris pH 7,5 10 ml
- 0,5 M EDTA pH 8 2 ml

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Otoklavlandıktan sonra oda ısısında saklanmıştır.

- 10 X TBE solüsyonu:

- Trizma Baz (Sigma, ABD) 108 gr
- Borik asit (Sigma, ABD) 55 gr
- 0,5 M EDTA pH 8 40 ml

İyice karıştırdıktan sonra distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmış, otoklavlanmış ve oda ısısında saklanmıştır.

- 0,5 X TBE yürütme tamponu:

- 10 X TBE 110 ml
- Distile su 2090 ml

- Yükleme tamponu:

- Bromfenol mavisi

(Becton, Dickinson and Company, ABD)	25 mg
○ 1 X TE	10 ml
○ Gliserol (Carlo- Erba Reagenti, İtalya)	10 ml

pH artışı için renk yeşilden maviye değişinceye kadar, 1N NaOH 'ten birkaç damla damlatılmıştır. Oda ısısında saklanmıştır.

3.8.2. DNA izolasyonu için agaroz disklerin hazırlanışı

PFGE'de bozulmamış DNA gerekli olduğundan, bu yöntemde DNA'nın hasar görmesini engellemek için bakteri agaroz diskler içine hapsedilmektedir.

1. Saf kültür halinde üreyen suşlardan birkaç koloni 5 ml BKI sıvı besiyeri içerisine ekilip, 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir.
2. İnkübasyondan sonra 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilerek üst sıvısı atılmıştır.
3. Pellet üzerine 1 ml PIV solüsyonu eklenerek sulandırılarak ependorf tüpe aktarılmıştır.
4. 14000 rpm de 10 dk santrifüj edilmiş ve üst sıvı atılmıştır.
5. Pellete 300 µl PIV solüsyonu eklenerek pipetaj ile karıştırılmıştır.
6. Bakteri başına 1 ml agaroz olacak şekilde, PIV solüsyonu içinde %2'lik düşük erime noktalı 'low-melting' agaroz (Sigma, ABD) hazırlanmıştır.
7. Agaroz ve bakteri süspansiyonu eşit oranda karıştırılarak süspanse edilmiştir.
8. Pipet yardımıyla karışım kalıplara dökülerek 'plug' adı verilen DNA blokları hazırlanmak üzere 10 dak. +4°C'de bekletilmiştir.

9. Katılaşan DNA blokları 1 ml EC lizis solüsyonu içeren 1,5 ml'lik konik santrifüj tüplerine konarak 37°C'de 1 gece inkübe edilmiştir.
10. İnkübasyondan sonra EC solüsyonu dökülerek 1 ml ESP solüsyonu eklenmiş ve 1 gece 56°C'de inkübe edilmiştir.
11. Ertesi gün, hazırlanan DNA blokları 1 X TE buffer içinde 100 rpm.'de 30 dk. alkalanarak yıkanmış ve TE boşaltılmıştır. Bu yıkama işlemi toplam 5 kez tekrarlanmıştır.
12. Yıkama iřleminden sonra DNA bloklarına 1 ml 1XTE tamponu eklenerek enzimle kesim yapıłana kadar 4°C'de bekletilmifitir.

3.8.3. DNA'nın restriksiyon endonükleaz ile kesimi

PFGE için SmaI restriksiyon enzimi kullanılmıştır. Her örnek için 20 ünite SmaI enzimi (Fermentas, Kanada) ve 43µl SmaI tamponu (33 mM Tris-asetat, pH 7,9; 10mM Mg (Oac) 21; 66mM KOAc; 0,5 mM dithiothreitol) (Fermentas, Kanada) kullanılarak karışım hazırlanmıştır. Bu karışım, DNA diskleri üzerine eklenerek 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakılmıştır.

PFGE tankına 0.5 X TBE (pH=8) tamponu konulmuştur. Bu tampon, yukarıda hazırlanışı verilen 10XTBE tamponundan 100 ml alındıktan sonra üzerine 1900 ml distile su eklenerek elde edilmiştir.

Hazırlanan DNA blokları ve Pulse marker 50 – 1,000 kb (Sigma, ABD) %1.1'lik yüksek erime noktalı agarozdaki (Sigma, ABD) kuyucuklara dikkatlice yerleştirilmifitir.

Yürütme işlemi aşağıda belirtilen koşullar altında yapılmıştır:

- Değişim aralıkları : 5.3 – 34.9 sn.
- Voltaj derecesi : 6 Volt/cm.
- Yürütme zamanı : 18 saat.

- Sıcaklık : 14°C.

3.8.4. Boyama ve bant seyirlerinin değerlendirilmesi

Jel, etidyum bromür çözeltisiyle (1µg/ml) 30 dak. boyandıktan sonra 30 dk. distile suda yıkanmıştır. Daha sonra 260 nm dalga boyunda UV ışık altında 'GelDoc' görüntüleme sistemi ile görüntülenmiş ve görüntülerin analizi 'Quantity One' (Bio-Rad, ABD) isimli yazılım ile yapılmıştır.

Aynı hastadan izole edilen farklı suşlar birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen bant seyirleri gözle Tenover kriterlerine göre değerlendirilmiştir [73]. Buna göre, büyüklükleri ve sayıları aynı olan bantların oluşturduğu seyirleri gösteren suşlar aynı tip olarak değerlendirilmiştir. Yedi veya daha fazla bantta farklılık gösteren seyirlere sahip olan suşlar değişik bir genotip olarak değerlendirilmiştir. Buna göre her hastanın suşları genotip 1, genotip 2, genotip 3, genotip 4 şeklinde gruplandırılmıştır.

3.9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Tanımlayıcı istatistikler, ortalama (standart sapma), ortanca (minimum, maksimum) veya yüzde oranlar olarak sunulmuştur.

Gruplar arası karşılaştırma (*S. aureus* KKV/normal fenotipik görünümdeki *S. aureus*), sayısal değişkenler için Mann-Whitney U, kategorik değişkenler için yerine göre Ki kare, Mantel Haenzel ya da Fisher kesin testleri kullanılarak yapılmıştır.

İstatistiksel anlamlılık sınırı 0,05 olarak kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. HASTALARIN ÖZELLİKLERİ

Çalışmada 248 kistik fibrozis hastasından 209'u (%40,3) balgam, 310'u (%59,7) boğaz sürüntüsü örneği olmak üzere toplam 519 klinik örnek incelemeye alınmıştır. Bu hastaların 119'u (%48) bayan, 129'u (%52) erkektir.

Hastaların 9,9 (1-58) olan yaş ortalaması bayanlarda 9,6 (1-37), erkeklerde ise 10,2 (1-58) olarak tespit edilmiştir. Değerlendirilen hastaların yaş dağılımı Tablo 1'de görülmektedir.

Tablo 1: Değerlendirilen hastaların yaş dağılımı

Yaş aralığı	Sayı
	n (%)
1,0 - 5,0	95 (38,3)
6,0 - 10,0	56 (22,6)
11,0 - 15,0	44 (17,7)
16,0 - 20,0	29 (11,7)
21,0 - 25,0	17 (6,9)
≥26,0	7 (2,8)
TOPLAM	248 (100,0)

4.2. *S. aureus* KKV PREVALANSI

Çalışmaya alınan 248 hastanın 123'ünde (%49,6) *S. aureus* saptanmış, bu hastaların 20'sinde (%8,1) ise *S. aureus* KKV belirlenmiştir. Hastalardan 13'ünde bir kez, ikisinde 2 kez, beşinde 3 kez *S. aureus* KKV üremesi olmuştur.

S. aureus KKV izole edilen hastaların 13'ü (%65) bayan, 7'si (%35) erkektir. Bu hastaların 14,4 (2-31) olan yaş ortalaması, bayanlarda 17,4 (5-31), erkeklerde ise 8,7 (2-16) olarak tespit edilmiştir. İzolasyonun en yüksek %25 ile 11-15 yaş aralığında olduğu belirlenmiştir (Tablo 2). *S. aureus* KKV izole edilen hastalar ile çalışmada değerlendirilen tüm hastalar yaş aralıklarına göre karşılaştırıldığında, *S. aureus* KKV izole edilen hastaların daha ileri yaşta oldukları saptanmıştır ($p:0.003$, Mann Whitney U).

Tablo 2: *S. aureus* KKV saptanan hastaların yaş dağılımı

Yaş aralığı	Sayı
	n (%)
1,0 - 5,0	3 (15,0)
6,0 - 10,0	4 (20,0)
11,0 - 15,0	5 (25,0)
16,0 - 20,0	3 (15,0)
21,0 - 25,0	4 (20,0)
≥26,0	1 (5,0)
TOPLAM	20 (100,0)

Çalışmaya alınan hastaların cinsiyetleri arasında fark gözlenmezken (B/E:%48/%52), *S. aureus* KKV saptanan hastalarda B/E oranının %65/%35'i olduğu belirlenmiştir ($p>0.05$).

İncelenen 519 örnekten 281'inde (%54,1) *S. aureus* üremesi olmuş, bu örneklerin 32'sinde (%6,4) *S. aureus* KKV saptanmıştır. *S. aureus* KKV pozitif olarak saptanan 32 örneğin 23'ü (%71,9) balgam, 9'u (%28,1) boğaz sürüntüsüdür.

S. aureus KKV pozitif olarak saptanan 32 örnek tek tek incelendiğinde 21 örnekte (%65,6) bir çeşit, 7 örnekte (%21,9) iki çeşit, üç örnekte (%9,4) üç çeşit ve bir örnekte (%3,1) 4 çeşit KKV

izole edilmiştir. Sonuç olarak 20 hastadan toplam 48 adet *S. aureus* KKV izole edilmiştir.

4.3. *S. aureus* KKV SAPTANAN HASTALARIN KLİNİK ÖRNEKLERİNİN MİKROSKOPİK DEĞERLENDİRMESİ

İncelenen 32 klinik örneğin 15'inde (%46,9) bol polimorfonükleer lökosit (PMNL), 9'unda (%28,1) orta PMNL, birinde (%3,1) az PMNL görülmüştür. Bu örneklerden 24'ünde (%75) hücre içi gram pozitif kok belirlenmiştir.

4.4. *S. aureus* KKV'NİN DİĞER BAKTERİLERLE BİRLİKTELİĞİ

İncelenen 32 klinik örneğin 30'unda (%93,8) *S. aureus* ile birlikte KKV ürerken, 15'inde (%46,9) *P. aeruginosa* ile birlikte ürediği saptanmıştır (Tablo 3). Üreyen *S. aureus* suşlarından yalnızca ikisinin MRSA olduğu belirlenmiştir.

Tablo 3: *S. aureus* KKV saptanan 32 örnekte üreyen diğer mikroorganizmalar

Mikroorganizma	n (%)
<i>S. aureus</i>	30 (93,8)
<i>P.aeruginosa</i>	15 (46,9)
<i>A. fumigatus</i>	2 (6,3)
<i>A. fumigatus</i> + <i>C. albicans</i>	1 (3,1)
<i>S. maltophilia</i>	1 (3,1)
<i>E. coli</i>	1 (3,1)

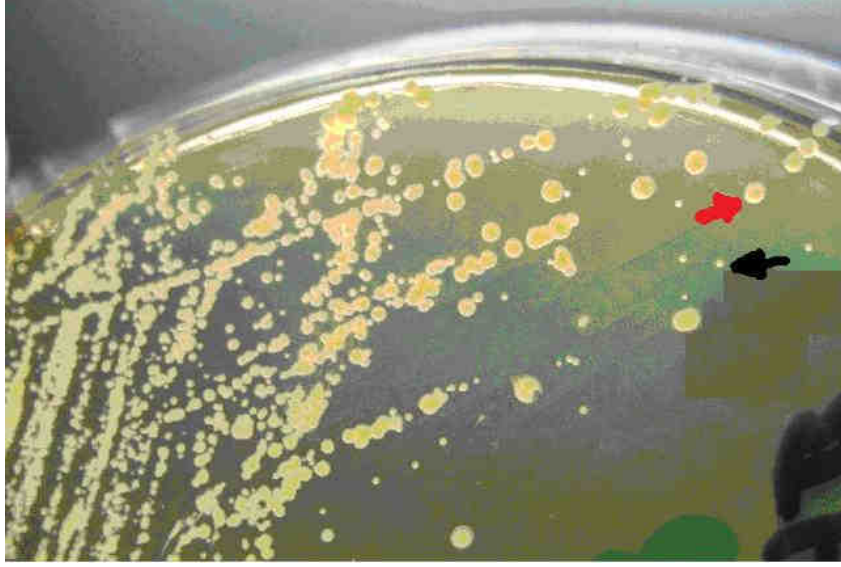
4.5. *S. aureus* KKV İZOLE EDİLEN BESİYERLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

S. aureus KKV'nın besiyerlerindeki 24 ve 48 saat inkübasyon sonundaki izolasyon oranları incelendiğinde, 28 suşun 24 saat inkübasyon sonunda, 20 suşun ise 48 saat inkübasyon süresi sonunda izole edildiği belirlenmiştir. *S. aureus* KKV'nın izole edildiği besiyerleri karşılaştırıldığında, en yüksek izolasyonun mannitol tuzlu agarda olduğu, bunu %5 sodyum klorürlü beyin-kalp infüzyon agar (BKIA-%5 NaCl) ın izlediği saptanmıştır (Tablo 4). Mannitol tuzlu agar ve BKIA-%5 NaCl'daki normal fenotipte *S. aureus* ve *S. aureus* KKV görüntüleri sırasıyla Şekil 2 ve Şekil 3'de gösterilmiştir.

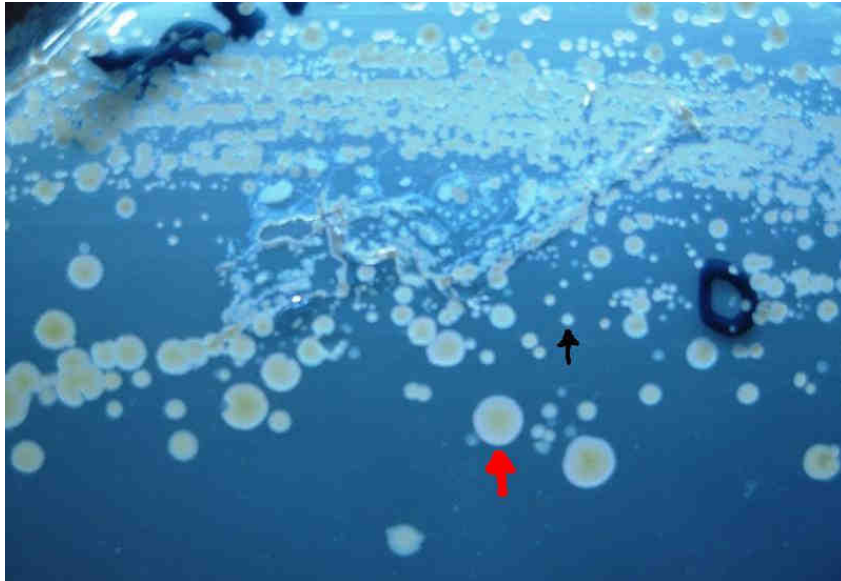
Tablo 4: *S. aureus* KKV'nın izole edildikleri besiyerleri

İzole edilen besiyeri	İzole edilen suş sayısı	%
Mannitol tuzlu agar	18	37,50
BKIA-%5 NaCl*	13	27,08
Mannitol tuzlu agar+ BKIA-%5 NaCl	11	22,92
Mannitol tuzlu agar+Columbia agar	3	6,25
Columbia agar	3	6,25
TOPLAM	48	100,00

*BKIA-%5 NaCl: %5 sodyum klorürlü beyin-kalp infüzyon agar



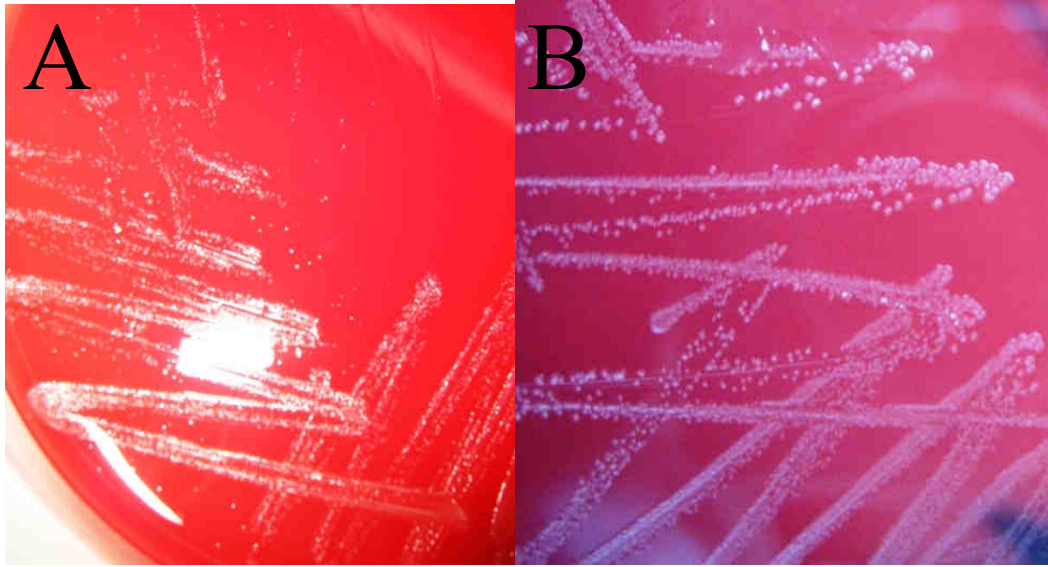
Şekil 2: Mannitol-tuzlu agarda normal fenotipte *S. aureus* (kırmızı ok) ve *S. aureus* KKV (siyah ok)



Şekil 3: 48 saatlik inkübasyon sonrasında %5 sodyum klorürlü beyin-kalp infüzyon agarında normal fenotipte *S. aureus* (büyük ok) ve *S. aureus* KKV (küçük ok)

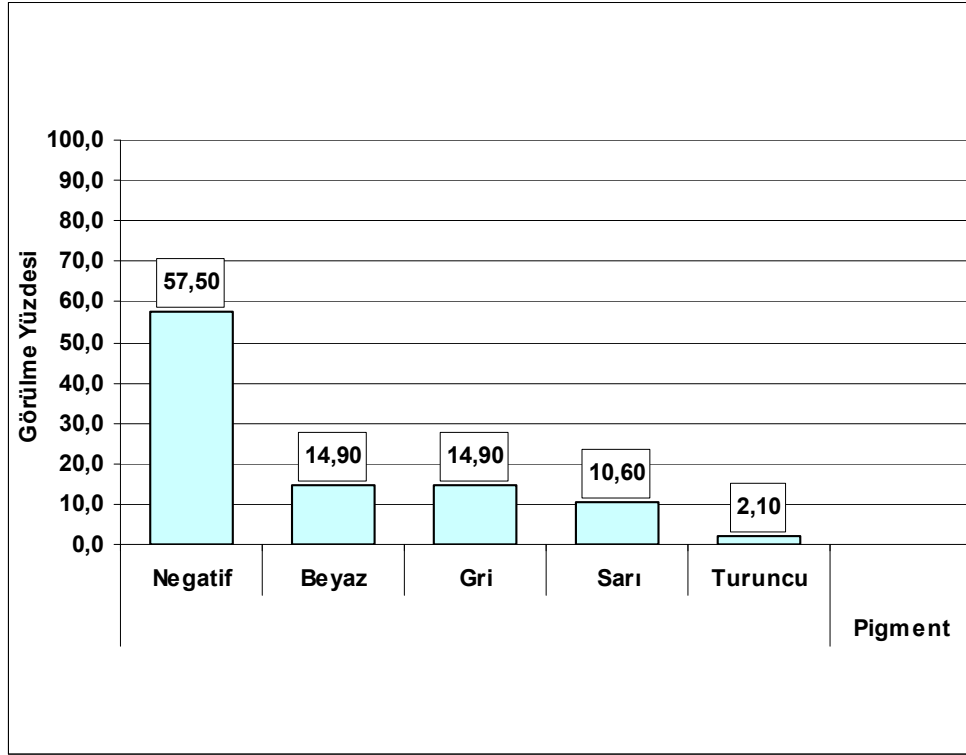
4.6. *S. aureus* KKV'NIN FENOTİPİK ÖZELLİKLERİ

İzole edilen 48 adet *S. aureus* KKV'nin koloni büyüklüğü ve şekli, pigment yapımı, hemoliz varlığı ve türü gibi fenotipik özellikleri incelendiğinde, 36'sının (%75) küçük koloniler oluşturduğu (Şekil 2 ve 3), altısının (%12,5) "sahanda yumurta", altısının (%12,5) ise "iğne ucu" koloni oluşturduğu görülmüştür (Şekil 4).



Şekil 4: Tek koloni pasajları sonrası Columbia agarda solda *S. aureus* KKV "iğne ucu" koloni (A) ve sağda "sahanda yumurta" şeklinde *S. aureus* KKV (B).

S. aureus KKV'nin pigment özellikleri incelendiğinde, 27 suşun (%57,5) pigment oluşturmadığı gözlenmiştir. *S. aureus* KKV'nin pigment özellikleri Şekil 5'de gösterilmiştir.

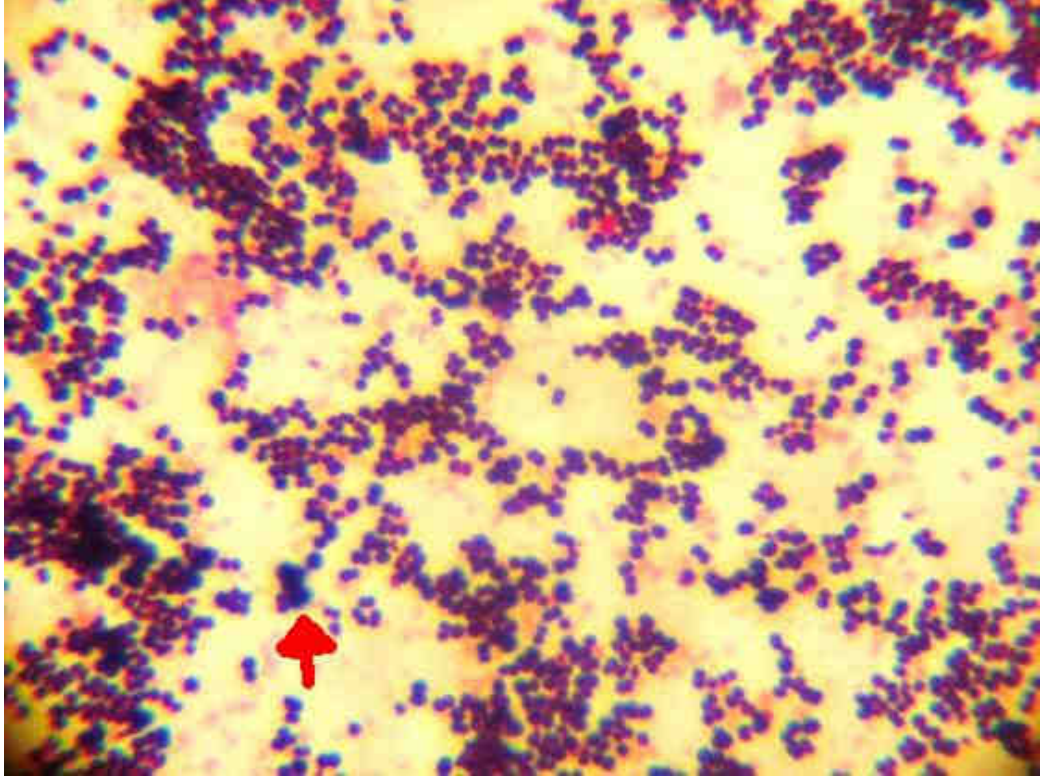


Şekil 5: *S. aureus* KKV'nın pigment özellikleri

İzole edilen *S. aureus* KKV'nın 22'sinin (%45,8) hemoliz oluşturmadığı belirlenmiştir. Hemoliz saptanan 26 *S. aureus* KKV suşunun 19'unda (%39,5) dar hemoliz, üçünde (%6,3) geniş hemoliz, üçünde (%6,3) çift hemoliz zonu, birinde ise (%2,1) alfa hemoliz gözlenmiştir.

4.7. *S. aureus* KKV'NIN MİKROSKOBİK DEĞERLENDİRMESİ

İzole edilen tüm *S. aureus* KKV'nın Gram boyası ile yapılan mikroskopik incelemesinde farklı büyüklükte gram pozitif koklar dikkati çekmiştir. Özellikle "sahanda yumurta" şeklinde ve "iğne ucu" koloni oluşturan suşlarda normal *S. aureus*'a göre daha büyük gram pozitif kokların bulunduğu pleomorfik görünüm saptanmıştır (Şekil 6).



Şekil 6: *S. aureus* KKV'nin mikroskopik incelemesinde normal *S. aureus*'a göre daha büyük gram pozitif pleomorfik koklar (kırmızı ok).

4.8. *S. aureus* KKV'NİN DİĞER ÖZELLİKLERİ

İzole edilen 48 suştan 42'sinin koagülaz pozitif, 6'sının koagülaz negatif olduğu görülmüştür.

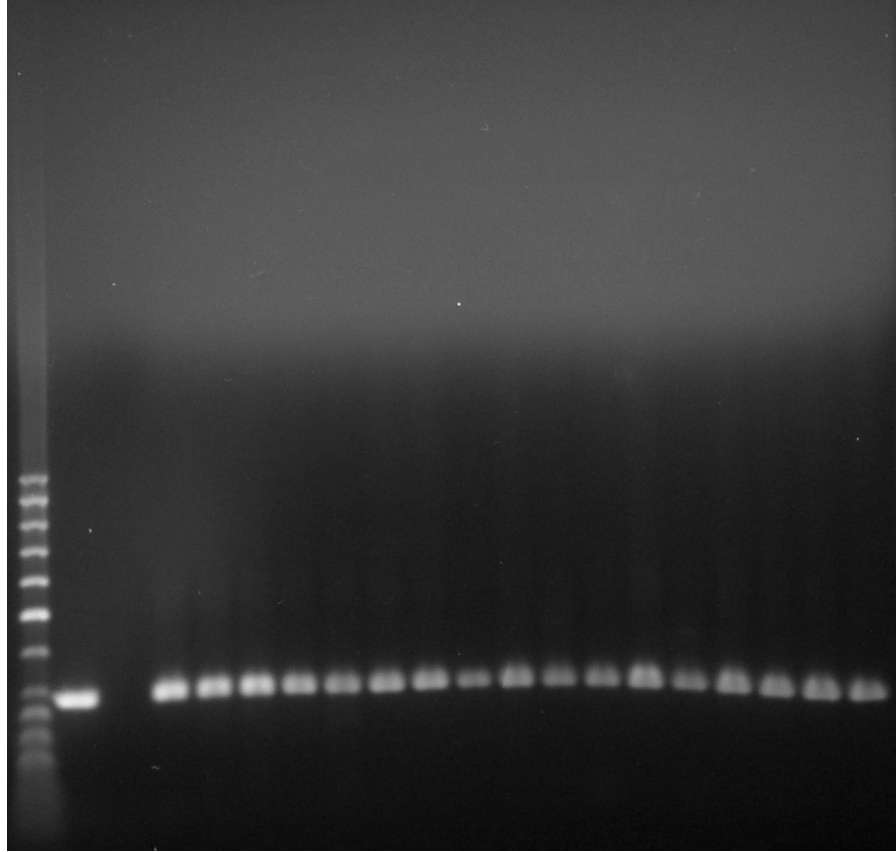
İncelenen *S. aureus* KKV'nin Schaedler agara yapılan pasajları sonucunda 24 saatlik inkübasyon sonrası 44 suşta normal fenotipe dönüş saptanırken, 4 suşta ise bu değişim gözlenmemiştir.

İzole edilen suşların tümü *S. aureus* lateks aglütinasyon testi ile pozitif olarak belirlenmiştir.

Kırksekiz *S. aureus* KKV ve eş zamanlı olarak izole edilen 33 normal fenotipik görünümdeki *S. aureus* suşları olmak üzere toplam 81 suşun PCR ile doğrulama testleri yapılmıştır. NUCAR ve NUCAF primerleri kullanılarak yapılan PCR'da *S. aureus*'a özgül 447

bç'lik *nucA* gen bölgesinin varlığı ile *S. aureus* tanısı doğrulanmıştır. PCR sonrası amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeldeki görünüşleri şekilde görülmektedir (Şekil 12).

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

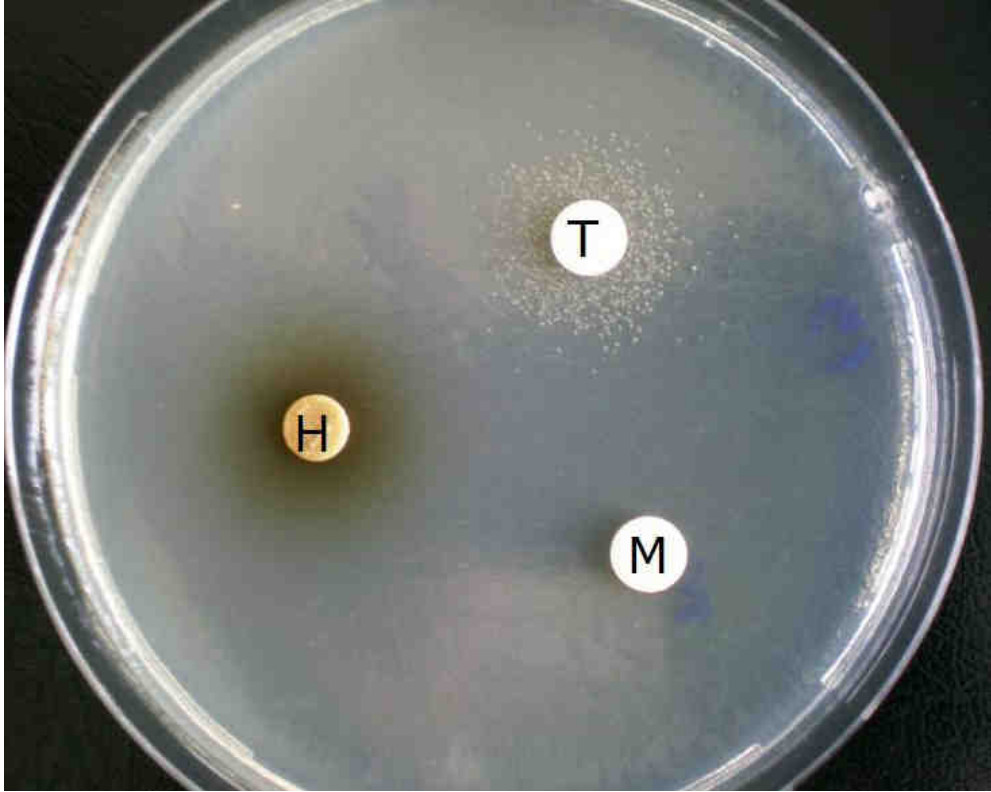


Şekil 7: PCR sonrası amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeldeki görünüşleri; M: moleküler ağırlık standardı (50 bp), 1: pozitif kontrol, 2: negatif kontrol, 3-19: suşlara ait bantlar.

4.9. *S. aureus* KKV'NİN OKZOTROFİZM ÖZELLİKLERİ

Mueller-Hinton agarda yapılan okzotrofizm deneyleri sonucunda 48 suştan altısının timidin bağımlı olduğu belirlenmiştir (Şekil 11). Bu altı suştan birinin aynı zamanda hemin bağımlı olduğu saptanmıştır. Menadion bağımlılığına rastlanmamıştır.

Timidine bağımlı bulunan altı suşun beşini “sahanda yumurta” şeklinde koloni yapan suşların oluşturması dikkati çekmiştir.



Şekil 8: Mueller-Hinton agarda timidin bağımlı KKV. T: timidin, H: hemin, M: menadion

4.10. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK SONUÇLARI

Toplam 33 normal fenotipik görünümdeki *S. aureus* ve 48 *S. aureus* KKV'nin antibiyotik duyarlılık sonuçları karşılaştırılmış, duyarlılık test sonuçları ile elde edilen MİK değerleri Tablo 5'de gösterilmiştir.

Vankomisin, siprofloksasin ve linezolid duyarlılık sonuçları açısından *S. aureus* KKV ve normal fenotipik görünümdeki *S. aureus* suşları birbirine benzer sonuçlar vermiştir. Tüm suşlar vankomisin ve linezolide hassas olarak belirlenmiştir. Siprofloksasine hassas ve dirençli suşların dağılımı normal fenotipik görünümdeki *S. aureus* suşları ve *S. aureus* KKV'nda benzer

oranlarda saptanmıştır. Oksasilin ve gentamisine direnç, normal fenotipik görünümdeki *S. aureus* suşlarında saptanmazken, gentamisin için *S. aureus* KKV'nın üçünde direnç, bir suşta orta derecede duyarlılık, oksasilin için ise 5 suşta direnç belirlenmiştir. Trimetoprim-sülfametoksazol (SXT) 'e normal fenotipik görünümdeki *S. aureus* suşlarından sadece bir tanesi dirençli saptanırken, *S. aureus* KKV'ndan altısı dirençli olarak belirlenmiştir (Tablo 6). Bu altı suşun beşini "sahanda yumurta" şeklinde koloni yapan ve timidine bağımlı bulunan suşların oluşturması dikkati çekmiştir. *S. aureus* KKV'ndaki oksasilin, gentamisin ve SXT'e dirençli suşların oranı, normal fenotipik görünümdeki *S. aureus* suşlarına göre anlamlı fark göstermemiştir (Oksasilin: p: 0.076, Gentamisin: p:0.115, Mantel-Haenzsel; SXT: p:0.075, Fisher). Tigesiklin için belirlenen MİK değerleri tüm normal fenotipik görünümdeki *S. aureus* suşlarında 0,5 µg/ml'nin altında saptanırken, *S. aureus* KKV'ndan 6 tanesinde MİK değeri 1 µg/ml'den büyük olarak belirlenmiş, aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p:0.041, Fisher).

Tablo 5: Normal fenotipik görünümdeki *S. aureus* ve *S. aureus* KKV'nın MİK sonuçları

	<i>S. aureus</i> (n:33)			<i>S. aureus</i> KKV (n:48)		
	MİK [#] aralığı (µg/ml)	MİK50 (µg/ml)	MİK90 (µg/ml)	MİK aralığı (µg/ml)	MİK50 (µg/ml)	MİK90 (µg/ml)
Oksasilin	≤0,06-2	0,25	1	≤0,06->64	0,25	4
Gentamisin	≤0,125-4	1	4	≤0,125->128	1	4
Vankomisin	0,25-2	1	2	0,125-2	1	2
Siprofloksasin	0,25->32	0,5	4	0,03->32	1	16
Linezolid	0,25-4	2	4	0,25-4	2	2
SXT*	0,016-32	0,125	0,25	0,023->32	0,25	32
Tigesiklin	0,015-0,5	0,125	0,25	0,015-2	0,06	1

[#]MİK: Minimum inhibe edici konsantrasyon

*SXT: Trimetoprim- Sülfametoksazol

Tablo 6: Normal fenotipik görünümdeki *S. aureus* ve *S. aureus* KKV'nın antibiyotik duyarlılıkları

	<i>S. aureus</i> n (%)			<i>S. aureus</i> KKV n (%)		
	D*	I [#]	‡H	D	I	H
Oksasilin	-	-	33(100,0)	5(10,4)	-	43 (89,6)
Gentamisin	-	-	33(100,0)	3 (6,3)	1 (2,1)	44 (91,7)
Vankomisin	-	-	33(100,0)	-	-	48(100,0)
Siprofloksasin	6(18,2)	21(63,6)	6 (18,2)	7(14,6)	30(62,5)	11 (22,9)
Linezolid	-	-	33(100,0)	-	-	48(100,0)
SXT^Δ	1 (3,0)	-	32 (97,0)	8(16,7)	-	40 (83,3)
	[∞] MİK ≤ 0,5		MİK ≥ 1	MİK ≤ 0,5		MİK ≥ 1
Tigesiklin	33 (100)		-	42 (87,5)		6 (12,5)

*D: Dirençli

#I: Orta derecede duyarlı

‡H: Hassas

^ΔSXT: Trimetoprim- Sülfametoksazol

[∞]MİK: Minimum inhibe edici konsantrasyon

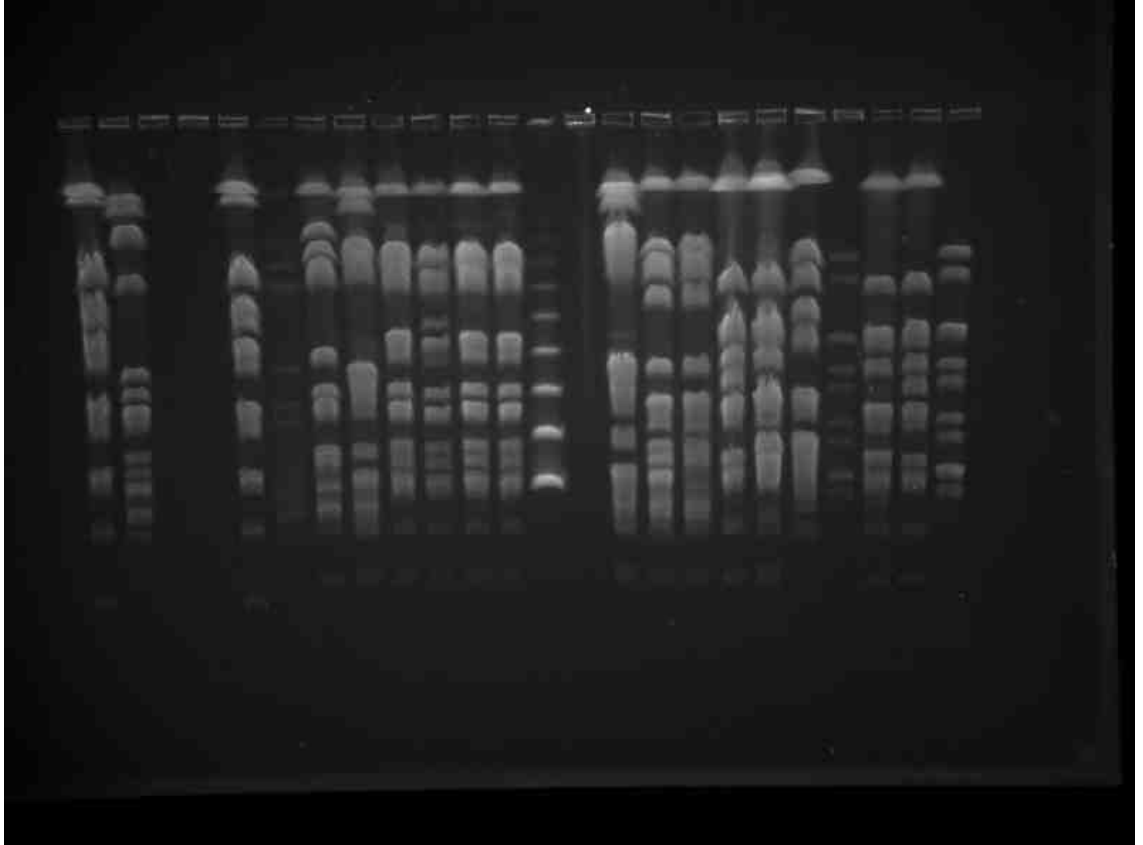
4.11. PFGE SONUÇLARI

Toplam 20 hastadan alınan 32 ayrı klinik örnekten, fenotipik olarak 48 adet farklı *S. aureus* KKV saptanmıştır. Kırksekiz *S. aureus* KKV ve eş zamanlı olarak izole edilen 33 normal fenotipik görünümdeki *S. aureus* suşu olmak üzere toplam 81 suş PFGE yöntemi ile incelenmiştir. Üç suş PFGE yöntemi ile genotiplendirilememiştir. PFGE sonrası suşların oluşturdukları bant seyirleri Şekil 12'de görülmektedir.

Her hasta için ayrı ayrı olacak şekilde genotipler karşılaştırılmıştır (Tablo 7). Hastalardan 14'ünün örneklerindeki tüm suşların genotipik olarak birbirleri ile aynı olduğu belirlenmiştir. Beş hastanın (1, 2, 9, 10 ve 20 no'lu hastalar) örneklerinde ise farklı genotipik varyantların olduğu saptanmıştır. Hastalardan birinde (19 no'lu hasta) *S. aureus* KKV suşunda PFGE yöntemi ile

genotiplendirme başarılı olmadığı için eş zamanlı olarak izole edilen normal fenotipik görünümdeki *S. aureus* suşu ile karşılaştırma yapılamamıştır (Tabloda gösterilmemiştir). *S. aureus* KKV ile persistan kolonizasyon 5 hastada (%25) belirlenmiştir.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 M 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23



Şekil 9: PFGE sonrası suşların oluşturdukları bant seyirleri
M: moleküler ağırlık standardı (1 kb), 1-12,13-23:İzolatlara ait bantlar

Tablo 7: *S. aureus* KKV saptanan hastaların KKV ve eş zamanlı olarak izole edilen *S. aureus* suşlarının genotipik olarak karşılaştırılması ve antibiyotik duyarlılıkları (D: Dirençli, I: orta derecede duyarlı, H: Hassas).

Hastalar	Örnek geliş tarihi	İzole edilen suş	PFGE ¹ Genotip	OX ²	GM ³	VA ⁴	CIP ⁵	LZ ⁶	SXT ⁷	TGC MİK ⁸
1	06.03.2007	KKV ⁹	II ⁰	D	D	H	D	H	D	1
	16.03.2007	KKV	II	D	D	H	D	H	H	0,015
		<i>S. aureus</i>	I	H	H	H	H	H	H	0,125
2	17.04.2007	KKV	I	H	H	H	I	H	H	0,06
		KKV	I	H	H	H	H	D	H	0,06
		<i>S. aureus</i>	III	H	H	H	H	H	H	0,25
	03.08.2007	KKV	I	H	H	H	H	H	H	0,06
		KKV	I	H	H	H	I	H	H	0,06
		KKV	I	H	H	H	I	H	H	0,06
	19.11.2007	<i>S. aureus</i>	IV	D	H	H	H	H	H	0,015
		KKV	II	H	H	H	H	H	H	0,06
3	18.04.2007	<i>S. aureus</i>	I	H	H	H	H	H	H	0,06
		KKV	I	D	H	H	I	H	H	0,03
4	26.04.2007	<i>S. aureus</i>	I	H	H	H	I	H	H	0,25
		KKV	I	H	H	H	H	H	H	0,25
	07.06.2007	<i>S. aureus</i>	I	H	H	H	H	H	H	0,125
		KKV	I	H	H	H	H	H	H	0,125
		<i>S. aureus</i>	I	D	H	H	H	H	H	0,25
		<i>S. aureus</i>	I	H	H	H	H	H	H	0,25
17.12.2007	KKV	I	H	I	H	H	H	H	1	
	KKV	I	H	H	H	H	H	H	1	
5	30.03.2007	<i>S. aureus</i>	I	H	H	H	H	H	H	0,25
		KKV	I	D	H	H	H	H	H	0,25
	24.10.2007	<i>S. aureus</i>	I	D	H	H	H	H	H	0,25
		KKV	I	H	H	H	H	H	H	0,06
	11.12.2007	<i>S. aureus</i>	I	D	H	H	H	H	H	0,06
		KKV	I	D	H	H	H	H	H	0,125
KKV		I	H	H	H	H	H	H	0,125	
	KKV	I	H	H	H	H	H	H	1	

Hastalar	Örnek geliş tarihi	İzole edilen suş	PFGE ¹ Genotip	OX ²	GM ³	VA ⁴	CIP ⁵	LZ ⁶	SXT ⁷	TGC Mik ⁸	
6	05.06.2007	KKV	I	H	H	H	I	H	H	0,03	
		KKV	I	D	H	H	H	H	H	0,03	
		KKV	I	H	H	H	H	I	H	0,06	
	26.09.2007	<i>S. aureus</i>	I	H	H	H	H	I	H	H	0,06
		KKV	I	H	H	H	H	I	H	H	0,015
	17.01.2008	<i>S. aureus</i>	I	H	H	H	H	I	H	H	0,06
KKV		I	H	H	H	H	I	H	H	0,5	
7	05.06.2007	<i>S. aureus</i>	I	H	H	H	D	H	H	0,125	
		KKV	I	H	H	H	I	H	H	0,03	
8	05.06.2007	<i>S. aureus</i>	I	H	H	H	D	H	H	0,125	
		KKV	I	H	H	H	H	H	H	0,125	
9	27.06.2007	<i>S. aureus</i>	II	H	H	H	I	H	H	0,125	
		KKV	I	H	H	H	I	H	D	0,125	
	17.08.2007	<i>S. aureus</i>	II	H	H	H	H	H	D	0,125	
		KKV	I	D	H	H	D	H	H	0,125	
	08.10.2007	<i>S. aureus</i>	II	H	H	H	H	H	H	0,125	
		<i>S. aureus</i>	I	D	H	H	H	I	H	0,125	
KKV		I	D	H	H	H	H	H	0,06		
10	04.07.2007	<i>S. aureus</i>	II	D	H	H	H	H	H	0,125	
		<i>S. aureus</i>	II	H	H	H	H	H	H	0,125	
		<i>S. aureus</i>	I	D	H	H	H	H	H	0,125	
		KKV	-	D	H	H	H	H	D	0,03	
		KKV	I	D	H	H	H	H	D	0,03	
		KKV	II	H	H	H	H	H	D	0,06	
11	27.06.2007	<i>S. aureus</i>	I	D	H	H	H	H	D	0,03	
		KKV	I	H	H	H	H	H	H	0,5	
		KKV	I	H	H	H	H	H	H	0,06	
		KKV	I	H	H	H	H	H	H	0,25	

Hastalar	Örnek geliş tarihi	İzole edilen suş	PFGE ¹ Genotip	OX ²	GM ³	VA ⁴	CIP ⁵	LZ ⁶	SXT ⁷	TGC MİK ⁸
12	03.08.2007	<i>S. aureus</i>	I	D	H	H	D	H	H	0,03
		KKV	I	H	H	H	I	H	H	0,015
13	22.08.2007	KKV	I	H	H	H	H	H	H	0,06
		KKV	I	H	H	H	H	H	H	0,5
		<i>S. aureus</i>	I	H	H	H	I	H	H	0,125
14	01.10.2007	<i>S. aureus</i>	I	D	H	H	D	H	H	0,25
		KKV	I	D	H	H	D	H	H	0,125
	07.01.2008	<i>S. aureus</i>	I	D	H	H	D	H	H	0,25
		KKV	I	D	H	H	D	H	H	2
15	16.10.2007	<i>S. aureus</i>	I	H	H	H	H	H	H	0,06
		KKV	I	H	H	H	H	H	H	0,015
16	15.11.2007	<i>S. aureus</i>	I	D	H	H	H	H	H	0,125
		KKV	I	H	H	H	H	H	H	0,06
		KKV	I	H	H	H	H	H	H	0,06
17	11.12.2007	<i>S. aureus</i>	I	D	H	H	H	H	H	0,06
		<i>S. aureus</i>	I	H	H	H	H	H	H	0,125
		KKV	I	H	H	H	H	H	H	0,125
18	10.12.2007	KKV	I	D	H	H	H	H	H	1
		KKV	I	H	H	H	H	H	H	0,125
20	31.01.2008	<i>S. aureus</i>	I	H	H	H	H	H	H	0,125
		KKV	II	D	H	H	D	H	D	0,25
		KKV	II	D	D	H	D	H	H	0,25

⁰Genotiplendirme sonuçlarının değerlendirilmesi, her bir hastanın suşları kendi arasında karşılaştırılarak yapılmıştır.

¹PFGE: 'Pulsed field' jel elektroforezi

²OX:Oksasilin, ³GM: Gentamisin, ⁴VA: Vankomisin, ⁵CIP: Siprofloksasin, ⁶LZ: Linezolid, ⁷SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol

⁸TGC MİK: Tigesiklin için minimum inhibe edici konsantrasyon

5. TARTIŞMA

Kistik fibrozis, kistik fibrozis transmembran düzenleyici geninde mutasyonla karakterize otozomal resesif geçişli genetik bir hastalıktır. Bozuk kistik fibrozis transmembran düzenleyici protein nedeni ile cAMP bağımlı klor kanalı etkilenip hücreden dışarıya klor sekresyonu olmamaktadır. Sodyum kanallarının da etkilenmesi ile hücre içine sodyum girişi artmakta ve oluşan sekresyon, su ve elektrolitten fakir hale gelmektedir [74]. Bu bozukluğun bir sonucu olarak oluşan vizküz mukoid salgı nedeni solunum yollarından mikroorganizmalar temizlenememekte, kronik kolonizasyon ve enfeksiyonların gelişmektedir. Bu hastalarda en önemli morbidite ve mortalite sebebi kronik akciğer enfeksiyonlarıdır. Bu enfeksiyonlarda çocuklarda en sık *S. aureus* ve *Haemophilus influenzae*, genç erişkinlerde ise *Pseudomonas aeruginosa* izole edilmektedir. *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, mikoplazma gibi bakteriler, virüsler ve *Aspergillus fumigatus* başta olmak üzere mantarlar da KF hastalarının solunum yollarında enfeksiyon etkeni olarak bulunabilmektedir [75].

S. aureus, genellikle küçük yaştaki KF hastalarının solunum yollarında ilk ortaya çıkan patojen olarak bilinmektedir [76]. Mikrobiyolojik tanı tekniklerindeki gelişmelere paralel olarak KF hastalarının solunum yollarından izole edilen bakterilerin spektrumunda son yıllarda değişiklik gözlenmiş, *Burkholderia cepacia complex*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* gibi etkenler ve *S. aureus* KKV yeni daha sık olarak izole edilmeye başlamıştır [9, 77, 78]. Özellikle trimetoprim-sülfametoksazol (SXT) ve diğer antibiyotiklerin tekrarlayan kullanımlarında KF hastalarında *S. aureus* KKV'larının izole edildiği

belirlenmiştir [14]. KF hastalarında ve diğer invaziv enfeksiyonlarda *S. aureus*'a bağlı enfeksiyonların sürekliliğinin *S. aureus* KKV alt tipinin izole edilmesiyle ilişkili olduğu gösterilmiştir [9].

Son yıllarda yapılan prospektif çalışmalar, *S. aureus* KKV'nin kronik ve persistan enfeksiyonlardaki rolünü ortaya koymuştur [4, 17, 22]. Besier ve arkadaşlarının 252 KF hastasının balgam ve derin boğaz sürüntüsü örneklerini inceledikleri geniş kapsamlı prospektif bir çalışmada, *S. aureus* taşıyıcıları arasındaki *S. aureus* KKV fenotipi prevalansının %17 olduğu belirlenmiştir [5]. Kahl ve arkadaşlarının 78 KF hastasının bronş sekresyonu ve boğaz sürüntüsü örneği ile yaptığı diğer bir prospektif çalışmada ise, *S. aureus* taşıyıcıları arasındaki KKV prevalansı %49,1 olarak saptanmıştır. Bu çalışmada prevalans değerlerinin oldukça yüksek bulunmasının çalışmanın yapıldığı popülasyondaki SXT kullanımının yüksek olmasıyla ilişkili olabileceği belirtilmiştir [8]. Ülkemizde KF hastalarının solunum yolu örneklerinde *S. aureus* KKV'nin ilk kez araştırıldığı bu çalışmada hastaların %8,1'inde, değerlendirilen klinik örneklerin ise %6,4'ünde KKV varyantları belirlenmiştir. Çalışmamızdaki *S. aureus* KKV prevalansı, diğer ülkelerde yapılmış olan benzer çalışmalara göre daha düşük saptanmıştır. Bu durum, klinikte uygulanan antibiyotik rejimlerinin ülkeden ülkeye ve merkezden merkeze farklılık göstermesine bağlı olabilir. Hastanemizde izlenen KF hastalarının dosya incelemesi sonucunda, bu hastaların tedavisinde genellikle beta-laktam, beta-laktam ile birlikte beta laktamaz inhibitörü ya da florokinolon grubu antibiyotiklerin kullanıldığı gözlenmiştir. Belçika'daki 627 KF hastasının balgam örnekleri ile yapılan çok merkezli bir çalışmada da *S. aureus* KKV prevalansı düşük (%4) olarak belirlenmiştir. Ancak bu çalışmaya katılan 9 merkezden sadece üçü aktif olarak *S. aureus* KKV araştırması yapılan merkezler olup, KKV'nin hemen hepsi bu üç merkezden izole edilmiştir. Saptanan prevalansın düşük

olmasının sebebinin diğerk merkezlerin *S. aureus* KKV suşlarını saptamadaki başarısızlıklarına bağılı olabileceğı belirtilmiştir [31].

Daha önce yapılan çalışmalarda, *S. aureus* KKV'na bağılı enfeksiyonların cinsiyet ile bir ilişkisi belirlenememiştir. Çalışmamıza dahil edilen hastaların cinsiyet dağılımı eşit olmasına rağmen, *S. aureus* KKV saptanan hastaların %65'nin bayan hastalar olduğı bulunmuş, ancak cinsiyetler arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır ($p>0.05$).

Çalışmaya alınan hastaların yaşlarının 1-58 arasında değıştiğı ve ortalama yaşın 9,9 olduğı belirlenmiştir. Ayrıca yaş aralıklarına bakıldığında hastaların büyük çoğunluğunun 10 yaşın altında olduğı saptanmıştır (Tablo 1). *S. aureus* KKV saptanan hastalarda ise yaşın 2-31 arasında değıştiğı ve ortalama yaşın 14,4 olduğı belirlenmiştir. *S.aureus* KKV saptanan hastalar, %25 oranında olmak üzere en fazla 11-15 yaş aralığında toplanmıştır ($p<0.05$). Çalışmamızda *S. aureus* KKV'nın, daha ileri yaştaki hastalarda saptandığı görülmüştür. Vergison ve ark.nın 627 KF hastasında yaptığı çalışmada normal fenotipte *S. aureus*'u olan hastaların yaşı ortalama 16 iken, *S. aureus* KKV taşıyan hastaların yaşının ortalama 21 olduğı ($P: 0.001$) belirtilmektedir [31]. Besier ve ark.'nın 252 KF hastasında yaptıkları benzer çalışmada *S. aureus* KKV'nın daha ileri yaştaki hastalarda izole edildiğı saptanmıştır [5]. *S. aureus* KKV'nın ortaya çıkışı, in vitro olarak çeşitli antibiyotiklerin etkisi altında ve in vivo olarak antifolat ya da aminoglikozid kullanımı sonrası artmaktadır [8]. Bu yüzden yüksek miktarda antibiyotik kullanımının, *S. aureus* KKV'nın daha ileri yaşta ortaya çıkmasının sebebi olabileceğı belirtilmektedir [5]. Çalışmamızın sonuçları da bu görüşü doğrular niteliktedir.

İncelenen örnekler arasında boğaz sürüntüsü örnekleri daha fazla (%59,7) olmasına rağmen, *S. aureus* KKV çoğunlukla (%71,9) balgam örneklerinden izole edilmiştir. Solunum yolu

örneklerinden uygun şekilde alınmış balgam örneği etken mikroorganizmaları tanımlamak için boğaz sürüntü örneklerinden daha değerlidir [67]. Bizim çalışmamızda da *S. aureus* KKV'nın izolasyonunda balgam örneklerinde, boğaz sürüntü örneklerine kıyasla daha iyi sonuçlar elde edilmiştir. İncelenen boğaz sürüntüsü örneklerinin daha fazla olması, hastaların yaşının küçük olması ve balgam verememeleri ile ilgili olabilir.

S. aureus KKV saptanan hastaların klinik örneklerinin mikroskopik değerlendirmesi sonucunda, toplam 25 (%78,1) örnekte bol, orta ya da az olmak üzere PMNL görülmüştür. Bu örneklerden 24'ünde (%75) hücre içi gram pozitif kok belirlenmiştir. Bu verilere dayanarak, *S. aureus* KKV saptanan klinik örneklerin % 75'inde direkt mikroskopik incelemenin, üreme sonucu ile uyumlu bulunduğu söylenebilir.

Besier ve arkadaşlarının 252 KF hastasının balgam ve derin boğaz sürüntüsü örneklerini inceledikleri prospektif çalışmada, normal fenotipte *S. aureus* saptanan hastalara göre, *S. aureus* KKV saptanan hastaların örneklerinde *P. aeruginosa* birlikteliği anlamlı oranda daha yüksek olarak belirlenmiştir [5]. Yapılan diğer bir çalışmada, KF hastalarının balgamında bulunan *P. aeruginosa*'nın ürettiği 4-hidroksi-2-heptilkinolin-N-oksit maddesinin aminoglikozide dirençli *S. aureus* KKV'nın ortaya çıkışını artırdığı belirtilmektedir [79]. Bizim çalışmamızda *S. aureus* KKV saptanan 20 hastanın 10'unun (%50) örneklerinde *P. aeruginosa*'nın da pozitif olduğu belirlenmiştir. Sadece normal fenotipte *S. aureus* üremesi olan 105 hastanın ise 30'unun (% 28,56) örneklerinde *P. aeruginosa*'nın pozitif olduğu görülmüştür.

Yapılan çalışmalarda *S. aureus* ID (SAID, bioMérieux) agarın *S. aureus* türlerini tanımlamada büyük ölçüde özgül ve duyarlı olduğu bildirilmiştir [80]. Kipp ve arkadaşlarının normal fenotipte *S. aureus* ve *S. aureus* KKV olmak üzere toplam 106 suşu inceledikleri

bir çalışmada, *S. aureus* türleri ve KKV fenotipinin saptanmasında en doğru ve hızlı yöntemin, klinik örneklerin Columbia kanlı agara ve kromojenik SAID agara ekilmesi olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmada, SAID agarda 24 saatlik inkübasyon sonrasında 53 KKV'nın 49'u *S. aureus* olarak tanımlanabilmiş, ancak bunların 34'ünde (%64) tipik KKV fenotipinin saptandığı belirtilmiştir [64]. Bu çalışmada incelenen örneklerde Columbia agarda 24 saatlik inkübasyon sonrasında *S. aureus* KKV izolasyonu oranı %97 olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda Columbia agarda *S. aureus* KKV izolasyonu %12,5 olarak daha düşük bulunmuştur. Kipp ve arkadaşları çalışmalarını daha önceden izole edilen bakterilerden yaparken, bizim çalışmamızda doğrudan klinik örneklerden izolasyon gerçekleştirilmiştir. Çalışma hastalarımızın büyük bir kısmının çocuk hasta olması ve bu hastaların uygun balgam örneği verememesi Columbia agardaki düşük izolasyon oranını açıklayabilir. Uygun alınamayan klinik örneklerde bulunan normal flora üyeleri, zengin bir besiyeri olan Columbia agarda hızla üreyerek besiyerini kaplamakta ve *S. aureus* KKV fenotipinin izole edilmesine engel olmaktadır. Columbia agarda izolasyonun az olmasının diğer bir nedeni ise *P. aeruginosa* ya da *S. aureus* ile kolonize olan hastalarda, yine *S. aureus* KKV kolonilerinin bu besiyerinde üreyen diğer bakteri kolonileri arasından seçilememiş olmasıdır. Columbia kanlı agar plaklarında gram negatif bakterilerin üremesini baskılamak amacıyla ilk ekim alanına aztreonam diski konulmuştur [69], ancak bu uygulama da *S. aureus* KKV izolasyon şansını artırmada yeterli olamamıştır.

S. aureus suşları mannitol tuzlu agarda mannitolü fermente etmeleri nedeniyle sarı renkli koloniler oluşturmaktadır. *S. aureus* KKV suşlarının ise mannitol tuzlu agarda mannitolü fermente etmemesi nedeniyle pembe renkli koloniler oluşturabileceği bildirilmektedir [10]. Son yıllarda yapılan çalışmalarda *S. aureus*

KKV'nın tanımlanmasında mannitol tuzlu agar da kullanılmaktadır [5, 31]. *S. aureus* KKV mannitol tuzlu agarda pembe koloniler oluştursa bile, bu suşlara özgü olan küçük boyuttaki kolonilerin görülmesi *S. aureus* KKV'ından şüphe edilmesi açısından yön gösterici olmaktadır. Çalışmamızda da en yüksek *S. aureus* KKV izolasyonunun mannitol tuzlu agarda olduğu, bunu %5 sodyum klorürlü beyin-kalp infüzyon agarı (BKIA-%5 NaCl) nin izlediği saptanmıştır (Tablo 3). BKIA-%5 NaCl, *P. aeruginosa* üremesini baskılamakta ve *S. aureus* ve *S. aureus* KKV üremesini artırmaktadır. BKIA-%5 NaCl plaklarının anaerob kavanozda inkübe edilmesi ve 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda değerlendirilmesi gerekmektedir [8]. Mannitol tuzlu agar ve BKIA-%5 NaCl bir arada değerlendirildiğinde *S. aureus* KKV'nın %86,6'sını tanımlamayı sağlamıştır. Çalışmamız sonucunda özellikle sınırlı olanakların olduğu laboratuvarlarda kromojenik agar yerine mannitol tuzlu agar ile BKIA-%5 NaCl 'nin bir arada kullanılmasının uygun olacağı sonucuna varılmıştır.

S. aureus KKV normal *S. aureus* fenotipinin tersine katı besiyerinde 24 saatlik inkübasyon sonrası küçük koloniler oluşturmakta ve sıvı besiyerinde yavaş üreme özelliği göstermektedirler. Bu bakterilerde pigment oluşumu ve hemolitik aktivite azalmıştır [40]. Bunun yanında timidin-bağımlı KKV'nın küçük kabarık pigmentli merkezi çevreleyen yarı şeffaf kenarları ile 'sahanda yumurta' şeklinde görülen ve normal fenotipteki *S. aureus* kolonilerin yaklaşık onda biri büyüklüğündeki 'iğne ucu' koloniler olmak üzere iki tip koloni oluşturabildiği bildirilmiştir [63]. Bu iki koloni tipinin arasında yer alan, normal fenotipteki *S. aureus*'a göre boyut olarak daha küçük olan koloniler de *S. aureus* KKV olarak değerlendirilmektedir (B KAHL, yazılı görüşme). Çalışmamızda izole edilen 48 adet *S. aureus* KKV'nın 36'sının (%75) küçük koloniler (Şekil 2 ve 3), altısının (%12,5) "sahanda yumurta", altısının

(%12,5) ise "iğne ucu" koloni oluşturduğu görülmüştür (Şekil 4). Okzotrofizm sonuçları ile karşılaştırıldığında "sahanda yumurta" şeklinde koloni yapan altı suştan beşinin timidin bağımlı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu suşlardan bir tanesinin aynı zamanda hemin bağımlı olduğu saptanmıştır. Timidin bağımlı suşların saptandığı iki farklı hastanın tedavi öyküsü incelendiğinde her ikisinin de SXT kullanımının olduğu saptanmıştır.

S. aureus KKV'nda pigment oluşumu ve hemolitik aktivitenin normal fenotipteki *S. aureus*'a göre azalmış olduğu, *S. aureus* KKV'nın genellikle beyazımsı koloniler oluşturduğu belirtilmektedir [40]. Çalışmamızda *S. aureus* KKV'nın pigment özellikleri incelendiğinde, çoğunluğunun (%57,5) pigment oluşturmadığı, pigment oluşturanların da genellikle beyaz ya da gri pigmentli oldukları gözlenmiştir (Şekil 5). Hemoliz özelliklerine bakıldığında da 22'sinin (%46,8) hemoliz oluşturmadığı belirlenmiştir. Hemoliz saptanan 25 *S. aureus* KKV suşunun da 18'inin (%38,3) dar hemolizli olduğu saptanmıştır. Tüm bu bulgular, *S. aureus* KKV'nın önceki çalışmalarda tanımlanan şekilde hemolizsiz, pigment yapmayan koloniler oluşturduğunu destekler niteliktedir [6, 59].

Çalışmamızda özellikle "sahanda yumurta" şeklinde ve "iğne ucu" koloni oluşturan suşlarda Gram boyaması ile yapılan mikroskopik incelemede normal *S. aureus*'a göre daha büyük gram pozitif kokların bulunduğu pleomorfik görünüm saptanmıştır (Şekil 6). Yapılan çalışmalarda bu iki koloni tipini oluşturan timidin-bağımlı *S. aureus* KKV'nın Gram boyaması ile yapılan mikroskopik incelemesinde pleomorfik koklar, elektron mikroskopu incelemesinde ise bozulan hücre bölünmesine işaret eden tamamlanmamış veya çoklu çapraz duvarlara sahip genişlemiş koklar görüldüğü bildirilmiştir [63].

İzole edilen 48 suşun tümünün lateks aglütinasyonu ve PCR ile *S. aureus* oldukları doğrulanmıştır. Ancak 48 suştan altısı

koagülaz negatif olarak saptanmıştır. Koagülaz testi için ideal olarak tavşan plazmasının kullanılması önerilmektedir [81]. Çalışmamızda yapılan koagülaz testinde tavşan plazması yerine insan plazmasının kullanılmış olması yalancı negatif sonuçların sebebi olabilir.

Columbia kanlı agardaki *S. aureus* KKV fenotipindeki koloniler, hemin ve menadiona gereksinimleri olduğundan daha küçük koloni oluşturmakta, bu substratları içeren Schaedler agar plaklarına yapılan pasajlarının 24 saatlik inkübasyonu sonrası ise daha büyük normal fenotipe *S. aureus* olarak üremektedirler [8]. Çalışmamızda incelenen 48 *S. aureus* KKV'nın, Schaedler agara yapılan pasajları sonucunda 44 suşta normal fenotipe dönüş saptanırken, dört suşta pasajların tekrarlanmasına rağmen bu değişim gözlenmemiştir. Bakteri metabolizmasındaki pek çok değişiklik yavaş üremeye, dolayısıyla küçük kolonilerin oluşmasına sebep olmaktadır. *S. aureus* KKV'nda saptanabilen değişiklikler, sadece elektron transportundaki ve timidin biyosentezindeki eksiklikler olmuştur. Elektron transportu yetersiz olan KKV'nda menadion ve hemin sentezi eksikliği bulunmakta ve okzotrofizm için tipik olarak ortama bu maddelerin eklenmesi ile KKV fenotipi normal fenotipe dönmektedir. Bununla birlikte hemin, menadion ya da timidine herhangi bir okzotrofizmin belirlenemediği KKV da bulunmakta ve bunlarda ATPaz ya da sitokromlardaki eksiklikler gibi başka bozuklukların olabileceği belirtilmektedir [6]. Çalışmamızdaki *S. aureus* KKV suşlarında altta yatan okzotrofizm incelendiğinde ise timidin bağımlı olan altı suş olduğu gözlenmiştir. Ayrıca timidin bağımlı olarak belirlenen suşlardan birinin aynı zamanda hemin bağımlı olduğu belirlenmiştir. Kahl ve arkadaşlarının 78 KF hastasının balgam ve boğaz sürüntüsü örneklerini incelediği çalışmalarında, 26 hastadan toplam 78 adet *S. aureus* KKV izole edilmiş ve bunların okzotrofizmi araştırılmıştır.

Bu 78 suştan timidin gereksinimi 41 tanesinde, hemin gereksinimi 10 tanesinde ve menadion gereksinimi sadece iki suшта belirlenmiş, hemin ile birlikte timidin gereksinimi ise 25 suшта gözlenmiştir. Ancak bu çalışmada *S. aureus* KKV saptanan hastaların tümünün SXT profilaksisi aldığı ve persistan *S. aureus* KKV kolonizasyonu olan 19 hastanın da 11 tanesinin aminoglikozid kullandığı belirtilmiş ve bunun sonucu olarak okzotrofizmi olan suşların ortaya çıktığı vurgulanmıştır [8]. Çalışmamızdaki okzotrofizm saptanan suş sayısının az olmasının nedeninin, solunum yolu enfeksiyonu olan KF hastalarında klinikte kullanılan antibiyotikler arasında SXT ve aminoglikozidlerin çok sık tercih edilmemesi olduğunu düşünmekteyiz. Çalışmamızda incelenen 48 *S. aureus* KKV'nın, hemin ve menadion substratlarını içeren Schaedler agara yapılan pasajları sonucunda 44 suшта normal fenotipe dönüş saptanmasına rağmen, hiçbir suшта menadiona okzotrofizm gösterilememiştir. Bu suşların okzotrofizm testi sırasında Mueller-Hinton agarda stabil kalamamaları ve bu besiyerinde üreme göstermiş olmaları nedeniyle okzotrofizm saptanamamış olabilir. *S. aureus* KKV'nın okzotrofizm testleri için Mueller-Hinton agardan başka triptik soya agarı, kimyasal olarak tanımlanmış besiyeri ('Chemically defined medium', CDM) gibi farklı besiyerleri de kullanılabilir [4, 8]. *S. aureus* KKV'nın okzotrofizmini saptamada en uygun besiyerini belirlemek üzere, farklı besiyerlerinin etkinliğini karşılaştıran çalışmaların yapılması gerekmektedir.

S. aureus KKV'nın yavaş üremeleri ve dolayısıyla azalmış hücre duvarı bölünmesi göstermeleri nedeniyle bu suşlara karşı β -laktam antibiyotiklerin etkinliğinde azalma görülmektedir [13, 46]. Elektron transportundaki aksamalar, *S. aureus* KKV'nda hücre zarının elektrokimyasal gradiyentini azaltarak antibiyotiklerin hücre içine alınmasını azaltmaktadır. Bunun sonucu olarak aminoglikozidlere direnç ortaya çıkmaktadır, ancak yine de bazı

KKV suşlarının bu antibiyotiklere duyarlı olabileceği belirtilmektedir [59]. *S. aureus* KKV'nın siprofloksasin, mupirosin ve rifampisine direnç kazanma potansiyellerinin araştırıldığı bir çalışmada, antibiyotik içeren besiyerine yapılan seri pasajlar öncesi ve sonrasında bu antibiyotiklerin in vitro etkinliği ölçülmüş, test edilen tüm suşların her üç antibiyotiğe dirençli hale geldikleri görülmüştür [82].

Besier ve arkadaşlarının 252 KF hastasında yaptıkları klinik çalışmada *S. aureus* KKV suşlarının gentamisin, trimetoprim-sülfametoksazol (SXT) ve siprofloksasine, normal fenotipteki *S. aureus* suşlarından daha dirençli oldukları bildirilmiştir [5]. Çalışmamızdaki *S. aureus* KKV suşları, eş zamanlı olarak izole edilen normal fenotipteki *S. aureus* suşlarına kıyasla daha yüksek antibiyotik direnci göstermiş ancak aradaki fark tigesiklin hariç olmak üzere istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Oksasilin ve siprofloksasin antibiyotikleri açısından fark saptanmamıştır. Normal fenotipteki *S. aureus* suşlarında gentamisine dirençli suş saptanmazken, SXT'ye dirençli sadece bir suş belirlenmiştir. Gentamisin ve SXT antibiyotikleri için dirençli suşların sayısının *S. aureus* KKV'nda daha fazla olmasına rağmen, aradaki farkın anlamlı çıkmaması suş sayısının az olmasından kaynaklanıyor olabilir. Son yıllarda geliştirilmiş yeni bir antibiyotik olan tigesiklin duyarlılığının *S. aureus* KKV'nda ilk kez değerlendirildiği çalışmamızda bu antibiyotik için MİK değerlerinin normal fenotipteki *S. aureus* suşlarına kıyasla daha yüksek çıkması da bu suşların tigesikline daha dirençli olduğunu destekleyen yeni ve önemli bir bulgudur.

Kahl ve arkadaşlarının çalışmasında timidin bağımlı tüm suşların SXT'e dirençli saptandığı belirtilmektedir [9]. Bizim çalışmamızda da timidin bağımlı olarak belirlenen ve 'sahanda

yumurta' şeklinde koloni oluşturan tüm suşların SXT'e dirençli oldukları saptanmıştır.

'Pulsed Field' Jel Elektroforezi (PFGE) yöntemi ile her hastanın izole edilen tüm *S. aureus* KKV ve eş zamanlı olarak izole edilen normal fenotipik görünümdeki *S. aureus* suşları birbirleriyle karşılaştırılmıştır. PFGE ile bazı hastaların klinik örneklerindeki *S. aureus* KKV ve normal fenotipteki *S. aureus* suşlarının genotipik olarak birbirleri ile aynı olduğu belirlenirken, diğer hastalarda ise *S. aureus* KKV ve normal fenotipteki *S. aureus* suşlarının farklı genotiplere sahip olduğu saptanmıştır (Tablo 6). Bunun iki farklı açıklaması olabilir. Birincisi, hasta farklı genotipteki iki ayrı suşla enfekte olmuş olabilir. İkincisi ise hastanın öncelikle normal fenotipteki *S. aureus* suşu ile enfekte olduktan sonra, kullanılan antibiyotiklerin etkisi ile bazı mutasyonların meydana gelmiş olması ve bunun da farklı bir genotip olarak ortaya çıkmasıdır. Yapılan çalışmalarda ikinci olasılığın in vitro ve in vivo koşullarda gerçekleştirilebildiği gösterilmiştir [3, 4, 40, 83]. Çalışmamızdaki sonuçlar, normal fenotipteki *S. aureus* suşlarının antibiyotik baskısı altında zaman içerisinde farklı fenotip (KKV) ve genotipe dönüşebileceğini göstermiştir.

Yapılan çalışmalarda *S. aureus* KKV'nın kronik solunum yolu enfeksiyonu olan KF hastalarından sık ve tekrarlar şeklinde izole edilebileceği belirtilmektedir [8]. Aynı hastada farklı tarihlerde gelen örneklerden en az üçünde *S. aureus* KKV saptanması persistan kolonizasyon olarak tanımlanmıştır [5]. Çalışmamızda persistan kolonizasyon *S. aureus* KKV taşıyan hastaların %25'inde (n=5) saptanmıştır. Çalışmanın son aylarında yeni *S. aureus* KKV saptanan hastaların bulunduğu ve bunların ileri dönemlerdeki örneklerinin de takibinin yapılması durumunda bu oranın daha da artacağı öngörülebilmektedir.

Sonuç olarak yaptığımız bu çalışma ile ülkemizde KF hastalarındaki *S. aureus* KKV varlığı ilk kez araştırılmış ve bu varyantların fenotipik ve genotipik özellikleri belirlenmiştir. Saptanan *S. aureus* KKV'nın özellikle tigesiklin gibi yeni antibiyotiklere de dirençli olduğu göz önüne alındığında, bu hastaların izlenmesinde ve tedavisinde *S. aureus* KKV izolasyonu için gerekli özenin gösterilmesi gerekmektedir. *S. aureus* KKV antibiyotiklere daha dirençli olmalarının yanısıra hücre içi öldürmeye de direnç eğilimi göstermektedirler. Bu nedenle, KF hasta grubu başta olmak üzere özellikle kronik enfeksiyonlarda, mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen klinik örneklerin incelenmesi sırasında bu varyantların göz önünde bulundurulması ve rapor edilmesi önem kazanmaktadır.

6. ÖZET

Kronik solunum yolu enfeksiyonlarının sık görüldüğü KF hastalarında *S. aureus* KKV prevalansının yüksek olduğu bildirilmektedir. *S. aureus* KKV yavaş üreme göstermeleri nedeniyle normal fenotip gösteren *S. aureus* suşlarına göre daha küçük, pigmentsiz, hemolizsiz koloniler oluşturmaktadırlar. Bu çalışmada Hacettepe Üniversitesi Çocuk Göğüs Hastalıkları bölümüne başvuran KF hastalarından alınan balgam ve boğaz sürüntüsü örnekleri prospektif olarak incelenerek, bu hasta grubundaki *S. aureus* KKV sıklığı ve bunların fenotipik ve genotipik özelliklerinin saptanması amaçlanmıştır.

Çalışmaya Şubat 2007- Ocak 2008 tarihleri arasında takip edilen 248 hastadan alınan toplam 519 örnek dahil edilmiştir. Değerlendirilen 248 hastanın 20'sinde (% 8,1) ve incelenen örneklerin 32'sinde (% 6,4) *S. aureus* KKV saptanmıştır. Yirmi farklı hastadan toplam 48 adet *S. aureus* KKV izole edilmiştir. Bunların 6 tanesi 'iğne ucu' koloni, 6 tanesi 'sahanda yumurta' şeklinde görülen koloni oluştururken, kalan 36 suş küçük koloni şeklinde gözlenmiştir. Çalışmada en yüksek *S. aureus* KKV izolasyonunun mannitol tuzlu agarda olduğu, bunu % 5 sodyum klorürlü beyin-kalp infüzyon agarı (BKIA-% 5 NaCl) nın izlediği saptanmıştır. Okzotrofizm deneyleri sonucunda 48 suştan altısının timidine gereksinimi olduğu belirlenmiş, bu altı suştan bir tanesinin aynı zamanda hemine de gereksinimi olduğu saptanmıştır. Menadion gereksinimine rastlanmamıştır. Timidine bağımlı bulunan altı suşun beşini "sahanda yumurta" şeklinde koloni yapan suşların oluşturması dikkati çekmiştir.

Kırksekiz *S. aureus* KKV ve eş zamanlı olarak izole edilen normal fenotipik görünümdeki 33 *S. aureus* suşlarının oksasilin, gentamisin, trimetoprim-sülfametoksazol, vankomisin,

siprofloksasin, linezolid ve tigesiklin için antibiyotik duyarlılıkları incelenmiştir. Çalışmamızdaki *S. aureus* KKV suşları, eş zamanlı olarak izole edilen normal fenotipteki *S. aureus* suşlarına kıyasla daha yüksek antibiyotik direnci göstermiş, ancak aradaki fark tigesiklin hariç olmak üzere istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Tigesiklin duyarlılığının *S. aureus* KKV'nda ilk kez değerlendirildiği çalışmamızda bu antibiyotik için MİK değerleri normal fenotipteki *S. aureus* suşlarına kıyasla daha yüksek olarak saptanmıştır.

Her hastanın izole edilen tüm *S. aureus* KKV ve eş zamanlı olarak izole edilen normal fenotipik görünümdeki *S. aureus* suşlarının genetik yakınlıkları, PFGE yöntemi ile genotiplendirmesi yapılarak belirlenmiştir. Bir grup hastada, *S. aureus* KKV ve normal fenotipteki *S. aureus* suşlarının genotipik olarak birbirleri ile aynı olduğu belirlenirken, diğer bir grup hastada *S. aureus* KKV ve normal fenotipteki *S. aureus* suşlarının farklı genotiplere sahip olduğu saptanmıştır. Hastaların takip eden örnekleri de birlikte değerlendirildiğinde, her hastadaki normal fenotipteki *S. aureus* ve/veya KKV suşlarının zaman içerisinde genetik değişikliğe uğrayabileceği ve farklı bir genotipin ortaya çıkabileceği gösterilmiştir. Bu sonuçlar, *S. aureus* KKV ve normal fenotipteki *S. aureus* suşlarının KF hastalarındaki evrimi sırasında, farklı fenotip ve genotipe dönüşebileceğini göstermiştir.

Bu çalışma ülkemizdeki KF hastalarında *S. aureus* KKV prevalansının, fenotipik ve genotipik özelliklerinin değerlendirildiği ilk çalışmadır. Antibiyotiklere daha dirençli olmaları ve hücre içi öldürmeye direnç eğilimi göstermeleri nedeniyle *S. aureus* KKV'nın, KF hasta grubu başta olmak üzere özellikle kronik enfeksiyonlarda, mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen klinik örneklerin incelenmesi sırasında göz önünde bulundurulması ve rapor edilmesi kritik bir önem kazanmaktadır.

7. SUMMARY

Cystic fibrosis (CF) patients frequently have chronic respiratory tract infections. It is reported that the prevalence of *S. aureus* small colony variants (SCVs) in CF patients is high. As they are fastidious microorganisms, SCVs grow as non-hemolytic, non-pigmented, and very small colonies when compared to *S. aureus*. In this study, the sputum and throat swab specimens of CF patients admitted to the Pediatric Pulmonology Unit of Hacettepe University Pediatric Hospital, were examined prospectively. We aimed to determine the prevalence of SCVs, their phenotypical and genotypical properties in CF patient group.

The study comprised of 519 samples obtained from 248 patients during the period of February 2007 and January 2008. SCVs were detected in 20 of the 248 patients (8,1%) and in 32 (6,4%) of the samples examined. A total of 48 SCVs were isolated from 20 different patients. Six of the SCV strains formed pin-point colonies, six formed fried-egg colonies and the remaining 36 strains formed small colonies. In this study it was determined that the highest SCV isolation was detected in mannitol salt agar which was followed by brain-heart infusion agar with 5% NaCl (BHIA- 5% NaCl). Auxotrophism for thymidine is demonstrated in six of 48 *S. aureus* SCVs. Auxotrophy for thymidine plus hemin was found in one of these six strains. No auxotrophy for menadione was demonstrated. It was interesting that, five of the six thymidine auxotrophic strains revealed fried-egg colony formation.

Antibiotic susceptibility of the 48 SCVs and simultaneously isolated 33 *S. aureus* strains were determined for oxacillin, gentamicin, trimethoprim-sulfamethoxazole vancomycin, ciprofloxacin, linezolid and tigecycline. Although statistically insignificant, SCV strains isolated in this study showed higher

antibiotic resistance when compared to simultaneously isolated normal *S. aureus* strains, except for tigecycline. Tigecycline susceptibility of SCV strains was evaluated for the first time in this study and the results showed that MIC values for tigecycline were higher than normal *S.aureus* isolates.

The genetic relatedness between SCV and normal *S.aureus* strains isolated from each patient was determined by PFGE method. While SCVs and normal *S. aureus* isolates revealed identical genotypes in a group of patients, some isolates exhibited different genotypes in the other group of patients. The longitudinal follow-up of these patients led to the observation that the SCV and/or the normal *S.aureus* strains in each patient may undergo genetic changes and end-up with the formation of different genotypes. These results revealed that SCVs and normal *S. aureus* strains might transform into different phenotypes and genotypes during their evolution in the airways of CF patients.

This study is the first study which examined *S. aureus* SCVs' prevalence, their phenotypical and genotypical characteristics in CF patients in Turkey. Since they are more resistant to antibiotics and have a tendency to resist intracellular killing, it is important to consider and report *S. aureus* SCVs in chronic infections such as CF. Thus it is of crucial importance to evaluate clinical samples for these variants in clinical microbiology laboratories.

8. KAYNAKLAR

1. Looney WJ. Small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. Br J Biomed Sci. 2000; 57: 317-22.
2. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med. 1998; 339: 520-32.
3. Balwit JM, van Langevelde P, Vann JM, Proctor RA. Gentamicin-resistant menadione and hemin auxotrophic *Staphylococcus aureus* persist within cultured endothelial cells. J Infect Dis. 1994; 170: 1033-7.
4. Proctor RA, van Langevelde P, Kristjansson M, Maslow JN, Arbeit RD. Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis. 1995; 20: 95-102.
5. Besier S, Smaczny C, von Mallinckrodt C, Krahl A, Ackermann H, Brade V, Wichelhaus TA. Prevalence and clinical significance of *Staphylococcus aureus* small-colony variants in cystic fibrosis lung disease. J Clin Microbiol. 2007; 45: 168-72.
6. Proctor RA, von Eiff C, Kahl BC, Becker K, McNamara P, Herrmann M, Peters G. Small colony variants: a pathogenic form of bacteria that facilitates persistent and recurrent infections. Nat Rev Microbiol. 2006; 4: 295-305.
7. Acar JF, Goldstein FW, Lagrange P. Human infections caused by thiamine- or menadione-requiring *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 1978; 8: 142-7.
8. Kahl B, Herrmann M, Everding AS, Koch HG, Becker K, Harms E, Proctor RA, Peters G. Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. J Infect Dis. 1998; 177: 1023-9.

9. Kahl BC, Duebbers A, Lubritz G, Haeberle J, Koch HG, Ritzerfeld B, Reilly M, Harms E, Proctor RA, Herrmann M, Peters G. Population dynamics of persistent *Staphylococcus aureus* isolated from the airways of cystic fibrosis patients during a 6-year prospective study. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 4424-7.
10. Proctor RA, Peters G. Small colony variants in staphylococcal infections: diagnostic and therapeutic implications. *Clin Infect Dis.* 1998; 27: 419-22.
11. Proctor RA, Bates DM, McNamara PJ. Electron transport-deficient *Staphylococcus aureus* small-colony variants as emerging pathogens. *Emerging infections.* Scheld WM, Craig WA, Hughes JM, Editors. 2001; ASM press: Washington D. C. 95-110.
12. Swingle EL. Studies on small colony variants of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 1935; 29: 467-89.
13. Proctor R. Bacterial energetics and antimicrobial resistance. *Drug Resist Updates.* 1998; 1: 227-35.
14. Proctor RA, Kahl B, von Eiff C, Vaudaux PE, Lew DP, Peters G. Staphylococcal small colony variants have novel mechanisms for antibiotic resistance. *Clin Infect Dis.* 1998; 27 Suppl 1: S68-74.
15. Spearman P, Lakey D, Jotte S, Chernowitz A, Claycomb S, Stratton C. Sternoclavicular joint septic arthritis with small-colony variant *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1996; 26: 13-5.
16. Seifert H, von Eiff C, Fatkenheuer G. Fatal case due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* small colony variants in an AIDS patient. *Emerg Infect Dis.* 1999; 5: 450-3.
17. von Eiff C, Bettin D, Proctor RA, Rolauffs B, Lindner N, Winkelmann W, Peters G. Recovery of small colony variants of

- Staphylococcus aureus* following gentamicin bead placement for osteomyelitis. Clin Infect Dis. 1997; 25: 1250-1.
18. Kipp F, Ziebuhr W, Becker K, Krimmer V, Hobeta N, Peters G, Von Eiff C. Detection of *Staphylococcus aureus* by 16S rRNA directed in situ hybridisation in a patient with a brain abscess caused by small colony variants. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2003; 74: 1000-2.
 19. Rolauffs B, Bernhardt TM, von Eiff C, Hart ML, Bettin D. Osteopetrosis, femoral fracture, and chronic osteomyelitis caused by *Staphylococcus aureus* small colony variants (SCV) treated by girdlestone resection--6-year follow-up. Arch Orthop Trauma Surg. 2002; 122: 547-50.
 20. von Eiff C, Lindner N, Proctor RA, Winkelmann W, Peters G. Development of gentamicin-resistant small colony variants of *S. aureus* after implantation of gentamicin chains in osteomyelitis as a possible cause of recurrence. Z Orthop Ihre Grenzgeb. 1998; 136: 268-71.
 21. Sadowska B, Bonar A, von Eiff C, Proctor RA, Chmiela M, Rudnicka W, Rozalska B. Characteristics of *Staphylococcus aureus*, isolated from airways of cystic fibrosis patients, and their small colony variants. FEMS Immunol Med Microbiol. 2002; 32: 191-7.
 22. von Eiff C, Becker K, Metze D, Lubritz G, Hockmann J, Schwarz T, Peters G. Intracellular persistence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants within keratinocytes: a cause for antibiotic treatment failure in a patient with Darier's disease. Clin Infect Dis. 2001; 32: 1643-7.
 23. Seifert H, Wisplinghoff H, Schnabel P, von Eiff C. Small colony variants of *Staphylococcus aureus* and pacemaker-related infection. Emerg Infect Dis. 2003; 9: 1316-8.

24. Abele-Horn M, Schupfner B, Emmerling P, Waldner H, Goring H. Persistent wound infection after herniotomy associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Infection*. 2000; 28: 53-4.
25. Adler H, Widmer A, Frei R. Emergence of a teicoplanin-resistant small colony variant of *Staphylococcus epidermidis* during vancomycin therapy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2003; 22: 746-8.
26. von Eiff C, Lubritz G, Heese C, Peters G, Becker K. Effect of trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis in AIDS patients on the formation of the small colony variant phenotype of *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004; 48: 191-4.
27. Spanu T, Romano L, D'Inzeo T, Masucci L, Albanese A, Papacci F, Marchese E, Sanguinetti M, Fadda G. Recurrent ventriculoperitoneal shunt infection caused by small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis*. 2005; 41: e48-52.
28. Salgado DR, Bozza FA, Pinto M, et al. Outbreak with small colony variants of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an ICU. in 41. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 16-19 December 2001. Chicago.
29. Bates DM, von Eiff C, McNamara PJ, Peters G, Yeaman MR, Bayer AS, Proctor RA. *Staphylococcus aureus* menD and hemB mutants are as infective as the parent strains, but the menadione biosynthetic mutant persists within the kidney. *J Infect Dis*. 2003; 187: 1654-61.
30. Kohler C, von Eiff C, Peters G, Proctor RA, Hecker M, Engelmann S. Physiological characterization of a heme-deficient mutant of *Staphylococcus aureus* by a proteomic approach. *J Bacteriol*. 2003; 185: 6928-37.

31. Vergison A, Denis O, Deplano A, Casimir G, Claeys G, DeBaets F, DeBoeck K, Douat N, Franckx H, Gigi J, Ieven M, Knoop C, Lebeque P, Lebrun F, Malfroot A, Paucquay F, Pierard D, Van Eldere J, Struelens MJ. National survey of molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* colonization in Belgian cystic fibrosis patients. J Antimicrob Chemother. 2007; 59: 893-9.
32. Sendi P, Rohrbach M, Graber P, Frei R, Ochsner PE, Zimmerli W. *Staphylococcus aureus* small colony variants in prosthetic joint infection. Clin Infect Dis. 2006; 43: 961-7.
33. McNamara PJ, Proctor RA. *Staphylococcus aureus* small colony variants, electron transport and persistent infections. Int J Antimicrob Agents. 2000; 14: 117-22.
34. Baldwin JE, Krebs H. The evolution of metabolic cycles. Nature. 1981; 291: 381-2.
35. Collins M, Jones, D. Distribution of isoprenoid quinone structure types in bacteria and their taxonomic implications. Microbiol Rev. 1981; 45: 316-54.
36. Tien W, White DC. Linear sequential arrangement of genes for the biosynthetic pathway of heme in *Staphylococcus aureus*. Proc Natl Acad Sci USA. 1968; 61: 1392-8.
37. Goldenbaum PE, White DC. Role of lipid in the formation and function of the respiratory system of *Staphylococcus aureus*. Ann NY Acad Sci. 1974; 236: 115-23.
38. Lewis L, Li K, Bharosay M, Cannella M, Jorgenson V, Thomas R, Pena D, Velez M, Pereira B, Sassine A. Characterization of gentamicin-resistant respiratory-deficient (Res^-) variant strains of *Staphylococcus aureus*. Microbiol Immunol. 1990; 34: 587-605.

39. Kaplan ML, Dye W. Growth requirements of some small-colony-forming variants of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 1976; 4: 343-8.
40. von Eiff C, Heilmann C, Proctor RA, Woltz C, Peters G, Gotz F. A site-directed *Staphylococcus aureus hemB* mutant is a small-colony variant which persists intracellularly. J Bacteriol. 1997; 179: 4706-12.
41. Proctor RA, Balwit JM, Vesga O. Variant subpopulations of *Staphylococcus aureus* as cause of persistent and recurrent infections. Infect Agents Dis. 1994; 3: 302-12.
42. Kafala B, Sasarman A. Cloning and sequence analysis of the hemB gene of *Staphylococcus aureus*. Can J Microbiol. 1994; 40: 651-7.
43. Baumert N, von Eiff C, Schaaff F, Peters G, Proctor RA, Sahl HG. Physiology and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* small colony variants. Microb Drug Resist. 2002; 8: 253-60.
44. Miller MH, Edberg SC, Mandel LJ, Behar FC, Steigbigel NH. Gentamicin uptake in wild type and aminoglycoside-resistant small colony mutants of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 1980; 18: 722-29.
45. Koo SP, Bayer AS, Sahl HG, Proctor RA, Yeaman MR. Staphylocidal action of thrombin-induced platelet microbicidal protein (tPMP) is not solely dependent on transmembrane potential. Infect Immun. 1996; 64: 1070-74.
46. von Eiff C, Friedrich AW, Becker K, Peters G. Comparative in vitro activity of ceftobiprole against staphylococci displaying normal and small-colony variant phenotypes. Antimicrob Agents Chemother. 2005; 49: 4372-74.
47. Stryer L. Biochemistry. 1995; Freeman and Company: New York. 739-62.

48. Chatterjee I, Kriegeskorte A, Fischer A, Deiwick S, Theimann N, Proctor RA, Peters G, Herrmann M, Kahl BC. In vivo mutations of thymidylate synthase (encoded by *thyA*) are responsible for thymidine dependency in clinical small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2008; 190: 834-42.
49. Kahl BC, Belling G, Becker P, Chatterjee I, Wardecki K, Hilgert K, Cheung AL, Peters G, Herrmann M. Thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* small-colony variants are associated with extensive alterations in regulator and virulence gene expression profiles. *Infect Immun.* 2005; 73: 4119-26.
50. Vann JM, Proctor RA. Cytotoxic effects of ingested *Staphylococcus aureus* on bovine endothelial cells: role of *S. aureus* α -hemolysin. *Microb Pathog.* 1998; 4: 443-53.
51. Vesga O, Groeschel MC, Otten MF, Brar DW, Vann JM, Proctor RA. *Staphylococcus aureus* small colony variants are induced by the endothelial cell intracellular milieu. *J Infect Dis.* 1996; 173: 739-42.
52. Proctor A. Microbial pathogenic factors: small colony variants. Infections associated with indwelling medical devices. Bisno A, Waldvogel, FA, Editor. 1994; American Society for Microbiology: Washington, DC. 77-90.
53. Vaudaux P, Francois P, Bisognano C, Kelley WL, Lew DP, Schrenzel J, Proctor RA, McNamara PJ, Peters G, von Eiff C. Increased expression of clumping factor and fibronectin-binding proteins by *hemB* mutants of *Staphylococcus aureus* expressing small colony variant phenotypes. *Infect Immun.* 2002; 70: 5428-37.
54. Pelletier LL, Jr, Richardson M, Feist M. Virulent gentamicin-induced small colony variants of *Staphylococcus aureus*. *J Lab Clin Med.* 1979; 94: 324-34.

55. Musher DM, Baughn RE, Templeton GB, Minuth JN. Emergence of variant forms of *Staphylococcus aureus* after exposure to gentamicin and infectivity of the variants in experimental animals. *J Infect Dis.* 1977; 136: 360-69.
56. Brouillette E, Martinez A, Boyll BJ, Allen NE, Malouin F. Persistence of a *Staphylococcus aureus* small-colony variant under antibiotic pressure in vivo. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2004; 41: 35-41.
57. Miller MH, Wexler MA, Steigbigel NH. Single and combination antibiotic therapy of *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis: emergence of gentamicin-resistant mutants. *Antimicrob Agents Chemother.* 1978;14: 336-43.
58. Jonsson IM, von Eiff C, Proctor RA, Peters G, Ryden C, Tarkowski A. Virulence of a hemB mutant displaying the phenotype of a *Staphylococcus aureus* small colony variant in a murine model of septic arthritis. *Microb Pathog.* 2003; 34: 73-9.
59. von Eiff C, Peters G, Becker K. The small colony variant (SCV) concept - the role of staphylococcal SCVs in persistent infections. *Injury.* 2006; 37 Suppl 2: 26-33.
60. Salgado DR BF, Pinto M, et al. Outbreak with small colony variants of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an ICU. in 41. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 16-19 December 2001. Chicago.
61. Gilligan PH, Gage PA, Welch DF, Muszynski MJ, Wait KR. Prevalence of thymidine-dependent *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 1987; 25: 1258-61.
62. von Eiff C, Becker K. MRSA: Current Perspectives. Fluit AC, Schmitz FJ, Editors. 2003; Caister Academic: Wymondham. 253-73.

63. Kahl BC, Belling G, Reichelt R, Herrmann M, Proctor RA, Peters G. Thymidine-dependent small-colony variants of *Staphylococcus aureus* exhibit gross morphological and ultrastructural changes consistent with impaired cell separation. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 410-3.
64. Kipp F, Kahl BC, Becker K, Baron EJ, Proctor RA, Peters G, von Eiff C. Evaluation of two chromogenic agar media for recovery and identification of *Staphylococcus aureus* small-colony variants. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 1956-9.
65. Becker K, Harmsen D, Mellmann A, Meier C, Schumann P, Peters G, von Eiff C. Development and evaluation of a quality-controlled ribosomal sequence database for 16S ribosomal DNA-based identification of *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 4988-95.
66. Kipp F, Becker K, Peters G, von Eiff C. Evaluation of different methods to detect methicillin resistance in small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 1277-9.
67. Winn W, Jr, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Collection of specimens for the diagnosis of lower respiratory infection. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.* Montalbano J, Editor. 2006; Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia. 76-77.
68. Hammerschlag MR, Harding L, Macone A, Smith AL, Goldmann DA. Bacteriology of sputum in cystic fibrosis: evaluation of dithiothreitol as a mucolytic agent. *J Clin Microbiol.* 1980; 11: 552-557.
69. Brooks GF BJ, Morse SA. *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology.* 2004; The McGraw-Hill Companies: Columbus OH ,USA.

70. Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the *nuc* gene. J Clin Microbiol. 1992; 30: 1654-60.
71. Shortle D. A genetic system for analysis of staphylococcal nuclease. Gene. 1983; 22: 181-189.
72. Goering RV, Winters MA. Rapid method for epidemiological evaluation of gram-positive cocci by field inversion gel electrophoresis. J Clin Microbiol. 1992; 30: 577-80.
73. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting Chromosomal DNA Restriction Patterns Produced by Pulsed-Field Gel Electrophoresis: Criteria for Bacterial Strain Typing. J Clin Microbiol. 1995; 33: 2233-2239.
74. Burch LH, Talbot CR, Knowles MR, Canessa CM, Rossier BC, Boucher RC. Relative expression of the human epithelial Na⁺ channel subunits in normal and cystic fibrosis airways. Am J Physiol. 1995; 269: 511-518.
75. David P. Pathophysiology of the lung disease in cystic fibrosis. Lung biology in health and disease. 1993; Marcel Dekker: New York. 193-218.
76. Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2003; 168: 918-951.
77. Steinkamp G, Wiedemann B, Rietschel E, Krahl A, Gielen J, Barmeier H, Ratjen F. Prospective evaluation of emerging bacteria in cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2005; 4: 41-48.
78. Goss CH, Mayer-Hamblett N, Aitken ML, Rubenfeld GD, Ramsey BW. Association between *Stenotrophomonas maltophilia* and lung function in cystic fibrosis. Thorax. 2004; 59: 955-959.

79. Hoffman LR, Deziel E, D'Argenio DA, Lepine F, Emerson J, McNamara S, Gibson RL, Ramsey BW, Miller SI. Selection for *Staphylococcus aureus* small-colony variants due to growth in the presence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103: 19890-5.
80. Perry JD, Rennison C, Butterworth LA, Hopley AL, Gould FK. Evaluation of *S. aureus* ID, a new chromogenic agar medium for detection of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol*. 2003; 41: 5695–5698.
81. Murray PR et al. *Manual of clinical microbiology*. 2007; ASM Press: Washington DC.
82. Pan XS, Hamlyn PJ, Talens-Visconti R, Alovero FL, Manzo RH, Fisher LM. Small-colony mutants of *Staphylococcus aureus* allow selection of gyrase-mediated resistance to dual-target fluoroquinolones. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002; 46: 2498-506.
83. Schaaff F, Bierbaum G, Baumert N, Bartmann P, Sahl HG. Mutations are involved in emergence of aminoglycoside-induced small colony variants of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol*. 2003; 293: 427-35.