

171968

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

**STAPHYLOCOCCUS AUREUS KLİNİK İZOLATLARINDA  
METİSİLİN DİRENCİNİN BELİRLENMESİNDE FARKLI  
YÖNTEMLERİN KARŞILAŞTIRILMASI**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. MURAT TELLİ

DANIŞMAN  
Prof. Dr. A. BÜLENT SÜMERKAN

KAYSERİ -2005

## 2.1. TEŞEKKÜR

Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Yusuf Özbal başta olmak üzere eğitimim süresince katkı ve desteklerini esirgemeyen tüm öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Tez çalışmamda ve uzmanlık eğitimim süresince, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım tez danışmanım Prof. Dr. A. Bülent Sümerkan' a yardımları için teşekkür ederim.

Tez çalışmamda ve eğitimimde bana destek olan Yard. Doç. Dr. Duygu Eşel'e teşekkür ederim.

Tezimi çalışmamda yardımcı olan Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Munis Dünder ve tıbbi genetik laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Tezimi çalıştığım sürece ve eğitimim boyunca birlikte çalıştığım, yardımlarını gördüğüm asistan arkadaşlarıma ve laboratuvarlar çalışanlarına teşekkür ederim.

## 2.2. İÇİNDEKİLER

2.1. TEŞEKKÜR.....	i
2.3. KISALTMALAR.....	iv
2.4. TABLO LİSTESİ.....	v
2.5. ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
2.6. ÖZET.....	vii
2.7. ABSTRACT.....	ix
3.1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
3.2. GENEL BİLGİLER.....	3
3.2.1. Mikrobiyolojik özellikler.....	4
3.2.2. Patogenez ve virulans faktörleri.....	5
3.2.3. Epidemiyoloji.....	7
3.2.4. Metisiline direnç mekanizmaları.....	8
3.2.4.1. <i>mec</i> DNA.....	8
3.2.4.2. <i>mecA</i> .....	9
3.2.4.3. <i>mec</i> ile ilişkili DNA.....	10
3.2.4.4. Heterojen direnç.....	10
3.2.4.5. Borderline direnç.....	11
3.2.4.6. Direnç fenotipini etkileyen faktörler.....	12
3.2.5. Metisilin direncini belirleme yöntemleri.....	13
3.2.5.1. Disk difüzyon.....	13
3.2.5.2. Dilüsyon testleri.....	13
3.2.5.3. Agar tarama.....	14
3.2.5.4. Lateks aglütinasyon.....	14
3.2.5.5. Diğer testler.....	14
3.2.5.6. PZR.....	14
3.2.6. Antimikrobiyal tedavi.....	15
3.2.6.1. Beta laktam antibiyotikler.....	15
3.2.6.2. Glikopeptid antibiyotikler.....	15
3.2.6.3. Fluorokinolonlar.....	15
3.2.6.4. Trimetoprim-Sulfametoksazol.....	15
3.2.6.5. Rifampin.....	16

3.2.6.6. Aminoglikozidler.....	16
3.2.6.7. Sinersid (kinupristin- dalfopristin).....	16
3.2.6.8. Mupirosin.....	16
3.2.6.9. Diğer ajanlar.....	16
3.3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	17
3.3.1. Bakteri identifikasyonu.....	17
3.3.2. Metisilin direncini belirleme yöntemleri.....	17
3.3.2.1. Disk difüzyon yöntemi.....	17
3.3.2.2. Oksasilin agar tarama yöntemi.....	18
3.3.2.3. PBP2a lateks aglütinasyon test yöntemi.....	18
3.3.2.4. PZR ile <i>mecA</i> geninin gösterilmesi.....	18
3.3.3. İstatistik.....	19
3.4. BULGULAR.....	21
3.5. TARTIŞMA.....	25
3.6. SONUÇLAR.....	34
4. KAYNAKLAR.....	35

## 2.3. KISALTMALAR

<b>MRSA</b>	: Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>PZR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>ABD</b>	: Amerika Birleşik Devletleri
<b>NNIS</b>	: National Nosocomial Infection Surveillance
<b>PBP</b>	: Penisilin bağlayan protein
<b>MİK</b>	: Minimal inhibitör konsantrasyon
<b>BORSA</b>	: “Borderline” metisiline dirençli <i>S. aureus</i>
<b>NCCLS</b>	: National Commitee for Clinical Laboratory Standards
<b>VRSA</b>	: Vankomisine dirençli <i>S. aureus</i>
<b>PCR</b>	: Polymerase chain reaction



## 2.4. TABLO LİSTESİ

	<b>Sayfa no</b>
Tablo 1:	Stafilokokların neden olduğu infeksiyonlar.....3
Tablo 2:	<i>S.aureus'</i> un tanımlanmasında kullanılan anahtar testler.....5
Tablo 3:	<i>S. aureus'</i> un virülansına etkili enzimler.....7
Tablo 4:	<i>S. aureus'</i> un virülansına etkili toksinler.....7
Tablo 5:	<i>S.aureus</i> suşlarının izole edildiği klinik örnekler.....21
Tablo 6:	Disk difüzyon ve <i>mecA</i> geni dağılımı.....22
Tablo 7:	Oksasilin agar tarama ve <i>mecA</i> geni dağılımı.....22
Tablo 8:	Lateks aglütinasyon ve <i>mecA</i> geni dağılımı.....23
Tablo 9:	Yöntemlerin istatistiksel analizi.....23
Tablo10.	MRSA'larda fenotipik sınıflama.....27
Tablo11.	Felten ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma sonuçları.....31
Tablo12.	Cauwelier ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma bulguları.....31

## 2.5. ŞEKİL LİSTESİ

	<b>sayfa no</b>
Şekil 1: mec DNA.....	9
Şekil 2: mecA bantları.....	24

## 2.6. ÖZET

### **Amaç:**

MRSA nozokomiyal patojen olarak mortalite ve morbiditenin majör nedenlerinden biridir. MRSA infeksiyonlarının etkin tedavisi ve glikopeptidlerin aşırı kullanımının önlenmesi bu suşların zamanında ve doğru tanımlanmasına bağlıdır. Metisiline direncin heterojen olması, düşük seviyede dirençli suşların ayırımının zorluğu geleneksel duyarlılık testlerinin bu direnci belirlemede yetersiz kalmasına neden olmuştur. MRSA tespitinde altın standart düşük affiniteli penisilin bağlayan proteini (PBP2a) kodlayan *mecA* geninin gösterilmesidir. Bu çalışmada metisilin direncinin belirlenmesinde kullanılan PBP2a latex aglutinasyon, oksasilin agar tarama, PZR ile *mecA* gösterilmesi ve oksasilin disk difüzyon yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

### **Gereç ve yöntem:**

Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Hastanesi Bakteriyoloji Laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 300 *S. aureus* suşu çalışmaya alındı. Bakteri identifikasyonu için koloni morfolojisi, gram boyama, katalaz reaksiyonu yanı sıra trehaloz-mannitol, DNaz, koagulaz ve clumping faktör testleri yapıldı. Disk difüzyon ve oksasilin agar tarama yöntemleri National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) kılavuzu standartlarına göre yapıldı.



PBP2a lateks aglütinasyon test yöntemi ticari firmanın (Denka-Seiken Co.,Ltd., Tokyo, Japan) önerileri doğrultusunda yapıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu ile *mecA* geni gösterildi.

**Bulgular:**

Testlerden elde edilen bulgular tablo 1de özetlendi

**Tablo 1.**

	<i>mecA</i> (+)		<i>mecA</i> (-)	
	MSSA	MRSA	MSSA	MRSA
DİSK DİFÜZYON	2	179	118	1
AGAR TARAMA	2	179	117	2
PBP2a LATEKS AGLÜTİNASYON	4	177	116	3

Disk diffüzyon, oksasilin agar tarama ve lateks aglütinasyon yöntemlerinin istatistiksel analizi tablo 2’de özetlendi.

**Tablo 2.**

	Duyarlılık	Özgüllük	(+)yorumlama gücü	(-) yorumlama gücü
Disk difüzyon	%98,8	%99,1	%99,4	%98,3
Oksasilin agar tarama	%98,8	%98,3	%98,8	%98,3
PBP2a Lateks aglütinasyon	%97,7	%97,4	%98,3	%96,6

**Sonuç:**

Çalışmada test edilen yöntemler özgüllük ve duyarlılık açısından birbirine yakın bulunmuştur. Bu yöntemlerden, PBP2a lateks aglütinasyon testi en düşük duyarlılık ve özgüllüktedir.

**Anahtar kelimeler:** Metisilin direnci, *S. aureus*, disk difüzyon, oksasilin agar tarama,PBP2a lateks aglütinasyon, PZR

# **COMPARISON OF DIFFERENT METHODS FOR DETECTION OF METHICILLIN RESISTANCE IN CLINICAL ISOLATES OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

## **2.7. ABSTRACT**

### **Aim:**

As a nosocomial pathogen, MRSA is a major cause of morbidity and mortality. Effective treatment and prevention of extremely use of glycopeptid antibiotics depend on the detection of these strains timely and correctly. The detection of resistance in MRSA has been difficult by using conventional susceptibility tests because resistance is heterogeneous and detection of low-level resistant strains is difficult. Detection of *mecA* gene encoding low affinity penicilin binding protein (PBP2a) by PCR is the gold standart test in MRSA detection. The aim of the study is to compare latex agglutination test, oxacillin agar screen and disk diffusion metod with gold standart test.

### **Materials and methods:**

Three hundred *S. aureus* strains isolated from various clinical specimens in Erciyes University Gevher Nesibe Hospital Bacteriology Laboratory were studied.

The strains were identified using, trehaloz-mannitol, DNase, coagulase, clumping factor tests in addition to colony appearance, gram stain and catalase reaction. Disk diffusion and oxacillin agar screen tests were performed according to National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recommendations. PBP2a latex agglutination test was used according to the manufacturer's (Denka-Seiken Co.,Ltd., Tokyo, Japan) instructions. *mecA* gene is demonstrated by PCR.

**Result:**

Tests results summarized in table 1.

**Table 1.**

	<i>mecA</i> (+)		<i>mecA</i> (-)	
	MSSA	MRSA	MSSA	MRSA
DISK DIFFUSION	2	179	118	1
OXACILIN AGAR SCREEN	2	179	117	2
PBP2a LATEX AGGLUTINATION	4	177	116	3

Statistical analysis of tests demonstrated in table 2.

**Table 2.**

	Sensitivity	Specificity	Positive predictive value	neagtive predictive value
Disk diffusion	%98,8	%99,1	%99,4	%98,3
Oxacillin agar screen	%98,8	%98,3	%98,8	%98,3
PBP2a latex agglutination	%97,7	%97,4	%98,3	%96,6

**Conclusion:**

In conclusion all of the methods tested in this study were found similar in regards of sensitivity and specificity. PBP2a latex agglutination test is the lowest sensitivity and specificity in these methods.

**Key words:** Methicillin resistance, *S. aureus*, disk diffusion, oxacillin agar screen, PBP2a latex agglutination, PCR

### 3.1. GİRİŞ VE AMAÇ

*Staphylococcus aureus*, nozokomiyal patojen olarak mortalite ve morbiditenin majör nedenlerinden biridir. *S. aureus*, akut ve piyojenik infeksiyon oluşturur. Deri ve yumuşak doku infeksiyonu, postoperatif yara infeksiyonu, bakteriyemi, toksik şok sendromu, pnömoni, akut endokardit, miyokardit, osteomyelit, menenjit, ürogenital sistem infeksiyonu, santral sinir sistemi ve intraabdominal organlarda apseler içeren birçok infeksiyonu oluşturabilmektedir. İnfeksiyon tedavi edilmezse *S. aureus* kökenleri bakteriyemi ve çevre dokulara yayılım sonucu metastatik infeksiyonlara neden olabilirler (1).

Bindokuzyüzkırk'larda penisilinin kullanıma girmesi ile stafilokok infeksiyonlarının tedavisinde geçici bir çözüm bulunmuş fakat bu antibiyotiğin aşırı kullanımı sonucu kısa sürede penisilnaz üretimine bağlı direnç gelişmiştir. Bugün ise hastaneden izole edilen *S. aureus*' ların hemen hemen hepsinde bu direnç mevcuttur (2,3).

Bindokuzyüzatmış'lara gelindiğinde beta laktamlara dirençli yarı sentetik penisilinler (metisilin, oksasilin, nafsilin, dikloksasilin, kloksasilin ve floksasilin) bulunmuş ama bunlara da birkaç yıl sonra direnç gelişmiştir (2,3). Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşları sefalosporinler dahil tüm beta laktam antibiyotiklere dirençlidirler (4). Bu suşlarda ayrıca aminoglikozidler, makrolidler ve kinolonları içeren çoğul direnç mevcuttur (3,4). MRSA hastanelerde, bakımevlerinde ve diğer koruyucu sağlık birimlerinde önemli bir problem oluşturmaktadır (5).

MRSA sıklıkla nozokomiyal bir patojendir. Bunlara bağlı infeksiyonların tedavisinde kullanılabilen antimikrobiyal ajan sayısı çok kısıtlıdır. (6). MRSA infeksiyonlarının etkili tedavisi ve glikopeptidlerin aşırı kullanımının önlenmesi bu suşların zamanında ve doğru tanımlanmasına bağlıdır (7,8).

Metisiline direncin heterojen olması, düşük seviyede dirençli suşların ayırımının zorluğu geleneksel duyarlılık testlerinin bu direnci belirlemede yetersiz kalmasına neden olmuştur (1,3,4,7,8). MRSA tespitinde "altın standart" düşük affiniteli penisilin bağlayan proteini kodlayan (PBP2a) *mecA* geninin gösterilmesidir (5,9-14). Bu çalışmada metisilin direncinin belirlenmesinde kullanılan PBP2a latex aglutinasyon, oksasilin agar tarama, PZR ile *mecA* gösterilmesi ve oksasilin disk diffüzyon yöntemlerinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

## 3.2. GENEL BİLGİLER

Stafilokoklar insanda infeksiyon etkeni olarak en sık izole edilen mikroorganizmalardan biridir. (4). Dokularda apse oluşumu, bakteriyemi sonucu metastatik infeksiyonlar ve toksinleri ile hastalık meydana getirirler (15,16). Tablo 1 de stafilokokların neden olduğu çeşitli infeksiyonlar görülmektedir.

### Tablo 1. Stafilokokların neden olduğu infeksiyonlar (16)

1. Taşıyıcılık; burun, nazofarenks, deri, vajen, aksilla, perine vs.

2. Direkt infeksiyon;

Deri; follikülit, karbonkül, impetigo, hidradenit, sellülit, yara enfeksiyonu (cerrahi veya cerrahi dışı ), apse v.s.

Genellikle travma, cerrahi ve yabancı cisim sonrası gelişen derin infeksiyonlar; bursit, artrit, osteomyelit

3. Lokal sekonder gelişen bakteriyemi ile giden infeksiyonlar; Bakteriyemi/sepsis, Metastatik infeksiyon, Vaskülit ve koagülopati

Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu, çoğul organ yetmezliği

Metastatik infeksiyon; artrit, osteomyelit, menenjit, endokardit,

perikardit, akciğer apsesi, piyomiyozit v.s

4. Toksinle ilişkili hastalıklar; Besin zehirlenmesi, soyulmuş deri sendromu çoğul organ yetmezliği ile giden toksik şok sendromu

*S. aureus* virulansı en yüksek olan stafilokok türüdür ve hem toplumdan kazanılmış hem de nozokomiyal infeksiyonların en önemli etiyolojik ajanlarından birisidir (4).

Penisilin kullanılmaya başlandığı 1940' lı yıllarda *S. aureus* infeksiyonları penisilinle tedavi edilmiş fakat kısa sürede penisilinaz üreten suşlar ortaya çıkmıştır. Bindokuzyüzelli' lere artık bu infeksiyonlar penisilin ile tedavi edilemez hale gelmiştir. Bindokuzyüzatmış' larda penisilinaza dirençli antibiyotiklerin (metisilin, oksasilin, nafsilin, dikloksasilin, kloksasilin ve floksasilin ) bulunması ile tedavide kısa süren bir çözüm bulunmuş ama bu antibiyotiklere de dirençli suşlar (MRSA) hızla ortaya çıkmıştır (2,17). Bindokuzyüzseksen' lere gelindiğinde ise hemen hemen tüm dünyada çoğul dirençli *S. aureus*'larla oluşan nozokomiyal infeksiyonlarda artış rastlanmaya başlamıştır (18).

MRSA, 1980' lere hastanelerde büyük bir klinik ve epidemiyolojik problem olarak ortaya çıkmıştır. Neredeyse tüm hastaneler MRSA problemi ile karşı karşıyadır (1).

### 3.2.1. *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*' UN MİKROBİYOLOJİK ÖZELLİKLERİ

Stafilokokları ilk kez 1878' de Robert Koch tanımlamış, 1880' de Pasteur sıvı besiyerinde üretmiş ve 1881' de Alexander Ogston fare ve kobaylar için patojen olduğunu göstermiştir. Rosenbach 1884' de beyaz renkli kolonileri *Staphylococcus albus*, sarı-portakal renkli kolonileri ise *Staphylococcus aureus* olarak isimlendirmiştir (19).

*S. aureus*, *Micrococcaceae* ailesinde yer almaktadır(1). Tekli, ikili, dördü, kısa zincir (3-4 hücreli) ve düzensiz üzüm salkımı benzeri kümeler halinde görünen 0,5-1,5 µm çapında gram olumlu koklardır. Hareketsiz, sporsuz, katalaz pozitif, tipik olarak kapsülsüz veya az miktarda kapsüllüdür. Fakültatif anaeropturlar (1).

*S. aureus* ağız, intestinal sistem, genitoüriner sistem, üst solunum yollarındaki florada bulunabilmektedir.

*S. aureus* kanlı agarda 24 saatte pigmentli, yumuşak, hafif kabarık ve beta hemolitik koloni oluşturur. Kolonileri 6-8 mm çapında geniş kolonilerdir. Pigmenti turuncudan krem-sarı renge kadar değişir. Nispeten geniş kapsül oluşturan nadir suşlar kapsülsüz suşlardan daha küçük ve konveks, ıslak, parlak görüntülü koloni oluşturur. Bu küçük koloni oluşturan varyantlar tekrarlayan ve kalıcı infeksiyonu olan hastalardan izole edilebilmektedir. Bu koloniler çok küçük, hemolizsiz ve

pigmentsizdir. Tipik olarak izolatlar menodion, hemin ve/veya karbondioksitli ortamda üremeleri sağlandığında normal üreme özelliklerine geri dönebilmektedirler(1).

Plazmayı pıhtılaştırma yeteneği *S. aureus*'ların tanımlanması için en çok kullanılan kriterdir. İki farklı koagülaz testi kullanılır: serbest koagülaz için tüp testi ve bağlı koagülaz veya "clumping" faktör için lam testi. Tüp testi en güvenilir test iken, lam testi hızlı tarama tekniği olarak kullanılabilir (1).

MRSA türlerinde protein A ve bağlı koagülaz azalmış miktarda bulunabilir. Bu yüzden stafilokokların kapsüler polisakkaridine karşı antikorların kullanıldığı hızlı aglütinasyon testleri ile tanımlama yapılabilir. Metisiline dirençli ve hassas *S. aureus*' ların serotip 5 ve 8 kapsüler polisakkaridlerinin her ikisini de tespit eden lateks aglütinasyon testleri mevcuttur (20). Tablo 2' de *S. aureus*' un tanımlanmasında kullanılan testler gösterilmiştir.

**Tablo2. *S.aureus*' un tanımlanmasında kullanılan anahtar testler**

Koloni pigmenti	krem-sarıdan turuncuya kadar
Stafilokoagülaz	(+)
"Clumping" faktör	(+)
Isıya dayanıklı nükleaz	(+)
Alkalın fosfataz	(+)
Üreaz	değişken
Aseton üretimi	(+)
Polimiksin B direnci	(+)
Karbonhidratlardan	aerop ortamda asit üretimi
D – Trehaloz	(+)
D – Mannitol	(+)
D – Mannoza	(+)
D – Turanoz	(+)
Maltoz	(+)
Sükroz	(+)

### **3.2.2. *S. AUREUS*' LARDA PATOGENEZ VE VİRULANS FAKTÖRLERİ**

*S. aureus*' un burun taşıyıcılığı infeksiyonun epidemiyoloji ve patogenezinde anahtar rol oynamaktadır. *S. aureus* suşlarının ekolojik barınma yeri burun ön delikleridir; organizma buradan vücudun diğer bölgelerine yayılabilir. Burun



taşıyıcılarında deri de sıklıkla *S. aureus* ile kolonizedir. Bu bölgede konak defansının nispeten yokluğu ve/veya mikroorganizmaların lokal antibakteriyel defansa karşı koyabilmeleri sayesinde yerleşebilmektedir. Burun taşıyıcılarındaki nazal epitel hücreleri taşıyıcı olmayanlara göre daha fazla afiniteye sahiptir. Ek olarak burun taşıyıcılığı bazı HLA antijenleri (DR3 gibi) ile birlikte olabilir. *S. aureus* burun taşıyıcılığı 3 farklı şekilde görülebilir;

a- Devamlı taşıyıcılık ( %20 ) ; hemen daima aynı tip suşu taşır

b- Aralıklı taşıyıcılık ( %60 ) ; suşlar değişebilir

c- Hiç taşımama ( %20 )

Devamlı taşıyıcılık çocuklarda erişkinlerden daha siktir. Devamlı taşıyıcılığın diğer suşların kazanılmasına karşı en azından hastanede yatış sırasında koruyucu bir etkisi olduğu düşünülmektedir. Taşıyıcılar antibiyotik tedavisi aldığıında bu bariyer azalmaktadır. *S. aureus* burun taşıyıcılığı infeksiyon gelişmesi yönünden başlıca risk faktörüdür (21).

Fazla antibiyotik kullanımı MRSA taşıyıcılığı için zemin hazırlar (21). MRSA ile kolonizasyonu genellikle infeksiyon takip etmekte ve infeksiyona eğilimli hastalarda MRSA infeksiyonunun anlamlı olarak artışına neden olmaktadır. Hastane içinde MRSA'nın en önemli bulaşma yolu kolonize veya infekte bir hastadan diğerine sağlık personelinin geçici olarak kolonize elleri aracılığı ile olmaktadır (21).

*S. aureus*' un hücre duvarı peptidoglikan, teikoik asit ve protein A olmak üzere üç ana komponentten oluşur. Hücre duvarının esas komponenti, hücre duvar ağırlığının %50 sini oluşturan peptidoglikan polisakkarit tabakadır. Endotoksin benzeri etki gösterir. Monositlerden interlökin-1 salınışını, kompleman aktivasyonunu, opsonik antikorların üretimini indükler (4,16,22). Hücre duvarının diğer bir önemli komponenti ise hücre duvar ağırlığının %40' ını oluşturan teikoik asittir. Peptidoglikan yapının en dışında sadece *S. aureus*'larda bulunan protein A bulunur. Protein A hücre duvarının %7 sini oluşturur, organizmayı fagositoza karşı korur ve kompleman aktivasyonunu sağlar. Bu yapı aşırı duyarlılık reaksiyonlarından sorumlu tutulmaktadır (4,16,19,22).

*S. aureus*'un dokulara yapışmasında fibronektin, fibrinojen, vitronektin, laminin ve kollajen etkilidir (4,16).

*S. aureus* virülans faktörü olarak etkili birçok enzim ve toksin üretir. Tablo III ve IV de bu enzimler gösterilmektedir (4,16,19).

**Tablo 3. *S. aureus*' un virülansına etkili enzimler**

---

Katalaz
Koagülaz
Hiyalüronidaz
Lipaz
Stafilokinaz (fibrinolizin)

---

**Tablo 4. *S. aureus*' un virülansına etkili toksinler**

---

1.Sitolitik toksinler;
Hemolizinler; alfa, beta, gama, delta toksin
Lökosidin
2.Eksfoliyatif toksin
3.Toksik şok sendromu toksini-1
4.Enterotoksin

---

*S. aureus*'un konakta infeksiyon oluşturması için konağın da savunma mekanizması önemlidir. Bunların bozulması lokal ve sistemik infeksiyona zemin hazırlar. Vücutta yabancı cisimlerin bulunduğu, humoral veya hücrel immün cevabın azaldığı ve aşırı antibiyotik kullanıldığı durumlarda *S. aureus* infeksiyonu kolay gelişir ve ağır seyreder (4,16).

### **3.2.3. MRSA İNFEKSİYONLARININ EPİDEMİYOLOJİSİ**

MRSA son on yılda tüm dünyada hızla artış göstermiştir. Amerika Birleşik Devletleri ( ABD ) ve Avrupa' da birçok hastanede endemik hale gelmiştir. MRSA prevalansı hem coğrafik bölgeler arasında hem de aynı bölgede yer alan hastaneler arasında değişkenlik göstermektedir. Servis içinde, servisler arasında ve bir hastaneden diğerine yayılım gösteren epidemik MRSA suşları vardır.(23)

ABD'de "National Nosocomial Infection Surveillance" (NNIS) verilerine göre *S. aureus*' izolatlari arasında MRSA sıklığı 1975' de %24 iken 1991' de %29 a yükselmiştir(24). Günümüzde ABD ve Güney Avrupa ülkelerindeki hastanelerde izole edilen *S. aureus* izolatlarının %50 den fazlası ve Uzak Doğu' da izole

edilenlerin yaklaşık %80' i metisiline dirençlidir. Bu çok yüksek prevalans hızlarına ve MRSA'nın bazı toplumlarda yayılımına göre bazı coğrafik bölgelerde hemen hemen hiç MRSA olmaması dikkat çekmektedir. Örneğin Hollanda' da, İngiltere' nin bazı kısımları ve İskandinavya' da MRSA insidansı %5' in altındadır. Bindokuzyüzdoksanyedi-1999 yılları arasında yapılan iki farklı SENTRY antimikrobiyal sürveyans programı araştırmasında Almanya' da %4-7,5, Hollanda' da %2-2,5, Fransa' da %12-25, İtalya' da %43-58, Belçika' da %35, Yunanistan' da %34, Türkiye' de %21-44 oranında MRSA saptanmıştır(25,26). NNIS 2003 raporuna göre 1998-2003 yılları arasında kan dolaşımı infeksiyonlarında MRSA oranı %51,6, kan dolaşımı infeksiyonu dışında ise MRSA oranı %42 olarak bulunmuştur (27).

Türkiye' de 1995 yılına kadar yapılan bildirimlerde MRSA oranı %25-40 arasındadır(28-31). Bindokuzyüzdoksanyedi yılında Türkiye' nin değişik bölgelerinde bulunan 29 hastaneden gönderilmiş 1776 stafilokok suşunun antibiyotik duyarlılığını çalışılmış ve MRSA oranını %21 olarak bulunmuştur. Araştırmaya katılan merkezler arasında MRSA oranı ise %7,4 ile %53 oranında değişmektedir (32). Ülkemizde yapılan farklı çalışmalarda 1998-2002 yılları arasında MRSA oranı %38 ile %71 arasında değişmektedir (33-38).

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi verilerine göre kan dolaşımı infeksiyonlarında MRSA oranı %65-69,4 arasındadır (39, 40).

MRSA esas olarak nozokomiyal bir patojen olarak kabul edilmektedir, ancak toplumdan kazanılmış infeksiyonlara da neden olduğu bildirilmektedir. Son yıllarda toplumdan kazanılmış MRSA infeksiyonlarının artmakta olduğu ve infeksiyona yatkınlık yaratan risk faktörleri bulunmayan kişilerde de MRSA infeksiyonu geliştiği bildirilmektedir.(41)

### **3.2.4. S. AUREUS' LARDA METİSİLİNE DİRENÇ MEKANİZMALARI**

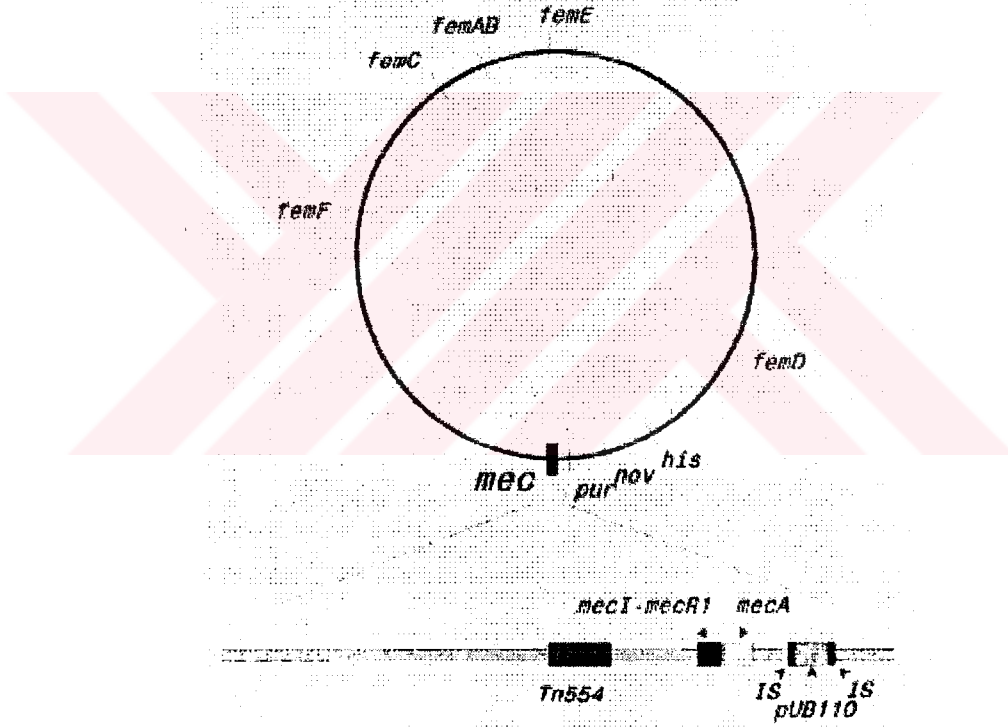
Metisilin klinik kullanıma girmesinden hemen sonra 1961'de metisiline dirençli ilk *S.aureus*' lar tanımlanmıştır. Beta laktamazlara bağlı antibiyotik yıkımı olmadığı için o zamanlar "intrensek " direnç olarak adlandırılmıştır(14)

#### **3.2.4.1. mec DNA**

Stafilokokların metisiline dirençli suşlarında bulunup, metisiline hassas suşlarında bulunmayan kromozomal DNA'nın 30-50 kb lık parçasıdır (şekil 1). *mec* daima *S.aureus* kromozomunun *pur-hov-his* gen kümesinin yakınında bulunur. *mec* birkaç parçadan oluşur (14).

1. *mecA* PBP2a ( PBP2' ) için yapısal gen
2. *mecI* ve *mecR1* *mecA* transkripsiyonunu kontrol eden düzenleyici elementler
3. *mec* ile ilişkili DNA 20-45 kb lık DNA parçası

Şekil 1. *mec* DNA



#### 3.2.4.2. *mecA*

*mecA* metisilin direncini belirleyen 76-kDA luk PBP2a yı kodlar. Hem hassas hem dirençli *S.aureus* larda 4 majör PBP vardır(14).

PBP <sub>1</sub>	85 kDA
PBP <sub>2</sub>	81 kDA
PBP <sub>3</sub>	75 kDA
PBP <sub>4</sub>	45 kDA

PBP ler serin proteazlardan kaynaklanan membrana bağlı DD-peptidazdır ve biyokimyasal aktiviteleri serin proteaza benzer. Bu enzimler bakteri hücre duvarında bulunan peptidoglikan çapraz bağlarının oluşmasını sağlayan transpeptidasyon reaksiyonunda rol alır. Beta laktam antibiyotikler PBP nin aktif kısmı olan serine bağlanan substrat analoglarıdır ve MİK e eşit konsantrasyonda enzimi inhibe ederler. PBP<sub>1-2-3</sub> bir çok beta laktama yüksek affinite gösterir (14).

PBP2a enziminin beta laktam antibiyotiklere afinitesi diğer PBP' lerden daha düşüktür. Bu nedenle metisiline dirençli bakteri beta laktam antibiyotikler ile karşılaştığında diğer tüm PBP' ler antibiyotik tarafından bloke edilir, ancak bu enzim düşük afinitesi nedeniyle beta laktam antibiyotiği bağlamaz ve tüm fonksiyonlarını üzerine alarak bakteri duvar sentezini devam ettirir. Ortamda beta laktam antibiyotik olsa da olmasa da PBP2a sentezlenir, ancak ortamda antibiyotik yoksa fonksiyon göstermez. PBP2a miktarı ile bakterinin metisiline direnç düzeyi arasında bir ilişki yoktur.

PBP2a metisiline dirençli tüm koagülaz pozitif ve koagülaz negatif stafilokoklarda gösterilmiştir. Metisiline duyarlı stafilokoklarda ise yoktur (42).

#### **3.2.4.3. *mec* ile ilişkili DNA**

*mecA*, *mecRI* ve *mecI* yaklaşık 5 kb lık bir DNA tarafından kodlanır ve 100'e yakın "open reading frame" bölgesi vardır. Stafilokok kromozom ve plazmidlerinde çeşitli direnç determinantlarının oluşumuna yol açan en önemli başlangıç bölgesi IS431 dir. Bu element diğer benzer IS elementlerinden homolog rekombinasyon ile direnç determinantlarını toplama yeteneğindedir. Bu durum MRSA lardaki çoğul direnci açıklar. Tn 554 elementi ise *ermA* yı kodlar ve bu da indüklenebilir makrolid direncinden sorumludur(4,14,43).

#### **3.2.4.4. Heterojen direnç**

Metisilin direncinin özellik gösteren niteliği onun heterojen doğasıdır. Kültür ortamına ve beta laktam antibiyotiğin kullanımına bağlı olarak direnç seviyesi değişir (15,48). Heterojen suşlarda hücrelerin çoğu (%99,9 dan fazlası) düşük konsantrasyondaki beta laktam antibiyotiklere duyarlıdır (metisilin 1-5 µg/mL). Ancak 10<sup>6</sup> da 1 hücre 50 µg/mL ya da daha fazla metisilin konsantrasyonunda üreyebilir. Bir çok klinik izolat rutin üreme ortamında bu heterojen direnç paternini gösterir. Heterojen suşlar NaCl veya sukroz gibi hipertonik ortamda ya da 30°C de üreme gibi bazı özel koşullarda homojen görünürler. Ortama EDTA (pH 5,2) ilavesi veya 37-43 °C de inkübasyonda direnç tamamen baskılanabilir. Bu farklı kültür

ortamlarındaki değişiklik tamamen fenotipiktir ve geri dönüşlüdür. Beta laktam antibiyotik içeren bir besiyerine heterojen suşların pasajı yüksek dirençli mutant klonların seleksiyonu ile direnç görünümünü değiştirmektedir. Bu klonlar 50-100 µg/mL metisilin konsantrasyonunda üreyebilen yüksek dirençli hücrelerin homojen popülasyonunu oluşturur. Ancak antibiyotiksiz besiyerine bu suşların pasajı ile orijinal heterojen yapı tekrar ortaya çıkmaktadır (14).

#### 3.2.4.5. “Borderline” direnç

Bu suşlar metisilin minimal inhibitör konsantrasyonunda (MİK) veya hemen üzerinde duyarlılık sınır değerleri ile karakterizedir (oksasilin 4-8 µg/mL). “Borderline” methicilline dirençli *S.aureus* (BORSA) suşlar *mecA* varlığına göre iki tipe ayrılır. *mecA* içeren BORSA suşlar PBP2a üreten heterojen MRSA suşlarıdır ve çok az da olsa dirençli subpopulasyon içerirler (14,44). *mecA* içermeyen BORSA suşlar yüksek dirençli klonlar oluşturmamaları ile heterojen *mecA* suşlardan fenotipik olarak ayrılabilirler. *mecA*(-) BORSA suşlarındaki borderline direnç; stafilokokal beta laktamazın aşırı üretimi veya PBP genlerinin modifikasyonu sonucu oluştuğu düşünülmektedir (14).

*mecA* negatif, beta laktamaz negatif BORSA klinik izolatlarında PBP 1,2,4 lere penisilin bağlanmasında bozukluk bulunmuştur (14). Kinetik deneyler bu PBP’ lere penisilin bağlanmasının yavaş, bağlı penisilin ayrılmasının ise hızlı olduğunu göstermiştir. Bu bağlanma değişikliği penisilin bağlayan “domain”lerde nokta mutasyon sonucudur (14,45). PBP nin aşırı üretimi de (özellikle PBP4) düşük seviyede dirence neden olabilmektedir (15,46).

“Borderline” dirençte beta laktamaz aşırı üretiminin rolü daha az anlaşılırdır. Beta laktamaza dayanıklı beta laktam antibiyotikler bile stafilokoksik beta laktamaz tarafından yavaş da olsa hidrolize olabildiğinden beta laktamaz aşırı üretimi borderline MİK ile sonuçlanabilmektedir. *mecA*(-) aşırı üretim yapan “borderline” suşlarda beta laktamaz plazmidinin yok olması veya sulbaktam /klavonat gibi beta laktamaz inhibitörlerinin eklenmesi ile MİK değerinde azalma görülür. Aşırı beta laktamaz üreten suşlar hemen daima 94/96 faj grubuna aittir ve tip A stafilokoksik beta laktamazı kodlayan 7,2 kb lık beta laktamaz plazmidine sahiptir (14).

Metisilinaz plazmidle kodlanan stafilokokal beta laktamazdan farklıdır ve beta laktamaz aşırı üretimi yapan “borderline” suşlarda yeni bir beta laktamaz olarak bulunmuştur. Önemli olabileceği düşünülmektedir. Ancak geni henüz tanımlanamamıştır(14).

*mecA*(-) BORSA suşları ile yapılan hayvan çalışmalarında, ortaya çıkan direnç durumuna bağlı tedavi yanıtızlığını gösteren veri yoktur. Yapılan hayvan çalışmaları semisentetik penisilinaza dirençli penisilinlerin bu infeksiyonlarda etkili olduklarını göstermiştir. Bu nedenle ister *mecA*(-) ister *mecA*(+) olsun BORSA suşların klinik önemi yoktur (14).

#### 3.2.4.6. Direnç fenotipini etkileyen faktörler

Stafilokoksik beta laktamaz plazmidi; *mec* genin spontan mutasyonunu engeller (hassas fenotip), beta laktamaz plazmidlerin homojen dirençli alıcıya transferi heterojen direnç görünümüne neden olur(14,47).

Beta laktamaz düzenleyici genler direncin ortaya çıkışını etkileyebilmektedir. Beta laktamaz indüklenebilirliğini etkileyen mutasyonlar metisilin direncinde azalmaya neden olabilir (heterojenite) (14). *blaRI*' in inaktivasyonu, *blaI*' in represör aktivitesinin baskınlaşması sonucu heterojen direnç oluşur(14,47).

Metisiline direnç fenotipini etkileyen birkaç gen tanımlanmıştır

*mecA* "protomer" bölgesindeki mutasyonlar represör genlerin bağlanmasını etkiler sonuçta PBP üretimi azalır veya hiç olmaz bu da hassas fenotiple sonuçlanır(14).

*fem* faktörleri; direncin tam anlamı ile ortaya çıkması için gerekli *mec* dışı faktörlerdir. Bu *fem*(for factor essential for methicillin of resistance) veya *aux* (auxiliary) faktör hem duyarlı hem dirençli suşlarda bulunur. Stafilokoksik genomunda altı *fem* geni (A-F) tanımlanmıştır (14). *fem* değişimleri peptidoglikan bileşimde değişime neden olur (14,48). *femA*, B inhibe edildiğinde yüksek düzey direnç duyarlı sınırlara iner. *femC* mutasyonunda homojen direnç heterojen dirence döner.

Bu genlerdeki harabiyet PBP2a ve diğer PBP' ler etkilenmeksizin direncin neredeyse duyarlı hale gelmesine neden olur (14).

Diğer kromozomal bölgeler;

-*Ilm*; fonksiyonu bilinmeyen 38 kDa'luk hidrofobik proteini kodlar. İnaktivasyonu homojen direncin, heterojen paternine neden olur (14). *Ilm* değişim veya aktarımı otoliz oranını artırır. Ancak heterojenite ile otoliz arasında tam ilişki kurulamamıştır (14,49 ).

-*agr* (accessory gene regulator) ve *sar* (staphylococcal accessory regulator ) birkaç stafilokoksik virulans faktör ve exoprotein kontrolünden sorumludur. Her bir

lokustaki inaktivasyon heterojen suştaki yüksek düzey dirençli hücrelerin sayısında azalmaya neden olur. Ama bu hücrelerin direncinde değişim olmaz (14).

-*chr*; heterojen MRSA lar beta laktam antibiyotikli ortama pasaj edildiğinde bu gende mutasyon olur. Ama fonksiyonu bilinmemektedir (14,50).

-*fmtA* inaktivasyonunda MRSA' daki metisiline direnç düzeyi azalır, homojen direnç heterojen dirence dönüşür. Mutasyonda hücre duvar yapısı etkilenir ve çapraz bağlanma azalır (51).

### **3.2.5. S. AUREUS' LARDA METİSİLİN DİRENCİNİ BELİRLEME YÖNTEMLERİ**

Bugün kullanılan testler, direnç ekspresyonunu artırmak için kültür şartlarının değiştirilmesine dayanan testlerdir. Oksasilin kullanımı, 30-35°C' de 24 saat inkübasyonu içerir. Oksasilin veya metisilin dışındaki ajanlarla duyarlılık testleri güvenilir değildir. Metisilin dirençli suşlar *in vitro* duyarlı bulunabilirler. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) çıkardığı yayında MRSA' ları belirlemeye yönelik test yöntemleri yayınlanmıştır (14,52).

Metisilin direncinin heterojen doğası metisilin direncini belirlemede testlerin doğruluğunu sınırlandırmaktadır. PCR ile *mecA* gösterilmesi altın standarttır (11,14,53). Fenotipik olarak dirençli ancak *mecA* (-) suşlarda metisilin ve oksasilin MİK' leri hemen daima <16 µg/mL dir ve bu suşlara karşı beta laktamantibiyotikler etkili olduğundan klinik önemleri yoktur(14).

#### **3.2.5.1. Disk difüzyon**

Metisilin direncini belirlemede en az güvenilir yöntemdir. Özgüllüğü %80 dir. Duyarlılığını artırmak için agara NaCl eklenebilir, inkübasyon 48 saate uzatılabilir. Ancak bu işlemler *S. aureus* için özgüllüğü azaltır (14)

#### **3.2.5.2. Dilüsyon testleri**

Duyarlılığı % 95 den fazladır. Sıvı dilüsyon yöntemidir. NCCLS önerilerine göre Mueller-Hinton sıvı besiyerine %2 NaCl eklenir, 5x10<sup>5</sup> cfu/mL inokulumdan sonra ve 24 saat 35 °C de inkübe edilir. Ayrıca Mueller-Hinton agara %2 NaCl ilavesi ve 30-35 °C de 24 saat inkübasyonu yapılan agar dilüsyon metoduda kullanılır (14).



### 3.2.5.3. Agar tarama

%4 NaCl ve 6µg/mL oksasilin içeren Mueller-Hinton agara  $10^4$  cfu bakteri inokulasyonundan sonra 35 °C de 24 saat inkübe edilir. Bir koloni bile görülmesi direnç için yeterlidir. *S. aureus* için bu testin duyarlılığı %100 dür (14).

### 3.2.5.4. PBP2a' nın latex aglütinasyonla tespiti

*mecA* ürünü PBP2a ya karşı oluşmuş latex kaplı monoklonal antikorlar kullanılır. 15-20 dakika gibi kısa sürede MRSA tespiti yapılabilir. Ticari kiti mevcuttur (MRSA-screen Denka-Seiken Co. Tokyo, Japan) (54,55). Çalışmalarda duyarlılığı %97-98,5, özgüllüğü %100 bulunmuştur (9,54,55).

### 3.2.5.5. Diğer testler

- Otomatize sistemler; Vitek GPS-SA card, microscan
- Alamar panel, E-test
- BBL MRSA ID system

Otomatize testlerin özgüllüğü yüksek ama duyarlılığı düşüktür. Duyarlılık için doğrulama yapılması şarttır (14).

### 3.2.5.6. PZR (Polimeraz zincir reaksiyonu)

PZR spesifik DNA segmentinin *in vitro* şartlarda enzimatik olarak çoğaltılmasını sağlayan hızlı bir yöntemdir. Yöntem belirli bir nükleotid dizgesini içeren DNA bölgesinin çoğaltılması esasına dayanır. Bu teknik çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlamaktadır. Çoğaltılan DNA bölgesi (20-30 bazlık nükleotid dizgesi) özgül olduğu için tanı amaçlı kullanılan güçlü bir testtir. Çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgül bu bölgenin baz dizelerini tamamlayıcı bir çift sentetik oligonükleotid primer kullanılır. İstenilen DNA parçası bu iki primerle sınırlandırılarak çoğaltılır. Çoğaltılma işleminde kullanılan enzim ısıya dayanıklı Taq DNA polimerazdır (1,19).

PZR da kullanılan karışımın içeriği;

- 1.DNA örneği
- 2.Primerler
- 3.dNTP(A,T,G,C)
- 4.ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi
- 5.Uygun pH ve iyonlar için  $MgCl_2$ , KCl ve Tris-HCl buffer

PZR adımları;

- 1.Adım; denatürasyon (DNA iplikçileri ayrılır)
- 2.Adım; bağlanma (primerler bağlanır)

3. Adım; DNA sentezi ( Taq DNA polimeraz enzimi ile )

Bu üç adım bir siklus oluşturur. Bu siklus sayısına göre ilk DNA miktarı  $2^n$  kat artar. (n; siklus sayısı) (1,22)

En son olarak çoğalan DNA bölgesi jel elektroforezde görüntülenir.

### **3.2.6. MRSA' LARDA ANTİMİKROBİYAL TEDAVİ**

#### **3.2.6.1. Beta laktam antibiyotikler**

PBP2a' ya bağlanma affinitesi beta laktamlar arasında farklılık gösterir. Bununla birlikte bu sınıf antibiyotiklerde çapraz direnç mevcuttur.

Bugün kullanılan beta laktam antibiyotikler içinde PBP2a' ya en fazla affinitesi olanlar ampisilin, ve amoksisilindir. Beta laktamazlarca hidrolize edilmedikleri sürece yüksek dozlarda klinik etki gösterirler. betalaktamaz inhibitörleri ile kombinasyonlarında MİK aralıkları 8-32µg/mL ye düşer. Hem amoksisilin- klavulanat hem de ampisilin-sulbaktamın hayvan modellerinde yüksek dozlarda MRSA endokarditine etkili olduğu gösterilmiştir.

PBP2a affinitesinin fazla olduğu birçok yeni beta laktam araştırma aşamasındadır. Bunlarda MİK, yüksek düzey dirençli suşlarda bile  $\leq 4$  µg/mL dir. Etkilerinin vankomisinden bile üstün olduğu hayvan deneyleri ile gösterilmiştir ancak klinik çalışma yoktur(14).

#### **3.2.6.2. Glikopeptid antibiyotikler**

MRSA tedavisinde altın standart glikopeptidlerdir (56). Vankomisin intrinsek olarak beta laktamlardan daha az etkili antistafilokoksikdir. Özellikle endokardit vakalarında %10-20 tedavi başarısızlığı görülmektedir.

Teikoplaninin yarı ömrü uzundur. İntramuskuler uygulanabilir. Ancak vankomisinden daha az etkilidir (14).

#### **3.2.6.3. Fluorokinolonlar**

Çok kolay direnç gelişir. Bu da ağır infeksiyonlarda tek ajan olarak kullanımını sınırlar. Tedavi sırasında direnç gelişebilir.

MRSA' larda yeni fluorokinolonlar içinde çapraz direnç söz konusudur.

Kinolon direncini önlemek için rifampinle kombinasyon yapılabilir, bu kombinasyon stafilokok kolonizasyonu ve ağır stafilokok infeksiyonlarında yararlıdır (14).

#### **3.2.6.4. Trimetoprim-Sulfametoksazol**

Vankomisin tedavisini tolere edemeyen ya da vankomisine yanıt alınamayan hastalarda son çaredir (14).

### **3.2.6.5.Rifampin**

Diğer ajanlara göre oral biyoyararlanımı ve dokuya geçişi iyidir. Tedavide çok kolay direnç gelişir. Bu yüzden duyarlı izolatlarda kombinasyon tedavisi ile kullanılmalıdır. Ancak klinik kullanımda rifampinin rolü tartışmalıdır (14).

### **3.2.6.6. Aminoglikozidler**

Gentamisin, netilmisin ve tobramisin stafilokoklara karşı en etkili aminoglikozidlerdir. Hızlı direnç geliştiği için tek ajan olarak kullanılmamalıdır. Aminoglikozid ve vankomisin kombinasyonu *in vitro* sinerjistikdir ancak *in vivo* sinerjizm olup olmadığı bilinmemektedir.

### **3.2.6.7. Sinersid (kinupristin- dalfopristin)**

Bir streptogramin B olan kinupristin ve streptogramin A olan dalfopristinin 30:70 oranında kombinasyonudur. Bakterisidaldir. Metilaz (streptogramin B direncinden sorumlu) üreten suşlarda bakterisidal etki kaybolur bu durumlarda MRSA tedavisinde kullanımı sınırlanır (14). *In vitro* etkinlik açısından oldukça iyi görünmektedir (57).

### **3.2.6.8.Mupirosin**

*P.fluorescens'* in doğal ürünüdür. Topikal uygulanır. MRSA nazal taşıyıcılığının eradikasyonunda yararlıdır. Uzamış kullanımı dirence yol açar (14).

### **3.2.6.9.Diğer ajanlar**

Fusidik asit, Fosfomisin, Novobiocin, Coumermycin Minosiklin, LY333328 Oksazolidonlar (eperezolid ve linozolid) tedavide kullanılabilen diğer antibiyotiklerdir (15,58,59).

### **3.3. GEREÇ VE YÖNTEM**

Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Hastanesi Bakteriyoloji laboratuvarına gelen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 300 *S.aureus* suşu çalışmaya alındı. Kontrol suşları olarak *S.aureus* American Type Culture Collection (ATCC) 25923 ve 27R suşları kullanıldı.

#### **3.3.1. BAKTERİ İDENTİFİKASYONU**

Bakteri identifikasyonu koloni morfolojisi, gram boyama, katalaz reaksiyonu yanısıra trehaloz-mannitol, DNAaz, koagulaz ve “clumping” faktör testlerinden yararlanıldı. Trehaloz-mannitol, DNAaz, koagulaz ve clumping faktör testleri pozitif stafilocok suşları *S.aureus* olarak tanımlandı.

#### **3.3.2. METİSİLİN DİRENCİNİ BELİRLEME YÖNTEMLERİ**

##### **3.3.2.1. Disk difüzyon yöntemi**

*S.aureus* direnci National Commitee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (52) doğrultusunda 1µg' lık oksasilin diskleri kullanıldı. Bakterilerin 24 saatlik saf kültürlerinden %0,9'luk serum fizyolojikde Mc Farland 0,5 bulanıklığa eşdeğer süspansiyon hazırlandı. Bu süspansiyondan steril eküvyonlar ile 4mm kalınlığındaki Mueller-Hinton agara sürüldü. 35°C de 24 saat inkübasyondan sonra disk çevresindeki inhibisyon zonu ölçüldü. 13mm den büyük eşit zon metisiline hassas, 12-11mm arasındaki zon çapları az hassas, 10mm den küçük zon işe metisiline dirençli olarak değerlendirildi.

### 3.3.2.2. Oksasilin agar tarama yöntemi

*S.aureus* direnci NCCLS (60) doğrultusunda, mililitresinde 6µg oksasilin içeren %4 NaCl ilave edilmiş Mueller-Hinton kullanıldı. Bakterilerin 24 saatlik saf kültürlerinden doğrudan koloni süspansiyonu ile 0,5 Mc Farland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlandı. Bu sıvıya daldırılan eküvyonla “çizgi” ekimi yapıldı. 35°C de 24 saatlik inkübasyondan sonra plakda bir veya daha fazla koloni görülmesi metisilin direnci olarak kabul edildi.

### 3.3.2.3. PBP2a lateks aglütinasyon test yöntemi

Ticari firmanın (Denka-Seiken Co.,Ltd., Tokyo, Japan) önerileri doğrultusunda yapıldı. 24 saatlik saf kültürden 10-20 tane *S.aureus* kolonisi, 1,5µL' lik mikrosantrifüj tüpüne konulan 4 damla (200 µL) extraction reagent no.1( 0,1 M NaOH ) içinde süspansiyon edildi. Bu karışım kaynayan suda 3 dakika bekletildi. Bundan sonra 1 damla (50µL) extraction reagent no.2 (0,5 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) ilave edildi ve karıştırıldı. Daha sonra 1500xg de 5 dakika çevrildi. Üstteki sıvıdan 50 µl test kartına konuldu, 1 damla (25µL) antiPBP2a monoklonal antikorlar ile duyarlılaştırılmış lateksle karıştırıldı. Aglütinasyon 3 dakika içerisinde değerlendirildi. Lateks parçacıklarının aglütinasyonunun gözle görülüp değerlendirilmesi pozitif reaksiyon kabul edildi.

### 3.3.2.4. Polimeraz zincir reaksiyonu ile *mecA* geninin gösterilmesi

DNA ekstaksiyonu için Ünal ve ark. tarafından geliştirilen hızlı hücre yıkım tekniği kullanıldı (6). 24 saatlik saf kültürden Mueller-Hinton sıvı besiyerine birkaç koloni pasaj edilip 24 saat 35°C' de inkübe edildi. Bu sıvıdan 1,5ml mikrosantrifüj tüpüne alındı. 3000 rpm' de 15 dakika çevrildi. Üst sıvı atıldı. Üstüne 100µg/mL' lik lizostafinden 50µL konulup karıştırıldı. 37°C deki sıcak suda 10 dakika bekletildi. Tekrar karıştırıldıktan sonra 100µg/mL' lik proteinaz K' dan 50µL konuldu ve karıştırıldı. Sonra tekrar 37°C deki sıcak suda 10 dakika bekletildi. Bu işlemde sonra kaynayan suda 10 dakika bekletildi. 15 dakika 10 000 rpm' de çevrildi. Üstteki sıvı çökeleğe dokunulmadan alınıp mikrosantrifüj tüpüne konuldu ve -20°C' de saklandı.

Primerler *S.aureus* TK 784 adlı suşun daha önceden yayınlanmış *mecA* DNA nükleotid sekansına göre sentez ettirildi: Primer 1 *mecA* geninin 37. ve 57. nükleotidleri arası; 5'-GTTGTAGTTGTCGGGTTTGG-3' sırasında , Primer 2 1827 ile 1854 nükleotidleri arası sıranın reverse komplement nükleotidleri şeklinde 5'-CCACCCAATTTGTCTGCCAGTTTCTCC-3' sırasındadır. Bu iki primer *mecA*

geni "open reading frame" içerisinde birbirinden 1,8kb uzaklıktadır. Bu nedenle PZR ile 1,8kb'lık kısım amplifiye etmektedir(6).

PZR miksi; 10x buffer 2,5µL, MgCl<sub>2</sub> 2mM 2µL, dNTP 10mM 0,5µL, primer 1 ve 2 1µL, DNA 1µL, Taq 0,15µL karışımı 25µL ye 16,85µL distile su ile tamamlanarak hazırlandı.(8)

Termal sikluslar; 94°C 5 dakika

94°C 30 saniye

60°C 30 saniye

72°C 30 saniye

72°C 7 dakika şeklinde uygulandı.

Amplifikasyondan sonra PZR karışımının 15 µL' si %0,8' lik etidyum bromide renklendirilmiş agaroz jelde elektroforez ile ultraviyole ışıkta değerlendirildi. 1,8 kb'lık bölgede görünen amplifiye DNA parçaları pozitif PZR sonucu olarak kaydedildi (6).

### 3.3.3. İSTATİSTİK

Testlerin karşılaştırmaları için duyarlılık, özgülük, artı ve eksi yorumlama gücü hesap edildi.

Duyarlılık sonucu ile uygulanan testin gerçek pozitifleri yakalama oranı değerlendirildi.

Özgülük sonucu ile uygulanan testin gerçek negatifleri yakalama oranı değerlendirildi.

Artı ve eksi yorumlama gücü, toplam pozitif ve negatif sonuçlar içerisinde gerçekten pozitif ve negatif olanların oranını belirlemek için araştırıldı.

Hesaplama kullanılan formüller aşağıda belirtildi.

$$\text{Duyarlılık} = \frac{\text{gerçek pozitif}}{\text{gerçek pozitif} + \text{yanlış negatif}} \times 100$$

$$\text{Özgülük} = \frac{\text{gerçek negatif}}{\text{gerçek negatif} + \text{yanlış pozitif}} \times 100$$

$$\text{Artı yorumlama gücü} = \frac{\text{gerçek pozitif}}{\text{gerçek pozitif} + \text{yanlış pozitif}} \times 100$$

$$\text{Eksi yorumlama gücü} = \frac{\text{gerçek negatif}}{\text{gerçek negatif} + \text{yanlış negatif}} \times 100$$



### 3.4.BULGULAR

Çalışmaya alınan 300 *S. aureus* suşunun izole edildiği her biri farklı hastaya ait klinik örneklerin dağılımı tablo5’de gösterildi

**Tablo 5: *S.aureus* suşlarının izole edildiği klinik örnekler**

<b>Klinik örnek</b>	<b>Sayı</b>	<b>%</b>
Yara	149	49,7
Kan	87	29
Nazotrakeal aspirat	17	5,7
Kateter ucu	11	3,7
Balgam	10	3,3
İdrar	8	2,7
Eklemler sıvısı	3	1
Periton sıvısı	3	1
Beyin omurilik sıvısı	2	0,7
Bronkoalveoler lavaj	2	0,7
Göbek sürüntüsü	2	0,7
Plevral sıvı	2	0,7
Kulak akıntısı	1	0,3
Prostat sekreti	1	0,3
Lenf nodu	1	0,3
Lakrimal kese	1	0,3
<b>Toplam</b>	<b>300</b>	<b>100</b>



Disk diffüzyon yöntemi ile 120 suş MSSA bulunurken, 180 suş MRSA olarak belirlendi.

Oksasilin agar tarama yöntemi ile 119 suş MSSA bulunurken, 181 suş MRSA olarak belirlendi.

Lateks aglütinasyon deneyi ile 120 suşta PBP2a negatif bulunurken, 180 suşta PBP2a pozitif olarak belirlendi.

PZR ile 119 suşta *mecA* negatif bulunurken, 181 suşta *mecA* pozitif olarak bulundu.

Disk diffüzyonla bulunan 120 MSSA suşunun 118 tanesi (%98,3) *mecA* negatif, 2 tanesi(%1,7) *mecA* pozitif bulundu.180 MRSA suşunda 179 tanesi (%99,4) *mecA* pozitif, 1 tanesi (%0,6) *mecA* negatif bulundu. Tablo 6 da dağılım gösterildi.

**Tablo 6. Disk difüzyon yönteminde duyarlılıkları elde edilen *S.aureus* suşlarının *mecA* geni dağılımı**

	<u><i>mecA</i> negatif</u>	<u>%</u>	<u><i>mecA</i> pozitif</u>	<u>%</u>
MSSA	118	98,3	2	1,7
MRSA	1	0,6	179	99,4

Oksasilin agar tarama yöntemi ile bulunan 119 MSSA suşunun 117 tanesi (%98,3) *mecA* negatif, 2 tanesi (%1,7) *mecA* pozitif bulundu. 181 MRSA suşunda 179 (%98,9) tanesi *mecA* pozitif, 2 tanesi (%1,1) *mecA* negatif bulundu. Tablo 7 de dağılım gösterildi.

**Tablo 7. Oksasilin agar tarama ile duyarlılıkları elde edilen *S.aureus* suşlarının *mecA* geni dağılımı**

	<u><i>mecA</i> negatif</u>	<u>%</u>	<u><i>mecA</i> pozitif</u>	<u>%</u>
MSSA	117	98,3	2	1,7
MRSA	2	1,1	179	98,9

Lateks aglütinasyon deneyi ile PBP2a negatif 120 *S.aureus* suşunun 116 tanesi *mecA* negatif, 4 tanesi *mecA* pozitif bulundu. 180 tane PBP2a pozitif

*S.aureus* suşununun 177 tanesi *mecA* pozitif, 3 tanesi *mecA* negatif bulundu. Tablo 8’ de dağılım gösterildi.

**Tablo 8. Lateks aglütinasyon ile PBP2a’ ları tespit edilen *S.aureus* suşlarının *mecA* geni dağılımları**

	<u><i>mecA</i> negatif</u>	<u>%</u>	<u><i>mecA</i> pozitif</u>	<u>%</u>
PBP2a negatif	116	96,6	4	3,4
PBP2a pozitif	3	1,7	177	98,3

Yukarıdaki tablolara göre, *mecA* geni esas alındığında ;

Disk diffüzyon yönteminin duyarlılığı; %98,8, özgüllüğü; %99,1, pozitif yorumlama gücü; %99,4, negatif yorumlama gücü; %98,3 bulundu. Tablo 9’ da gösterildi.

Oksasilin agar tarama yönteminin duyarlılığı; %98,8, özgüllüğü; %98,3, pozitif yorumlama gücü; %98,8, negatif yorumlama gücü; %98,3 bulundu. Tablo 9’ da gösterildi.

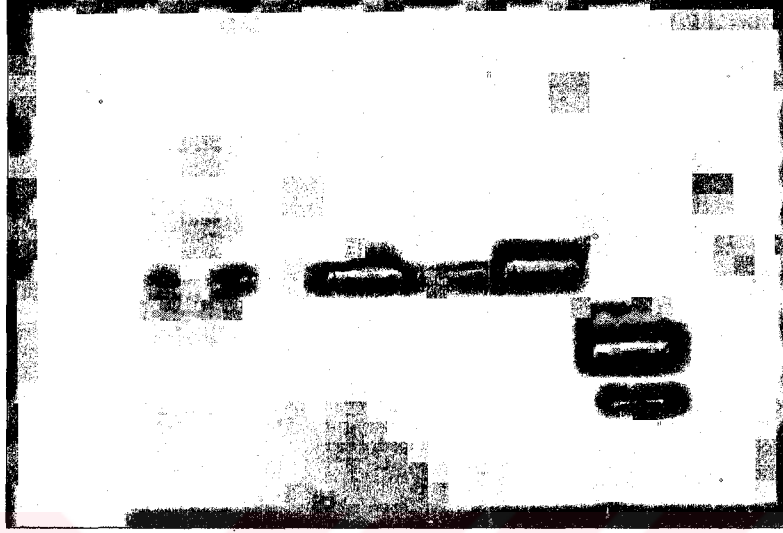
Lateks aglütinasyon yönteminin duyarlılığı; % 97,7 özgüllüğü; %97,4, pozitif yorumlama gücü; %98,3, negatif yorumlama gücü; % 96,6 bulundu. Tablo 9’ da gösterildi.

**Tablo 9. Disk diffüzyon, oksasilin agar tarama ve lateks aglütinasyon yöntemlerinin istatistiksel analizi**

	<u>Duyarlılık</u>	<u>Özgüllük</u>	<u>(+)yorumlama gücü</u>	<u>(-) yorumlama gücü</u>
Disk diffüzyon	%98,8	%99,1	%99,4	%98,3
Oksasilin agar tarama	%98,8	%98,3	%98,8	%98,3
Lateks aglütinasyon	%97,7	%97,4	%98,3	%96,6

Şekil 2' de *S. aureus* izolatlarından *mecA* pozitif suşların jel elektroforezdeki bantları görülüyor.

**Şekil 2. *mecA* bantları**



### 3.5. TARTIŞMA

*Staphylococcus aureus* infeksiyonlarında penisilinler ilk kez 1940 yılında kullanılmaya başlanmış ve 1960'lara gelindiğinde MRSA'lar ortaya çıkmıştır (2,17). 1980' den sonra ise MRSA lar tüm dünyadaki hastanelerde nozokomiyal bir patojen olarak önemli bir problem oluşturmuştur (18).

Avrupa'da kuzey ve güney ülkeler arasında MRSA oranları arasında önemli farklılıklar vardır. Örneğin; İskandinavya'da ve Hollanda'daki hastanelerde MRSA oranı %2 civarında iken Akdeniz ülkelerinde bu oran %40'ın üzerindedir (61,62). Ülkemizde de bu oran %38 ile %71 arasında değişmektedir (33-38).

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde yapılan iki çalışmada da kan dolaşımı infeksiyonlarında MRSA oranı %65,5-69,4 arasında bulunmuştur (39,40). 1997 yılında yapılan başka bir çalışmada da yoğun bakım ünitelerinde MRSA oranı %84,2 bulunmuştur (63).

Aygen ve arkadaşlarının Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde yaptığı çalışmada kan dolaşımı infeksiyonlarından izole edilen MRSA suşlarının "pulsed-field" jel elektroforez ile klonal dağılımını incelediklerinde 10 farklı klon bulmuşlar. Suşların çoğunluğunun (%76,3) A klonuna ait olduğu ve bunların çoğunluğunun da cerrahi yoğun bakım ünitesinden çıktığını göstermişlerdir (40).

Daha fazla yayılmasının önlenmesi, gerekli önlemlerin alınması, antibiyotik tedavisinin hızla başlanması veya daha uygun antibiyotiklerin kullanılması için MRSA suşlarının hızla belirlenmesi önemlidir (64,65).

Stafilokoklarda beta laktam antibiyotiklere direnç 2 mekanizma ile meydana gelmektedir. Birincisi, ilaçların inaktive edildiği beta laktamaz üretimi, diğeri ilaçların bağlanması engellendiği hedef protein üretimidir. Metisilin direncinin sebebi hedef proteinlerin değiştirilmesi sonucudur. Tüm beta laktam antibiyotiklerin hedefi hücre duvarının sentezi için gerekli olan PBP'lerdir. MRSA'larda beta laktam antibiyotiklerin düşük afinite ile bağlandıkları PBP2a üretilmektedir (metisilin 1000µg/mL konsantrasyonda bağlanamamaktır) (7).

Duyarlılık çalışmaları MRSA'ların tüm suşlarının PBP2a üretmediklerini belirlemiştir. PBP2a üretiminin olmadığı dirençten, beta laktamazların aşırı üretimi ve normal PBP'lerde değişimle ilişkilidir (7). Bu suşlar düşük seviyede direnç veya "borderline" direnci oluştururlar.

Hacbarth ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada PBP2'yi kodlayan gendeki (pbpB) nokta mutasyon sonucu PBP2'ye bağlanan ilacın daha hızlı ayrıldığı ve daha az afinite ile bağlandığı gösterilmiştir (45).

Başka bir çalışmada, PBP4 proteinini kodlayan gendeki mutasyon sonucunda PBP4'ün aşırı üretimi ve bunun sonucu metisilin direncinin arttığı gösterilmiştir (46).

MRSA'lardaki PBP2a'nın sentezini sağlayan genetik bilgi *mecA* geninde bulunmaktadır. Bu gen dirençli suşlarda mevcuttur ve duyarlı suşlarda bulunmamaktadır. Transdüksiyonla bu genetik bilgi dirençli suşlardan duyarlı suşlara aktarılabilmektedir. Bakteride metisilin direncinin ortaya çıkabilmesi için bu genin eksprese olması gerekmektedir. Ancak bu ekspresyon her bakteride olamamaktadır. *mecA* geni taşıdığı halde metisiline duyarlı *S.aureus* suşları olabilmektedir (42).

Bizim çalışmamızda da 2 suş *mecA* pozitif olduğu halde metisiline duyarlı ve PBP2a üretimi negatif olarak bulunmuştur.

*S.aureus* larda metisilin direncinin özelliği klinik uygulamalarda daha sık bulunan fenotipik olarak heterojen görünebilmesidir. Koloniyi oluşturan tüm bakteriler *mecA* geni taşımalarına rağmen direnç fenotipi  $10^6$ - $10^8$  bakteride bir görülmektedir. Bu heterojenite kültür ortamına ve beta laktam antibiyotiğin kullanımına göre değişmektedir (14,42). Homojen direnç fenotipinde ise kolonideki tüm bakteriler yüksek düzeyde direnci gösterebilmekte ve kültür ortamından etkilenmemektedir (42).

Tomasz ve arkadaşları MRSA'larda 4 fenotipik sınıf tanımlamıştır. Bu ayırımı *in vitro* metisilin MİK'inin populasyon analizi ile yapılmıştır (12,66). Bu sınıflama tablo 9'de gösterilmiştir.

**Tablo 10. MRSA'larda fenotipik sınıflama**

	Fenotipik görünüm	Hücrelerin çoğunluğunda bulunan metisilin MİK'i	Yüksek dirençli hücre sıklığı
Sınıf 1	Heterojen	1,5-3µg/ml	$10^{-7}$ - $10^{-8}$
Sınıf 2	Heterojen	6-12µg/ml	$10^{-5}$ - $10^{-6}$
Sınıf 3	Heterojen	50-200µg/ml	$10^{-2}$ - $10^{-3}$
Sınıf 4	Homojen	400-800µg/ml	-

*S.aureus*'larda görünen bu heterojen metisilin direnci mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılan geleneksel duyarlılık test metodları ile metisilin direncini belirlemede problem oluşturmaktadır (11,14). Test ortamının sıcaklığı, pH'sı, tuz konsantrasyonu, inokülasyon miktarı, inkübasyon süresi gibi üreme şartları hassasiyet testlerini etkilemektedir(7,14, 53)

Hatalı test sonuçları etkili olmayan tedaviye ve hatalı pozitif sonuçlar gereksiz glikopeptid kullanımına neden olmaktadır, ki bu da glikopeptid direncinin gelişimi riskini beraberinde taşımaktadır (7, 67). Vankomisine dirençli *S.aureus*' lar (VRSA) ile oluşan infeksiyonlarda tedavi, mevcut birçok bakterisidal antibiyotiğe direnç gösterdikleri için çok önemlidir. Kinupristin/dalfopristin gram pozitif koklara hızlı bakterisidal etki gösterirken VRSA'larda bakteriyostatik etki göstermektedir (68)

Bu yüzden MRSA'ları belirlemede hızlı, hassas, spesifik ve klinik mikrobiyoloji laboratuvarında kolaylıkla uygulanabilecek testlere ihtiyaç vardır. Metisilin direncinden sorumlu PBP2a'yı kodlayan *mecA* genin PZR ile belirlenmesi altın standart olarak kabul edilmiştir (5,9-14). Fakat çoğu laboratuvarlarda rutin olarak uygulanabilir bir metod değildir (69).

Metisilin direncini belirlemek için kullanılan fenotipik metodlar; NCCLS'in önerdiği sıvı dilüsyon, agar dilüsyon (MİK belirler), agar tarama ve disk difüzyondur. Agar tarama metodu referans metod olarak kabul edilmesine ve oksasilin direncini çok iyi belirlemesine rağmen duyarlılığı %100 değildir. Dilüsyon metodlarında duyarlılığı %98-100 arasında değişmektedir (10,11,67,69). Heterojen suşları belirlemede dilüsyon metodlarının yetersiz kaldığı bilinmektedir. Disk difüzyon metodunda heterojen suşlar için düşük güvenilirliktedir. Disk difüzyon

metodunun bir çok heterojen suşda %61-%96,4 arasında duyarlılık gösterdiğini belirten çalışmalar mevcuttur(12,69). Bazı çalışmalarda ise disk difüzyon için çok iyi duyarlılık belirtilmiştir (10,69,71).Disk difüzyon metodunda görülen diğer bir problem özgüllüğünün duyarlılığından daha yüksek oluşudur( %89-100). Bizim çalışmamızda da disk difüzyon metodunun duyarlılığını %98,1, özgüllüğünü ise %99,1 bulunmuştur.

Oksasilin agar tarama metodunun heterojen suşlar ile yapılan çalışmalarında duyarlılığının düştüğü gösterilmiştir (<%95) (10,12,69,70). Diğer yandan duyarlılığının >%97 olduğunu belirten çalışmalarda mevcuttur (2,11,67,69,71,72). Doğru inokülasyon metodları kullanılarak direnç belirleme oranının artacağını belirten çalışmalar mevcuttur (69,73).

Bir çok laboratuvar, agar taramada inoküle edilecek bakteri miktarını kendi yöntemlerine göre yapmaktadır. Swenson ve arkadaşları 0,5 Mc Farland bakteri süspansiyonundan bir öze dolusu (1 µl) bakterinin sürülmesinin en iyi duyarlılık ve özgüllük sağlayan kombinasyon olduğunu belirtmişlerdir (69,73).

Bizim çalışmamızda 0,5 Mc Farland bakteri süspansiyonuna batırılan eküvyonun agara sürülmesi ile inokülasyon sağlanmıştır ve Swenson ve arkadaşlarının önerdiği yöntemle yakın bir yöntemdir.

Ticari olarak E-test, yarı otomatik Vitek (bioMérieux, Inc., Durham NC) ve MİKroScan (Dade Behring, Inc., West Sacramento, CA) sistemleri de mevcuttur. (14,69).

Vitek (bioMérieux, Inc., Durham NC) sistemi direnci belirlemede sıvı mikrodilüsyon yöntemini kullanmaktadır. Heterojen dirençli suşlarda duyarlılığı %95 (10,12,69), diğer suşlarda %98 (11,67,69,74) olarak bildirilmektedir.

Diğer bir fenotipik ticari test olan MicroScan (Dade Behring, Inc., West Sacramento, CA) sistemi ile ilgili çok rapor mevcuttur. Heterojen dirençli suşlarda geleneksel panel kullanıldığında duyarlılığı<%75, özgüllüğü %97, hızlı panel kullanıldığında ise duyarlılığı %90, özgüllüğü %86 rapor edilmiştir (10,69).

Metisilin direncini *mecA* geni varlığına göre belirleyen testler mevcuttur. Bu testlerde fenotipik görünüm önemli olmadığı için heterojen suşlar sorun oluşturmamaktadır.

Bu metodlardan biri Velogene Genomic Identification Assay, (ID Biomedical Corporation , British Columbia, Canada) sistemidir. Bu yöntemde fluoresanla işaretli *mecA* proflar kullanılmaktadır. *S.aureus* saf kültürlerinden 90 dakikada *mecA*

belirlemektedir. Bu testin duyarlılığının %96-100, özgülüğünün %100 olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (10,54,69,75).

Bir real-time PZR sistemi olan Roche Light-Cycler (Roche Diagnostics, Switzerland), fenotipik olarak direncin belirlenemediği heterojen suşlarıda içeren çok sayıdaki izolatta aynı anda çalışılabilmektedir. Altın standart olan *mecA* belirleme yöntemi olarak kullanılmaktadır (69,76).

Ayrıca bir otomatize hibridizasyon tekniği olan Evigene MRSA detection Kit (Statens Serum Institute, Denmark) de mevcuttur. Duyarlılığı %100 ve özgülüğü %99,5-100 olarak belirten çalışmalar mevcuttur (69, 72,77).

*mecA* gen ürünü olan PBP2a varlığına göre metisilin direncini belirleyen iki ticari kit mevcuttur. MRSA-Screen (Denka-Seiken Co., Ltd, Tokyo, Japan) ve PBP 2 Test (Oxoid Ltd., Basington, UK) aglütinasyon testleri ticari olarak bulunmaktadır. Bir çok çalışmada MRSA-Screen (Denka-Seiken Co., Ltd, Tokyo, Japan) testi kullanılmaktadır. Fakat her iki test te birbirinin aynıdır. Her iki test için duyarlılığın >%97 ile <%95 olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (10,12,69). Bir çok araştırmacı bu testlerin duyarlılığını artırmak için , aglütinasyon süresini uzatmayı, inokulum miktarını artırmayı ve beta laktam ajanlar ile indüksiyonu denemiştir. Fakat FDA bu modifikasyonlardan hiçbirini önermemektedir (9,10,54,67,69,76).

Bu ticari testler içinde en ekonomik olanı lateks aglütinasyon kitidir. Klinik olarak önemli olan *S.aureus*'lardaki metisilin direncini hızlı bir biçimde belirlemek için bir çok laboratuarda kullanılmaktadır. Bizde bu yüzden çalışmamızda MRSA-Screen (Denka-Seiken Co., Ltd, Tokyo, Japan) kiti kullandık.

Çalışmamızda; altın standart olarak kabul edilen PZR ile *mecA* geni varlığının araştırılmasını, PBP2a mın belirlendiği MRSA-Screen (Denka-Seiken Co., Ltd, Tokyo, Japan) aglütinasyon deneyini, NCCLS'in önerdiği fenotipik metodlar olan oksasilin disk difüzyon ve oksasilin agar tarama yöntemleri uygulanmıştır. Testlerin duyarlılık, özgülük, artı yorumlama gücü ve eksi yorumlama gücünü hesap edilmiştir.

Swenson ve arkadaşlarının yaptığı, PZR ile *mecA* genin belirlenmesini altın standart olarak kabul ettikleri çalışmada oksasilin disk difüzyon testinin duyarlılığını %100, özgülüğünü %89, oksasilin agar tarama yönteminin duyarlılığını %90, özgülüğünü %92, MRSA-Screen testinin duyarlılığını %90, özgülüğünü %100 bulmuşlardır. Bu çalışmada, MRSA-Screen testinin aglütinasyon reaksiyonun 15



dakika sonra okunması durumunda duyarlılığının %100 olacağı vurgulanmıştır (10). Bizim çalışmamızda bu reaksiyonun okunması 3. dakikada sona erdirilmiştir. 15 dakikaya uzatma bizim çalışmamızda da MRSA-Screen testinin duyarlılığını artırabilirdi ancak test ticari firmanın önerileri doğrultusunda uygulanmıştır.

Cavassini ve arkadaşları yaptıkları çalışmada; oksasilin disk difüzyon testinin duyarlılığını %61,3, özgüllüğünü %96,7, oksasilin agar tarama yönteminin duyarlılığını %82,5, özgüllüğünü %98,3, MRSA-Screen testinin duyarlılığını %100, özgüllüğünü %99,2 bulmuşlardır MRSA-Screen testi güvenilir, hızlı ve doğru bir test olarak kabul etmişlerdir (70).

Louie ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; oksasilin agar tarama yönteminin duyarlılığı %98,5, özgüllüğü %98, MRSA-Screen testinin duyarlılığını %98,5, özgüllüğünü %100 bulunmuştur (54).

Yamazumi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, SENTRY Antimicrobial Surveillance Program'da dünyanın çeşitli coğrafi bölgelerinden toplanan, kan dolaşımı infeksiyonlarından izole edilen 200 suşu çalışmaya almışlar ve testleri referans sıvı mikrodilüsyon metod ve PZR ile *mecA* genin belirlenmesi ile karşılaştırmışlar, oksasilin agar tarama yönteminin duyarlılığını %98, özgüllüğünü %98, MRSA-screen testinin duyarlılığını %96,5, özgüllüğünü %100 bulmuşlardır (67).

Sakoulas ve arkadaşları yaptıkları çalışmada; altın standart olarak PZR ile *mecA* geni belirlenmesini kullanmışlar, oksasilin agar tarama yönteminin duyarlılığını %99, özgüllüğünü %98,1, MRSA-screen testinin duyarlılığını %100, özgüllüğünü %99,1 bulmuşlar (11).

Bazı çalışmalar düşük seviyede metisilin direnci gösteren suşlarda sefoksitin PBP2a üretimini indüklediği ve lateks aglütinasyon testinin hassasiyetinin artırdığı vurgulanmıştır. Rohrer ve arkadaşları MRSA-Screen testinin sefoksitin induksiyonu öncesi duyarlılığını %93,5, özgüllüğünü %97,7, induksiyon sonrası duyarlılığını %100, özgüllüğünü %95,5 bulmuşlardır (76). Bizim çalışmamızda böyle bir induksiyon yöntemi kullanılmamıştır.

Sefoksitin ve moksolaktamın PBP2a üretimini artırdığı için disk difüzyon yöntemi olarak heterojen suşları belirlemede kullanılabilirliğini araştıran çalışmalar yapılmıştır.

Felten ve arkadaşlarının 83 MRSA klinik izolatu kullanarak yaptıkları sefoksitin, moksolaktam disk difüzyon testleri, oksasilin değişik konsantrasyon,

inokulum ve sıcaklıklarda yapılan disk difüzyon testleri, agar tarama ve MRSA-Screen testin sonuçları tablo 10’de gösterilmiştir. Sefoksitin için inhibisyon zon çapı <27mm, moksolaktam için <24 mm kabul etmişlerdir (12). Tablo 10’da test sonuçları gösterilmektedir.

**Tablo 11. Felten ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma sonuçları**

	DUYARLILIK	ÖZGÜLLÜK
Agar tarama	%94	%100
MRSA-Screen	%97,6	%100
Oksasilin, 1 µg (10 <sup>8</sup> koloni/ml) 37°C	%96,4	%97,1
Oksasilin 5 µg (10 <sup>8</sup> koloni/ml) 37°C	%95,2	%100
Oksasilin 5 µg (10 <sup>6</sup> koloni/ml) 37°C	%41	%100
Oksasilin 5 µg (10 <sup>6</sup> koloni/ml) 30°C	%31,3	%100
Moksolaktam 30 µg (10 <sup>6</sup> koloni/ml) 37°C	%100	%100
Sefoksitin 30 µg (10 <sup>6</sup> koloni/ml) 37°C	%100	%100

Cauwelier ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da sefoksitin ve oksasilinin değişik ısılardaki duyarlılık ve özgüllüklerini, oksasilin agar tarama ve MRSA lateks aglütinasyon testinin duyarlılık ve özgüllüklerini, PZR ile *mecA* geni belirlenmesini altın standart olarak karşılaştırmışlar. Sefoksitin inhibisyon zon çaplarını <20mm ise MRSA, ≥24 ise MSSA olarak kabul etmişler (78). Çalışmanın bulguları tablo 11’de özetlenmiştir.

**Tablo 12. Cauwelier ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma bulguları**

	Duyarlılık	Özgüllük
Agar tarama	%97	%100
MRSA lateks aglütinasyon	%100	%100
Oksasilin disk difüzyon 35°C	%83,5	%100
Oksasilin disk difüzyon 30°C	%100	%100
Sefoksitin disk difüzyon 35°C	%100	%100
Sefoksitin disk difüzyon 30°C	%100	%100

Bu çalışmada, heterojen suşlar için 35°C yerine 30°C’lik inkübasyon ısısının MRSA’ları daha iyi belirlediği ve oksasilin agar taramada PBP2a ekspresyonunun daha yüksek olduğu belirtilmiştir (78).

NCCLS2in son kılavuzunda MRSA'lar için sefoksitin duyarlı ve dirençli zon çapları  $\geq 20$  mm ve  $\leq 19$ mm olarak belirtilmiştir (79).

Bizim çalışmamızda NCCLS kriterleri doğrultusunda 35°C'lik inkübasyon ısısı,  $10^8$  koloni/ml inokülasyon miktarı ve 1µg'lık oksasilin diski kullanılmıştır. Rutin mikrobiyoloji laboratuvarında kullanılan testlerin bir standart şartlar altında yapılması gerekliliği açıktır. Ayrıca her test için ayrı ayrı kültür ortamı oluşturmanın zorluğunu testlerin uygulanabilirliğini azaltmaktadır.

Değişik merkezlerde yapılan çalışmaların sonucu ile bizim çalışmamızın sonuçları arasında, oksasilin agar tarama yöntemi açısından benzer sonuçlar elde edilmiş, fakat PBP2a lateks aglütinasyon test sonuçlarına göre bizim çalışmamızda biraz daha düşük duyarlılık, özgüllük bulunmuştur. Disk difüzyon testinin duyarlılık ve özgüllüğü, çalışmalar arasında farklılık göstermekte, bu da testin kullanılabilirliği tartışması ve yorumlarına yol açmaktadır.

Razlıgı ve arkadaşları (18) yaptıkları çalışmada mikrodilüsyon ve agar tarama yöntemlerini duyarlılık ve özgüllük yönünden %100 uyumlu bulmuşlar, disk difüzyon yöntemini diğer iki yöntemle karşılaştırdıklarında duyarlılığı %100, özgüllüğü %97,5 olarak bulmuşlardır. Agar tarama yönteminin kullanımını önermişlerdir.

Kuzucu ve arkadaşları (80), oksasilin tuz agar tarama ve mikrodilüsyon yöntemlerini disk difüzyon yöntemi ile karşılaştırmışlar, her üç yöntemle MRSA suşlarının tamamını dirençli olarak belirlemişler, disk difüzyon yöntemini kullanılabilir bulmuşlardır.

Öğünç ve arkadaşları (81), agar tarama testini referans test kabul etmişler ve disk difüzyon testinin duyarlılığını %95,5, özgüllüğünü %93,4 olarak bulmuşlardır.

Oğuz ve arkadaşları (82), agar dilüsyon testine göre, disk difüzyon yönteminin duyarlılığını %100, özgüllüğünü %92,6, agar tarama yönteminin duyarlılığını %100, özgüllüğünü %95 bulmuşlardır. Agar tarama yöntemini önermişlerdir.

Sünbül ve arkadaşları (83), disk difüzyon testini agar tarama yöntemi ile karşılaştırmışlar ve duyarlılığını %95,3, özgüllüğünü %95,2, agar tarama ile uyumunu %96 bulmuşlardır. Sonuçta disk difüzyon testinin agar tarama yapılamadığı durumlarda kullanılmasını önermişlerdir.

Atay ve arkadaşları (84), disk difüzyon testini *mecA* gen analizi sonuçları ile karşılaştırmışlar, duyarlılığını %100, özgüllüğünü %91 bulmuşlar. Disk difüzyon yönteminin rutin laboratuarlarda güvenle kullanılabileceğini vurgulamışlardır.

Sancak ve arkadaşları, disk difüzyon yöntemin PZR ile karşılaştırmışlar duyarlılık ve özgüllüğünü %100 bulmuşlardır. Disk difüzyon yöntemini güvenilir bir test olduğunu belirtmişlerdir (85).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda agar tarama yöntemi genellikle referans test olarak kabul edilmiştir. Disk difüzyon yönteminin duyarlılık ve özgüllüğü çalışmalar arasında farklılık göstermekle birlikte, rutin laboratuarlarda kullanılabilir bulunmuş olup, çalışmamız sonuçlarıyla uyumludur.



### 3.6. SONUÇLAR

MRSA belirlemede, disk difüzyon yönteminin duyarlılığı %98,8, özgüllüğü %99,1, oksasilin agar tarama yönteminin duyarlılığı %98,8, özgüllüğü %98,3, PBP2a lateks aglütinasyon yönteminin duyarlılığı %97,7, özgüllüğü %97,4 bulunmuştur.

Rutin laboratuarlarda fenotipik olarak MRSA belirlemede en sık kullanılan yöntem olan disk difüzyon yöntemi heterojen dirençli suşlarda sorun oluştursa da kullanılabilir bir yöntem olma özelliğindedir.

Oksasilin agar tarama yöntemi rutin olarak uygulama zorluğu dışında MRSA suşlarını belirlemek için yeterlidir.

PBP2a lateks aglütinasyon yöntemi bizim çalışmamızda en düşük duyarlılık ve özgüllüğe sahip test olarak bulundu. Ticari bir kit olması, maliyet ve etkinlik açısından dezavantaj sunarken, hızlı bir belirleme testi olması tercih nedeni olabilir. Ancak özellikli durumlarda hızlı olarak MRSA belirlemenin hasta ve tedavi maliyeti açısından fayda sağladığı durumlarda tercih nedeni olabilir.

## 4. KAYNAKLAR

1. Bannerman TL. Staphylococcus, micrococcus, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Manual of Clinical Microbiology, ASM. Washington D.C. 2003, pp 384-404
2. Brumfitt W, Miller JH. Methicillin-resistant staphylococcus aureus. New England J Med 1989;320:1188-1989
3. Ünal S. Stafilokoklarda metisilin direnci. In: Gür D, Söyletir G, Bal Ç ve ark. (ed'ler). Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu Toplantısı. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını 1997;33;72-76
4. Dündar V, Dündar DÖ. Stafilokok infeksiyonları. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (ed'ler). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji Kitabı. Nobel Tıp Kitapevleri İstanbul. 2003, ss1507-1516
5. Ünal S, Werner K, DeGirolami P, Barsanti F, Eliopoulos G. Comparison of detection of methicillin-resistant S.aureus in a clinical microbiology laboratory. Antimicrobial Agent Chemother 1994; 38:345-347
6. Ünal S, Hoskins J, Flokowitsch JE, et al. Detection of methicillin-resistant staphylococci by using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1992; 30:1685-1691
7. Chambers HF, Detection of methicillin-resistant staphylococci. Infec Dis Clin North Am 1993;7: 425-433
8. Deplano A, Struelens MJ. Nosocomial infections caused by staphylococci. In: Woodford N, Johnson AP, Molecular Bacteriology. HP, New Jersey 1988, pp 431-468
9. Leeuwen WB, Pelt C, Luijendijk AD, Verbrungh HA, Goessens HF. Rapid detection of methicillin resistance staphylococcus aureus isolates by the mrsa-screen latex agglutination test. J Clin Microbiol. 1999;37:3029-3030
10. Swenson JM, Williams PP, Killgore G, O'hara CM, Tenover FC. Performance of eight methods, including two new rapid methods, for detection of oxacillin resistance in a challenge set of staphylococcus aureus organisms. J Clin Microbiol 2001;39:3785-3788

11. Sakoulas G, Gold HS, Venkataraman L, et al. Methicillin-resistant staphylococcus aureus: comparison of susceptibility testing methods and analysis of mecA- positive susceptible strains. J Clin Microbiol 2001; 39:3946-3951
12. Felten A, Grandry B, Lagrange PH, Casin I. Evaluation of three techniques for detection of low-level Methicillin-resistant staphylococcus aureus (mrsa): a disk diffusion method with cefoxitin and moxalactam, the vitek 2 system, and the mrsa-screen latex agglutination test. J Clin Microbiol 2002; 40: 2766-2771
13. Francois P, Pittet D, Bento M, et al. Rapid detection of Methicillin-resistant staphylococcus aureus directly from sterile or nonsterile clinical samples by a new molecular assay. J Clin Microbiol 2003;41:254-260
14. Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: Molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev 1997; 10:781-791
15. Noble WC. Staphylococcal disease. In: Collier L, Balchows A, Susman M (eds). Topley Wilson's Microbiology and Microbial Infections. Newyork: Oxford University Pres 1998:231
16. Waldvogel FA. Staphylococcus aureus (including toxic shock syndrome). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. Churchill Livingstone, New York 2000: pp 2069-2091
17. Chambers HF. Methicillin- resistant staphylococci. Clin Microbiol Rev 1988;1:173
18. Razlıghı RA, Derbentli Ş. S. aureus suşlarındaki metisilin direncinin belirlenmesinde mikrodilüsyon, disk difüzyon ve agar tarama yöntemlerinin karşılaştırılması. Aknem Derg 1994 8;62-68
19. Cengiz AT. Staphylococcus. In: Ustaçelebi Ş (ed). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitapevi Ankara 1999:pp339-347
20. Fournier JM, Bouvet A, Mathieu D et al. New latex reagent using monoclonal antibodies to capsular polysaccharide for reliable identification of both oxacillin-susceptible and oxacillin-resistant S. aureus. J Clin Microbiol 1993;31:1342-1344

21. Kluytmans J, Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 1997; 10: 505-520
22. Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilfert CM. *Staphylococcus*. In: Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilfert CM (eds). *Zinsser Microbiology*. Appleton and Lange, Newyork 1992, pp 401-416
23. Hartstein AI, Mulligan ME. Methicillin-resistant *staphylococcus aureus* In: Mayhall CG (ed). *Hospital Epidemiology and Infection Control*. Williams & Wilkins, Baltimore 1996 : pp 290
24. Panlilio AL, Culver DH, Gaynes RP et al. Methicillin-resistant *staphylococcus aureus* in U.S. hospitals, 1975-1991. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1992;13:582-586
25. Fluit AC, Wielders CLC, Verhoef J, Schmitz FJ. Epidemiology and susceptibility of 3,051 *s. aureus* isolates from 25 university hospitals participating in the European SENTRY study. *J Clin Microbiol* 2001;39: 3727-3732
26. Verhoef D, Beaujean D, Blok H et al. A dutch approach to Methicillin-resistant *staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18: 461-466
27. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system report, data summary from january 1992 through june 2003, issued august 2003. *Am J Infect Control* 2003;31:481-498
28. Çetinkaya Y, Ünal S. Metisil dirençli *S.aureus* infeksiyonları: Epidemiyoloji ve kontrol. *Flora İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi* 1996; 1 (ek3):3-16
29. Gürler N, Kaygusuz A, Karayay S, Töreci K. Methicillin-resistant *staphylococci* isolates from pus since 1992 and aminoglycoside and quinolone resistancein these strain. *ANKEM Derg* 1997;11:9
30. Gürler N, Öngen B, Atilla A, Öksüz L, Töreci K. Gram pozitif koklarda seçimsiz duyarlılık deneylerinde saptanan direnç oranları. *ANKEM Derg* 1995;9:109



31. Öztürk R, Midilli K, Ergin S, Aygün G. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi kliniklerinde yatan hastaların klinik materyallerinden izole edilen stafilocokların antimikrobik maddelere duyarlılığı. ANKEM Derg 1995; 9:105
32. Kocagöz S, Gür D, Uzun Ö, Akova M, Ünal S, Akalın HE ve TÜBİTAK Projesi Katılım Merkezleri. Türkiye’ de stafilocoklardaki metisilin direnci. 8. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Program özet kitabı Antalya 1997.:776
33. Değerli K, Özbakkaloğlu B, Sürücüoğlu S ve ark. Klinik örneklerden soyutlanan staphylococcus aureus suşlarının çeşitli antimikrobiklere duyarlılıkları. İnfeksiyon Dergisi 2000; 14:87-90
34. Gündeş SG, Karadenizli A, Willke A. Hastane infeksiyonu etkeni olarak izole edilen staphylococcus aureus suşlarında çoğul antibiyotik direncinin değerlendirilmesi. İnfeksiyon Dergisi 2000;15: 303-306
35. Köksal F, Samantı M. Kan kültürlerinden izole edilen stafilocoklarda antibiyotik direnci. ANKEM Derg 2002; 16: 10-13
36. Baysal B, Tuncer İ, Erayman B, Arslan U. Klinik örneklerden izole edilen staphylococcus aureus suşlarının fusidik asit ve bazı antibiyotiklere duyarlılıkları. İnfeksiyon Dergisi 2003;17:27-30
37. Demir M, Kaleli İ, Cevahir N, Mete E. Çeşitli örneklerden soyutlanan staphylococcus aureus suşlarında antibiyotik direnci. ANKEM Derg 2003; 17: 56-59
38. Arıdoğan A, Atasever L, Bal Ç. Klinik örneklerden izole edilen staphylococcus aureus suşlarının antibiyotiklere dirençleri. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2004; 34: 20-23
39. Esel D, Doganay M, Alp E, Sumerkan B. Prospective evaluation of Blood cultures in a Turkish university hospital: epidemiology, microbiology and patient outcome. Clin Microbiol Infect 2003; 9: 1038-1044
40. Aygen B, Yörük A, Yıldız O, Alp E, Kocagöz S, Sümerkan B and Doğanay M. Bloodstream infections caused by staphylococcus aureus in a university hospital in Turkey: clinical and molecular epidemiology of methicillin resistant staphylococcus aureus. Clin Microbiol Infect 2004; 10: 309-314

41. Gorak EJ, Yamada SM, Brown JD. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in hospitalized adults and children without known risk factors. *Clin Infect Dis* 1999;29:797
42. Ünal S. Stafilokoklarda metisilindirenç mekanizmaları ve metisilin direnç tespit yöntemleri. *Flora* 1996;1:14-17
43. Shangwei WU, Herminia L, Tomasz A. Genetic organization of the *mecA* region in Methicillin-Susceptible and Methicillin-Resistant strains of *staphylococcus sciuri*. *J Bacteriol* 1998; 180: 136-242
44. Gerberding JL, Miick C, Liu HH, Chambers HF. Comparison of conventional susceptibility tests with direct detection of penicillin-binding protein 2a in borderline oxacillin-resistant strain of *staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35: 2574-2579
45. Hackbarth CJ, Kocagöz T, Kocagöz S, Chambers HF. Point mutations in *staphylococcus aureus* PBP 2 gene affect penicillin-binding kinetics and are associated with resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39: 103-106
46. Henze UU, Bächli BB. Penicillin-binding protein 4 overproduction increases  $\beta$ -lactam resistance in *staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40: 2121-2125
47. Hackbarth CJ, Miick C, Chambers HF. Altered production of penicillin-binding protein 2a can affect phenotypic expression of methicillin resistance in *staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:2568-2571
48. Lencastre H, Tomasz A. Reassessment of the number of auxiliary genes essential for expression of high-level methicillin-resistance in *staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38. 2590-2598
49. Gustafson JE, Bächli BB, Strässle A et al. Autolysis of methicillin-resistant and -susceptible *staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:566-572
50. Ryffel C, Strässle A, Kayser FH, Bächli BB. Mechanisms of heteroresistance in methicillin-resistant *staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38: 724-728

51. Komatsuzawa H, Ohta K, Labischinski H et al. Characterization of *fmtA*, a gene that modulates the expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2121-2125
52. NCCLS *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eighth Edition*. NCCLS document M2 –A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003
53. Tokue Y, Shoji S, Satoh K et al. Comparison of a polymerase chain reaction assay and a conventional microbiologic method for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:6-9
54. Louie L, Matsumura SO, Choi E et al. Evaluation three rapid methods for detection of methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2170-2173
55. Griethuysen A, Pouw M, Leeuwen N et al. Rapid slide latex agglutination test for detection of methicillin-resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 1999;37: 3789-2792
56. Fekety R. Vancomycin, teicoplanin and the streptogramins : Quinupristin and dalfopristin. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Churchill Livingstone, New York 2000: pp 382-392
57. Pechere JC. Current and future management of infections due to methicillin-resistant staphylococci infections: the role of quinupristin / dalfopristin. *J Antimicrob Chemother* 1999;44:11-18
58. Schwalbe RS, Intosh AC, Quiyuni S. In-vitro activity of LY 333328, an investigational glycopeptide antibiotic agent enterococci and staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:2416
59. Mulazımođlu L, Drenning SD, Victor LY. In vitro activities of two novel oxazolidinones (U100592 and U100766), a new fluoroquinolone (trovafloxacin), and dalfopristin-quinupristin against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2428-2430

60. NCCLS *Methods for Dilution Antimicrobial Disk Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically ;Approved Standard – Sixth Edition*. NCCLS document M7 –A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003
61. Stefani S, Varaldo PE. Epidemiology of methicillin-resistant staphylococci in Europa . *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 1179-1186
62. Buchholz U, Bronzwaer S I A M, Schrijnemakers P, et. al. EARSS activities and results: update. *Eurosurveillance* 2001;6:2-5
63. Kayabaş Ü. Nozokomiyal infeksiyonlar. Uzmanlık tezi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi 1998.
64. Speers DJ, Olma TR, Gilbert GI. Evaluation of four methods for rapid identification of staphylococcus aureus from blood cultures. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1032-1034
65. Wichelhaus TA, Kern S, Schäfer V, Brade V. Rapid detection of epidemic strains of methicillin-resistant staphylococcus aureus. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 690-693
66. Tomasz A, Nachman S, Leaf H. stable classes of phenotypic expression in methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:124-129
67. Yamazumi T, Marshall A, Wilke WW et. al. Comparison of the vitek gram – positive susceptibility 106 card and the mrsa-screen latex agglutination test for determining oxacillin resistance in clinical bloodstream isolates of staphylococcus aureus. *J Clin Microbiol* 2001;39:53-56
68. Bozdogan B, Esel D, Whitener C et. al. Antibacterial susceptibility of a vancomycin-resistant staphylococcus aureus strain isolated at the hershey medical center. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:864-868
69. Swenson JM. New tests for the detection of oxacillin-resistant staphylococcus aureus. *C Microbiol News* 2002; 24: 159-163
70. Cavassini M, Wenger A, Jatou K et. al. Evulation of MRSA-screen, a simple anti-PBP 2a slide latex agglutination kit, for rapid detection of methicillin resistance in staphylococcus aureus. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 1591-1594.
71. Kohner P, Uhl J, Kolbert C et al. Comparison of susceptibility testing methods with mecA gene analysis for determining oxacillin (methicillin)

- resistance in clinical isolates of staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococcus spp. J Clin Microbiol 1999; 37: 2952-2962
72. Skov RL, Pallesen LV, Poulsen RL, Espersen F. Evaluation of a new 3-h hybridization method for detecting the mecA gene in staphylococcus aureus and comparison with existing genotypic and phenotypic susceptibility testing methods. J Antimicrob Chemother 199; 43: 467-475
73. Swenson JM, Spargo J, Tenover FC, Ferraro MJ. Optimal inoculation methods and quality control for the NCCLC oxacillin agar screen test for detection of oxacillin resistance in staphylococcus aureus. J Clin Microbiol 2001; 39: 3781-3784
74. Ligozzi M, Bonora MG, Fatima M et al. Evaluation of the Vitek system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant gram-positive cocci. J Clin Microbiol 2002; 40: 1681-1686
75. Arbique J, Forward K, Haldane D, Davidson R. Comparison of the Velogene rapid MRSA identification assay, Denka MRSA-screen assay, and BBL Crystal MRSA ID system for rapid identification of methicillin-resistant staphylococcus aureus. Diagn Microbiol Infect Dis 2001; 40: 5-10
76. Rohrer S, Tschierske M, Zbinden R, Berger-Bächi B. Improved methods for detection of methicillin-resistant staphylococcus aureus. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001; 20: 267-270
77. Levi K, Towner KJ. Detection of methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA) in blood with the Evigene MRSA detection kit. J Clin Microbiol 2003; 41: 3890-3892
78. Cauwelier B, Gordts B, Descheemaeker P, Landuyt H. Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30 µg) for detection of methicillin-resistant staphylococcus aureus. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004; 23: 389-392
79. NCCLS. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fourteenth Informational Supplement*. NCCLS document M100-S14 (ISBN 1-56238-516-X). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2004.
80. Kuzucu Ç, Dalgalar M, Durmaz R, Dikerel Ş. Stafilokoklarda metisilin direncinin saptanmasında kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bül 2002; 36: 253-257

81. Ögünç D, Çolak D, Saygan MB ve ark. Staphylococcus aureus suşlarında oksasilin direncinin saptanmasında E-test, mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemlerinin karşılaştırılması. Aknem 2001, 15: 84-87
82. Oğuz VA, Dodanlı S, Yıldırım İ ve ark. Metisilin dirençli staphylococcus aureus (MRSA) prevalansının farklı yöntemlerle araştırılması. Flora 2001; 6: 178-183
83. Sünbül M, Furtun F, Esen Ş ve ark. Hastane enfeksiyonlarından izole edilen stafilococcus aureus suşlarında oksasilin direncinin dört ayrı yöntem ile araştırılması. Mikrobiyol Bült 2000; 34: 215-221
84. Atay T, Gülay Z, Kocagöz S, Yuluğ N. Staphylococcus aureus izolatlarının metisilin direncinin saptanmasında rutin duyarlılık testleri ve mecA gen analizi sonuçlarının karşılaştırılması. Mikrobiyol Bült 2002; 36: 133-140
85. Sancak B, Ercis S, Haşcelik G. Stafilocoklarda metisilin direncinin saptanmasında disk difüzyon yönteminin değeri ve polimeraz zincir reaksiyonu ile karşılaştırılması. Mikrobiyol Bült 2003; 37: 109-115

TC.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

.....ait.....  
.....adlı çalışma, jürimiz  
tarafından..... Anabilim Dalı'nda  
Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih :

İmza

Başkan..... Prof. Dr. Yusuf Özbal..... İmza

Üye..... Prof. Dr. A. Bilent Simerden..... İmza

Üye..... Prof. Dr. Hüseyin Kılıç..... İmza

Üye..... Prof. Dr. Nedret Koç..... İmza

Üye..... Yard. Doç. Dr. Duygu Eysel..... İmza