

T. C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

**METİSİLİNE DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
SUŞLARININ SAPTANMASINDA FARKLI YÖNTEMLERİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

DR. AYKUT ARAZ

**TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. HÖRÜ GAZİ**

MANİSA, 2009

ÖNSÖZ

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ihtisasım boyunca bilimsel bir eğitim ve araştırma ortamı sağlayan, her zaman destek ve hoşgörüsünü gördüğüm Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Süheyla Sürücüoğlu'na, bilgi ve deneyimlerini bizlerle paylaşan başta tez danışmanım sayın Doç. Dr. Hörü Gazi olmak üzere anabilim dalımızın saygıdeğer öğretim üyeleri; Prof. Dr. Beril Özbakkaloğlu'na, Prof. Dr. Tamer Şanlıdağ'a, Doç. Dr. Kenan Değerliye, Doç. Dr. Semra Kurutepe'ye, Doç. Dr. Sinem Akçalı'ya, Doç. Dr. Nuri Özkütük'e, Yard. Doç. Dr. Talat Ecemiş'e, asistanlık eğitimim süresince benden klinik tecrübelerini esirgemeyen Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri; sayın. Doç. Dr. Özlem Tünger ve Doç. Dr. Banu Çetin'e, ihtisasım sırasında her zaman uyum içinde çalışmalarıyla huzurlu bir iş ortamını paylaştığım asistan arkadaşlarıma, laborant arkadaşlarıma, isimlerini saymadığım üniversitemizin tüm çalışanlarına ve aileme sonsuz teşekkürler ederim.

Dr. Aykut Araz

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR

ÖZET

SUMMARY

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
<i>Staphylococcus aureus</i> 'un genel özellikleri	2
İdentifikasyonu	4
Taşıyıcılığı	6
Oluşturduğu infeksiyonlar	6
Antibiyotik duyarlılığı	9
MRSA saptanmasında kullanılan yöntemler	13
Tarama testlerinde moleküler yöntemler ve yenilikler	14
Hastane infeksiyonu etkeni olarak MRSA'nın önemi	16
MRSA infeksiyonlarının kontrolü	17
MRSA infeksiyonlarının önlenmesinde sürveyansın önemi	18
MRSA infeksiyonlarının ekonomik yükü	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
4. BULGULAR	24
5. TARTIŞMA	28
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	32
7. KAYNAKLAR	33

KISALTMALAR

BORSA	: Borderline Rezistan <i>Staphylococcus aureus</i>
CC	: Konjugat kontrolü
CLS	: Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	: Deoksiribonukleik asit
EIA	:Enzim immunassay
HIV	: İnsan immünyetmezlik virusu
IFN	: İnterferon
IL	: İnterlökin
KNS	: Koagülaz negatif stafilokok
MHC	: Major histocompatibility complex
MIK	: Minimum inhibitör konsantrasyon
MLS	: Makrolid-Linkozamid-Streptogramin direnci
MODSA	: Modifiye Rezistan <i>S. aureus</i>
MRSA	: Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	: Metisiline duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
PBP	: Penisilin bağlayan protein
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA	: Ribonukleik asit
SCC	: Stafilokokal kaset kromozomu
TNF	: Tümör nekrotizan faktör
TSST	: Toksik şok sendrom toksini
UC	: Universal kontrolü
VISA	: Vankomisine intermediate (orta) duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
VRSA	: Vankomisine dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
YBÜ	: Yoğun bakım ünitesi

ÖZET

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarının hastane ve toplum kökenli infeksiyon etkeni olarak önemi giderek artmaktadır. MRSA'larda antistafilokokal beta laktam antibiyotiklere karşı gelişen direncin heterojen özellik göstermesi nedeniyle duyarlılık testlerinde sorunlar yaşanmaktadır.

Bu çalışmada, *S. aureus* suşlarında *mecA* geni belirlenmesine dayalı PCR yöntemi altın standart kabul edilerek (Genotype MRSA), oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon, oksasilin E-test, MRSA lateks aglütinasyon ve oksasilin agar tarama yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllüklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Genotype MRSA ile test edilen 100 *S. aureus* suşunun 90'ında *mecA* geni varlığı gösterilmiştir. Çalışmada tüm yöntemlerin özgüllükleri %100 olarak saptanırken, sefoksitin ve oksasilin disk difüzyon, oksasilin E-test ve oksasilin agar tarama testlerinin duyarlılıkları sırasıyla %86.6, 91.0, 88.8 ve 95.6 olarak bulunmuştur. PBP2a saptanmasına dayalı lateks aglütinasyon yöntemi Genotype MRSA ile %100 uyumlu bulunmuştur.

Sonuç olarak, laboratuvarımızda rutin olarak oksasilin disk difüzyon testinin, doğrulama gereken durumlarda ise diğer fenotipik yöntemlere göre daha iyi sonuç vermesi nedeniyle MRSA lateks aglütinasyon testinin kullanılmasının yararlı olacağı düşünülmüştür.

Anahtar kelimeler: *Staphylococcus aureus*, metisilin direnci, *mecA*

SUMMARY

COMPARISON OF DIFFERENT METHODS FOR THE DETECTION OF METHICILLIN RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Methicillin-resistant (MRSA) is responsible for an increasing number of serious nosocomial and community-acquired infections. Phenotypic heterogeneous drug resistance to antistaphylococcal beta-lactams affects the results of susceptibility testing.

The aim of this study was to compare the specificity and sensitivity of the oxacillin and cefoxitin disk diffusion, E-test, MRSA latex agglutination and the oxacillin agar screen tests, with PCR for the *mecA* gene (Genotype MRSA) used as the “gold standard” assay.

Of the 100 clinical isolates of *S. aureus* tested with Genotype MRSA 90 were determined as *mecA* positive. While the specificities of all methods were found as 100 %, the cefoxitin and oxacillin disk diffusion, E-test and the oxacillin agar screen test showed sensitivities of 86.6, 91.0, 88.8, and 95.6%, respectively. MRSA latex agglutination test for detection of PBP2a corresponded 100% with the results of Genotype MRSA.

Our results indicated that, the oxacillin disk diffusion method was the best performing test for routine detection of MRSA in our laboratory. MRSA latex agglutination test is more accurate than any susceptibility testing method and can be use as confirmatory test when necessary.

Key words: *Staphylococcus aureus*, methicillin resistance, *mecA*

GİRİŞ VE AMAÇ

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ilk olarak tesbit edildiği 1961 yılından bugüne hastane infeksiyonları etkenleri arasında önemli morbidite ve mortalite nedeni olmuştur (1). Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de MRSA'lar dirençli hastane infeksiyonu etkenleri arasında ilk sıralarda yer almaktadır (2).

Günümüzde metisilin direnci genellikle beta laktam dışındaki antibiyotikleri de kapsayan çoklu ilaç direnci şeklindedir. Ciddi tedavi sorunlarına neden olan MRSA' larda direncin doğru bir şekilde belirlenmesi uygun antimikrobik ilacın kullanımını sağlamak için gereklidir. Dirençli suşlar hastane ortamında kolaylıkla üreyebilmekte ve bunlara bağlı kolonizasyon ve infeksiyon görülme olasılığı artmaktadır (3). Bu nedenle MRSA infeksiyonlarının hızlı mikrobiyolojik tanısı infeksiyon kontrol önlemlerinin alınması açısından büyük önem taşımaktadır.

S. aureus suşlarında metisilin direncinin saptanmasında ülkemiz klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında CLSI (Clinical Laboratory Standarts Institute)'in önerdiği disk difüzyon, sıvı mikrodilüsyon ve agar tarama gibi geleneksel yöntemler kullanılmaktadır (4). Son yıllarda metisilin direncine neden olan *mecA* geni tarafından kodlanan PBP2 varlığını saptayan lateks aglütinasyon testleri de geliştirilmiştir. Ancak stafilokoklarda metisilin direnci değişken (heterojen) olabildiğinden kültüre dayalı yöntemler ile güvenilir bir şekilde saptanmasında önemli sorunlar yaşanmaktadır. Bu nedenle metisilin direncinin belirlenmesinde dirence yol açan *mecA* geni varlığının nükleik asit çoğaltma yöntemleri ile gösterilmesi referans yöntem olarak kabul edilmektedir (5). Diğer taraftan ise bu yöntemlerin hızlı ve doğru sonuç vermelerinin yanı sıra pahalı olmaları, özel ekipman ve eğitimli personel gerektirmeleri nedeniyle laboratuvarlarda rutin kullanımları kısıtlıdır.

Bu çalışmanın amacı metisilin direncinin belirlenmesinde kullanılan fenotipik yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin moleküler bir yöntem olan GenoType MRSA testi ile karşılaştırılması ve laboratuvarımız için güvenilir ve uygulanabilirliği en kolay fenotipik yöntemi belirlemektir.

GENEL BİLGİLER

Stafilokoklar ilk kez 1878 yılında Robert Koch tarafından tanımlanmışlardır. 1880 yılında Ogston ise “mikrokoklar, aktiviteleri düşük ve yayılma alanları sınırlı olduğunda yüzeysel süpüratif inflamasyona yol açan, ancak etkinlikleri daha fazla olursa ve yayılma imkanı bulurlarsa septisemi ve piyemi oluşturan mikroorganizmalardır” şeklinde bu patojenlerin önemine dikkat çekmiştir. Bu tanımın üzerinden geçen yıllara ve bilimdeki gelişmelere rağmen *Staphylococcus aureus* halen tehlikeli bir patojen olma özelliğini devam ettirmektedir. Hem hastane hem de toplum kökenli *S. aureus* infeksiyonlarının görülme sıklığı giderek artmakta, aynı zamanda gelişen çoklu ilaç direnci nedeniyle tedavide sorunlara neden olmaktadır (3).

***Staphylococcus aureus*'un genel özellikleri**

Stafilokoklar, gram-pozitif kok morfolojisindeki bakterilerin önemli bir bölümünü içinde bulunduran Micrococcaceae familyasında en çok klinik öneme sahip olan genus içindedirler. Micrococcaceae ailesinin diğer üyeleri (Planococcus, Stomatococcus, Micrococcus) ise insanda hastalık oluşturmaz veya özel hasta gruplarında nadiren infeksiyona neden olurlar (6).

S. aureus, içerdiği çeşitli virülans faktörleriyle stafilokoklar arasında en patojen türdür (3).

Stafilokoklar 0.5-1.5 µm çapında, yuvarlak, hareketsiz, sporsuz, katı besiyerinde birbirine bakan iki dik yüzeyde bölünerek üreyen ve yavru hücrelerin birbirinden ayrılması sonucu üzüm salkımına benzeyen, sıvı besiyerinde diplokoklar veya kısa zincirler halinde görülen mikroorganizmalardır. Aerop ve fakültatif anaerob bakterilerdir. Optimal üreme ısıları 30–37 °C'dir. Yirmidört saat inkübasyon sonrasında agar plaklarında 1-3 mm çaplı, yuvarlak, düzgün, sarı renkli koloni görünümüne sahiptirler. Kapsüllü olan suşlar mukoid koloni yapabilirler. Kanlı agarda makroskopik olarak *S. aureus* kolonileri etrafında beta hemoliz bulunmakta olup karotenoid pigment nedeniyle altın sarısı rengindedir. Stafilokokların diğer ayırt edici özellikleri ise 200 µg/ml lizostafinle erimeleri, 0.04

U basitrasine dirençli, 100 µg furazolidona duyarlı, oksidaz negatif, anaerob ortamda glukozdan ve 0.4 µg/ml eritromisin varlığında gliserolden asit oluşturmalarıdır (7).

Stafilokokların genomu yaklaşık 2800 baz çiftli sirküler bir kromozom ile profajlar, plazmidler ve transpozonlardan oluşur. Bakterinin virülansından ve direncinden sorumlu olan genlerin diğer *S. aureus* kökenlerine, başka stafilokok türlerine ve farklı cins gram-pozitif bakterilere en sık aktarılma yolu transdüksiyondur (8).

Bakteri kuru ağırlığının yaklaşık %50'sini peptidoglikan tabaka oluşturmaktadır. Peptidoglikan tabaka N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramikasit polimerlerinden oluşur. Bu tabaka insanda gram negatif bakterilerin endotoksinlerine benzer aktivite gösterir, yani makrofajlardan sitokin salınımını uyarır, kompleman aktivasyonuna yol açar ve trombosit agregasyonuna neden olur. Monositlerden IL-1 (interlökin-1) salınımını uyararak polimorfonükleer lökositlerin infeksiyon bölgesine toplanmasına ve abse oluşumuna yol açar. Vücudun önemli savunma sistemlerinden lizozim enziminin de hedefi peptidoglikan tabakadır (9).

Sadece Gram-pozitif bakteri duvarında bulunan teikoik asit mukozalarda bulunan özgül reseptörleri (fibronektin, fibrinojen, laminin, vitronektin, elastin, sialoprotein ve kollajen) ile birleşerek stafilokokların konağa aderansını sağlar (9).

S. aureus klinik izolatlarının %90'ından fazlasında polisakkarid yapıda mikrokapsül bulunmaktadır. Bu kapsül bakteriyi fagositozdan korur ve konak hücrelerine ve özellikle kateter gibi yabancı cisimlere kolaylıkla yapışmasını sağlar. Günümüze kadar tanımlanan 11 kapsül serotipin içinde özellikle tip 8 ve 5 insan infeksiyonlarının %75'inden sorumludur (10).

Protein A, clumping faktor A ve B, kollajen bağlayıcı protein, fibronektin bağlayıcı protein A ve B, plazmin sensitif protein, serin-aspartat tekrarlayıcı protein, *S. aureus* yüzey protein A-K konakçı proteinlerine adansta rol oynayan yüzey proteinleridir. Protein A bazı immünglobulinlerin (IgG1, IgG2, IgG4) Fc reseptörleri ile birleşebilmekte, böylelikle antifagositer ve antikomplemanter etkinlik gösterebilmektedir. Ayrıca bu protein *S.aureus*'un nonspesifik taşıyıcı olarak kullanıldığı koaglütinasyon testlerinin esasını oluşturmaktadır. Stafilokokal protein A'nın koagülaz ve nükleaz aktiviteleri ile büyük oranda paralellik

göstermesi, antifagositik etki yaratması ve antibiyotik duyarlılığını azaltması gibi özellikleri patojenite kriteri olacağına işaret etmektedir (9).

S. aureus konak hücre morfoloji ve fonksiyonunu etkileyen çok sayıda ekzoenzim, membran-aktif protein (hemolizin ve lökositinler) ve toksin üretme yeteneğine sahiptir. Bu toksinler sayesinde konak dokuda yayılım, invazyon, süperantijen özellikleriyle de toksik etki sağlanır (10).

S. aureus α -, s-, γ -, δ - olarak adlandırılan en az beş çeşit hemolizine sahiptir. Bunlar eritrosit ve diğer ökaryotik hücreleri eritebilirler (10). Son yıllarda tanımlanmış olan Panton Valentine toksini ise γ -hemolizinin bir benzeridir, mobil bir faj üzerinde kodlanır ve transfer edilebilir (11). *S. aureus*'a bağlı cilt infeksiyonları, genç hastalarda ağır hemorajik pnömoni ve fronkül oluşumu ile ilişkili bulunmuştur (12).

Epidermolitik toksin; enterotoksinler, toksik şok sendrom toksin-1 (TSST-1) gibi pirojenik toksinler süperantijen yapısındadır. Monosit ve makrofajlardaki hücre içi protein hazırlığını bu antijen sunan hücreler tarafından peptidlerin sunulma aşamalarına gerek kalmadan, yani MHC sınıf II reseptörlerine klasik antijen bağlanma bölgesinden değil, T hücre reseptörlerinin değişken bölgesine bağlanarak aşırı miktarda IL-1, TNF (tümör nekrotizan faktör), ve IFN- γ (interferon) salınımına neden olur. Vücutta küçük bir süperantijen üreten *S. aureus* odağı bulunması bile ciddi sistemik etkilere neden olabilir (10).

Stafilokoklar lipaz, hyaluronidaz, fibrinolizin, penisilinaz, katalaz, koagülaz ve deoksiribonükleaz gibi özellikle komşu dokulara yayılımı kolaylaştırarak virulansta rol oynayan enzimler üretirler. β -laktamaz ise penisilin direncine neden olan enzimdir (13).

***S. aureus*'un identifikasyonu**

Günümüzde *S. aureus* identifikasyonu için tüp koagülaz testi referans yöntem olarak kabul edilmektedir (13). Koagülaz testi, lam yöntemiyle bağlı, tüp yöntemiyle de serbest koagülazın tayini için kullanılır. Lam koagülazı negatif olan stafilokoklar için mutlaka tüp koagülazı testi de uygulanmalıdır. *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. schleiferi* gibi bazı koagülaz negatif stafilokok (KNS) türlerinde de var olan "clumping faktor" nedeniyle testin olumlu bulunabileceği unutulmamalıdır (14).

Tüp ve lam koagülaz dışında bir çoğunun özgüllük ve duyarlılığı %90'ın üzerinde olan plazma ile kaplı lateks partiküllerin kullanıldığı lateks aglütinasyon, fibrinojen ile duyarlılaştırılmış koyun eritrositlerinin kullanıldığı pasif hemaglütinasyon ile çeşitli florojenik koagülaz testleri de geliştirilmiştir. *S. aureus*'un nükleik asitleri hidrolize eden DNA'az ve termostabil endonükleaz enzimleri üretebilmesinden yola çıkarak hazırlanan testlerden de yararlanılmaktadır. Bu yöntemler dışında, toprak, dışkı, burunda aranması amacıyla *S. aureus*'un KNS'lerden farklı olarak mannitolu fermente etme özelliği de kullanılmaktadır. Ancak nadir mannitolu fermente eden KNS'lerden ayrımı için tüp koagülaz testiyle doğrulama yapılmalıdır (3).

Stafilokok türlerinin ayırt edici özellikleri Tablo 1'de gösterilmiştir:

Tablo 1: İnsanlarda sık enfeksiyona neden olan stafilokok türlerinin ayırt edici özellikleri

Test	<i>S. aureus</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S.saprophyticus</i>
Koagülaz	+	-	-
Mannitolden asit yapımı	+	-	±*
Deoksiribonükleaz(DNA'az)	+	-	-
Novobiyosine direnç	-	-	+**
Anaerobik şartlarda üreme	+	+	-***
Hemoliz	+	- (+)****	-

* Genelde pozitif, nadir olarak negatif

** 1.6 µm/ml ya da daha az novobiyosin varlığında üreme

*** *S. saprophyticus*'un anaerobik ortamda üremesi çok yavaş veya hiç yok

**** Genelde negatif, bazen pozitif olabilir

S. aureus identifikasyonu üzerinde diğer çalışılan yöntemler anti protein A antikorları ile kaplı lateks partiküllerin kullanıldığı lateks aglütinasyon, *S. aureus*'un üremesini spesifik olarak inhibe eden alfazurin A boyasının kullanıldığı disk difüzyon, sadece *S. aureus*'un ürettiği bir enzim olan asetilglükozaminidaz antikorlarından yararlanılan enzim immunassay (EIA) yöntemleridir (6).

Günümüzde bakterilerin biyokimyasal özelliklerinden yararlanılarak yarı otomatize ve otomatize hazır ticari kitler ile *S. aureus*'un identifikasyonu yapılabilir (1).

Son yıllarda bakterilerin hızlı identifikasyonunu sağlayan ve *S. aureus*'un termostabil endonükleazlarını kodlayan *nuc* geni için özgül problemlerin kullanıldığı deoksiribonükleik asit (DNA) prob ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) teknikleri de kullanıma girmiştir (6).

***S. aureus* taşıyıcılığı**

İnsanda hastalık etkeni olan stafilokoklar cilt ve mukozal yüzeylerde kolonize olurlar. Çalışmalar anterior burun deliklerinin en sık kolonize olan bölge olduğunu göstermiştir. *S. aureus* taşıyıcılığı intermitant olabileceği gibi, persistant da olabilmektedir. Sağlıklı bireylerin %20-75 intermitant ve %10-35'i persistant taşıyıcılık gözlenirken, toplumdaki kişilerin %5-50'sinde taşıyıcılıktan söz edilmez. Persistant taşıyıcılarda bakteri yükü daha fazladır ve bu nedenle infeksiyon gelişme riski daha yüksektir (7, 15).

Diabetes mellitus, hemodiyaliz veya periton diyaliz hastaları, intravenöz ilaç kullanıcıları, *S. aureus* cilt infeksiyonu olanlar, karaciğer yetmezliği ve HIV infeksiyonu gibi bazı hasta gruplarında taşıyıcılık belirgin olarak artmıştır (15). Genel popülasyonda ortalama %33 olan taşıyıcılık, sağlık çalışanlarında %50-90'a çıkmaktadır. Birçok hastanede endemik hale gelmiş olan MRSA için kaynak genelde kolonize veya infekte olan hasta ya da sağlık çalışanları olmaktadır. Hastadan hastaya bulaşmada sağlık çalışanlarının elleri en önemli araçtır. Yara debridmanı, trakeal aspirasyon, kateter bakımı, elbise değiştirme gibi işlemlerden sonra personelin ellerinde MRSA bulunabildiği gösterilmiştir (16, 17). Çok daha sık karşılaşılan bir durum ise kendisi nazal taşıyıcı olan personelin elleriyle hastaya bulaştırmasıdır (3). Ülkemizin çeşitli merkezlerinde yapılan çalışmalarda hastane personeline *S. aureus* taşıyıcılığı %29.2-31.5 olarak saptanmıştır (18, 19).

***S. aureus*'un oluşturduğu infeksiyonlar**

S. aureus'un neden olduğu infeksiyonları dört grup içinde incelemek mümkündür;

- Deri infeksiyonları

- Septisemi-endokardit
- Organ infeksiyonları
- Toksinlerle oluşan hastalıklar

Klinik şekiller arasında birinden diğerine geçiş olabilmektedir. Basit deri infeksiyonu letal bakteriyemi ile sonuçlanabilir veya devamında metastatik infeksiyon odakları gelişebilir. Ayrıca toksin salgılayan bir suşsa toksik şok sendromuna neden olabilir (7).

Deri-Yumuşak Doku İnfeksiyonları

S. aureus temel olarak piyojenik eksuda veya abse gelişimini indükler. Tutulan anatomik yapıya göre değişik klinik formlar oluşabilir (7).

1. İmpetigo; epidermin tutulumu
2. Follikülit; superfisyal dermin tutulumu
3. Fronkül; karbonkül, hidradenitis süpürativa: derin dermin tutulumu
4. Erizipel; sellülit, fasiit: subkutan dokuların tutulumu.

Bakteriyemi

Son yıllarda *S. aureus*'a bağlı kan-dolaşımı infeksiyonu insidansı giderek artış göstermektedir. Genelde iki gruba ayrılmaktadır:

1. Hastanede kazanılmış bakteriyemi; hastaneye yatıştan iki günden sonra kazanılan bakteriyemi.
2. Toplumdan kazanılmış bakteriyemi; hastaneye yatışın ilk iki gününde veya başvuru esnasında saptanan bakteriyemi.

Bu iki grup giderek birbiriyle örtüşmeye başlamıştır. Bu yüzden "toplumdan kazanılmış bakteriyemi" yerine "toplum başlangıçlı bakteriyemi" olarak adlandırmanın daha doğru olacağı düşünülmektedir.

Hem toplum hem de hastane kökenli bakteriyemiler, uygun antibiyotik tedavisine rağmen yüksek morbidite ve mortalite ile seyreder. Periferik emboli bulguları ve beraberinde infektif endokardit bulunması, mortalitenin çok yüksek olabileceğine işaret eder. Önemli süpüratif komplikasyonları vardır; osteomyelit, septik artrit, menenjit, infektif endokardit ve diğer tüm visseral organlarda stafilokokal infeksiyonlar ortaya çıkabilir. Süpüratif olmayan komplikasyonları ise; septik şok ve dissemine intravasküler koagülasyondur (1, 7).

Nozokomiyal *S. aureus* bakteriyemisi daha çok intravasküler veya üriner kateter varlığı gibi invazif medikal girişimler ile ilişkilidir. Ancak *S. aureus* bakteriyemisi hastanelerde gelişen tüm febril septik atakların ayırıcı tanısında düşünülmelidir (7).

Endokardit

Doğal kapakta gelişen infektif endokardit *S. aureus* bakteriyemisinin en ciddi komplikasyonlarından biridir. Valv replasmanı yapılsa da uygun antibiyoterapiye rağmen letal seyredebilir. Eskiden predispozan faktör olarak romatizmal kalp hastalığı başta gelirken artık yerini intravenöz ilaç kullanımı, diyaliz, intravasküler protez, yaşlı hastalarda kapak sklerozu, nozokomiyal kazanım gibi faktörlere bırakmıştır (20,21).

Pnömoni ve Ampiyem

S. aureus toplumdaki kazanılmış pnömonilerin % 10'undan sorumlu iken hastanede kazanılmış pnömonilerde %20-30 oranında izole edilmiştir (22). Toplum kökenli *S. aureus* pnömonisi daha çok viral alt solunum yolu infeksiyonlarından sonra, bakımevlerinde kalan 75 yaşından büyük yaşlı hastalarda, diyabet ve alkolizm gibi predispozan faktörlere sahip hastalarda görülür. İnflüenza epidemilerinden sonra insidansı artar. Hastane kökenli *S. aureus* pnömonisi entübasyon veya aspirasyon ile ilişkili meydana gelir, ancak sağ kalp endokarditi veya bakteriyemi ile hematogen yayılımla da ulaşabilir (22).

Osteomyelit

%50-70 oranında etken *S. aureus*'dur. Hematojen yayılım veya kirli kontaminasyon sonucu kemiği infekte eder (7).

Septik artrit

Çocuk ve erişkin nongonokokal artritlerinde *S. aureus* en sık sorumlu olan etkidir. Lokal travma sonucu, hematogen veya iyatrojenik olarak gelişebilir. Erişkinlerde romatoid artrite sekonder gelişebilir (23).

Stafilokokal Haşlanmış Deri Sendromu

Eksfoliatin A ve B salgılayan suşlar tarafından oluşturulur. Geniş bir klinik spektruma sahiptir. Ciddi sepsis, sıvı elektrolit kaybı sonucunda hipovolemi, sepsis sendromu ve % 1-10 oranında ölüm görülür. Tutulan deri bölgesinde *S. aureus* gösterilemez. Büllöz impetigo en sık görülen formudur. İnfantlarda tanımlanan Ritter hastalığında, eksfoliatif toksinle ilişkili deri lezyonlarının yanı sıra nazofarinks, umblikus ve üriner sistemin tutulumu söz konusudur (3).

Toksik Şok Sendromu (TSS)

Başlıca bulguları yüksek ateş, hipotansiyon, bol sulu ishal, eritroderma, mental konfüzyon ve renal yetmezlik olan ciddi bir tablodur. TSS ilk olarak 1980 yılında kadınlarda tampon kullanımı ile ilişkilendirilmiştir. Menstruasyon ile ilişkili olmayan TSS'lu hastalarda stafilokoklar vücudun diğer bölgelerinden izole edilebilmektedir. Normal popülasyonda TSST-1'e karşı koruyucu antikor titreleri %90'dan fazla oranda bulunurken TSS'lu hastaların %90.5'ten fazlasında akut dönem serumlarında koruyucu antikor bulunmadığı ve konvelesan dönemde de %50'sinde koruyucu antikor oluşmadığı görülmüştür (10).

Besin Zehirlenmeleri

Genelde salgınlar şeklinde görülür. Enterotoksin B ve diğer enterotoksinlere bağlı olarak gelişir. Toksin ısıya dirençli olup kaynatma veya pişirme ile inaktive olmaz. Sütü tatlılar, konserveler, etli yiyecekler, patates salataları ve dondurma en sık rastlanan sorumlu besinlerdir. 2-6 saatlik inkübasyon süresinden sonra bulantı, kusmayla başlayıp ishalle devam eder. Ateş ve nörolojik bulgu yoktur. Prognoz iyi olup tüm semptomlar sekiz saatte düzelir (7).

Antibiyotik duyarlılığı

Beta laktam antibiyotiklere direnç

Klinik kullanıma girdiği dönemlerde penisiline hemen tüm *S. aureus* kökenleri duyarlı iken, 1944 yılından başlayarak plazmid kökenli beta laktamaz üretimine bağlı ortaya çıkan penisilin direnci hızla yayılmış ve 1970 yılından sonra tüm dünyada penisiline duyarlı köken oranı çok azalmıştır. Günümüzde, özellikle hastane kaynaklı izolatlarda bu oran % 5'in altına düşmüştür (24).

Stafilokoklarda penisilin direnç mekanizması indüklenebilir beta laktamaz (penisilinaz) üretimidir. Beta laktamaz salgılanmasını sağlayan *blaZ* geni büyük bir plazmid içinde bulunan aktarılabılır bir elementin parçasıdır. Bu genin ekspresyonunun düzenlenmesinden ise *blaR1* ve *blal* adlı iki gen sorumludur. *blaz* ile *blaR1* ve *blal* arasında da bir operatör bölge bulunmaktadır. Ortamda bir beta laktam antibiyotik bulunmadığı durumlarda, *blal* geninin ürünü olan blal proteini bu operatör bölgeye bağlanıp, *blaZ*den RNA (ribonükleik asit) transkripsiyonunu baskılar. Böylece beta laktamaz enzimi üretimi düşük düzeylerde tutulur. *blaR1* geninin ürünü olan blaR1 proteini ise bakterinin hücre içi ve dışı arasında ilişkide olacak şekilde sitoplazmik membranda yerleşmiştir. Bu proteinin bakterinin hücre dışında kalan bölümünde penisilin bağlayıcı bir bölge yer almaktadır. Ortamda beta laktam antibiyotik bulunduğu durumlarda, blaR1 proteini hücre dışında bulunan penisilin bağlayıcı bölgesi aracılığı ile antibiyotiği tanır ve blaR1 proteininin hücre içinde kalan çinko metalloproteinaz bölge inaktif proenzimden, aktif proteaza dönüşür. Bu enzimde blal proteinini parçalayarak operatör bölgeye bağlanmasını engeller. Bu bağlanmanın olmaması sonucu *blaZ* geninin transkripsiyonu serbest kalır ve beta laktamaz enzimi üretimi artar (25).

Stafilokoklarda metisilin direncinin mekanizması beta laktam antibiyotiklere düşük afinite gösteren farklı PBP'lerin (PBP2a) sentezlenmesi veya beta laktamazların aşırı yapımıdır. Bu nedenle metisiline dirençli bir stafilokok beta laktam antibiyotikler ile karşılaştığında, diğer tüm PBP'ler antibiyotik tarafından bloke edilse bile PBP2a düşük afinite nedeni ile beta laktam antibiyotiği bağlamaz ve hücre duvarı sentezini sürdürür. Bu nedenle metisiline dirençli olan bir stafilokok kökeninin, duyarlılık testi yapılmaksızın tüm beta laktam grubu antibiyotiklere dirençli olduğu kabul edilir. Ayrıca, direnç genlerinin birlikte taşınması nedeniyle, metisiline dirençli stafilokok kökenleri sadece beta laktam antibiyotiklere değil, diğer birçok antibiyotiğe de dirençli olabilir (25, 26). Metisiline dirençli stafilokoklar, metisiline duyarlılardan farklı olarak PBP2a'yı kodlayan 76 kDa'lık *mecA* genine sahiptirler. *mecA* geni, stafilokoksik kaset kromozomu (staphylococcal cassette chromosome-SCC) olarak tanımlanan bir genomik adacığın parçasıdır. Bu adacıkta *mecA* geninin yanı sıra diğer antimikrobiyallere dirence neden olan genler de bulunabilir ve SCCmec olarak adlandırılır (27). SCCmec, kromozom içindeki homolog bölgelere entegrasyonunu sağlayan direkt veya inverted tekrarlarla sınırlandırılmıştır. Tüm elemanın hareketine aracılık

edebilen rekombinazlar (*ccrA* ve *ccrB*) ve beta laktam direncine aracılık eden *mecA* geni en önemli SCCmec genleridir. Bazı SCCmec'lerde *mecA* geninden önce *mecR1* ve *mecl* regülatör determinantları bulunabilir. *mecR1* bir membran reseptörünü, *mecl* ise bir gen reseptörünü kodlar. Beta laktam antibiyotiklerin varlığında membran *mecR1* reseptörünün hücre dışındaki parçası, onun intrasitoplazmik parçasının otokatalitik parçalanmasını tetikler. Serbestleşen intrasitoplazmik peptid, metalloproteaz olarak görev yaparak *mecl* reseptörünü parçalar, böylece gen ekspresyonu üzerindeki baskı kalkar ve PBP2a sentezi artar. PBP2a sentezinin bu şekilde düzenlenmesinin nedeni, PBP2a'nın aşırı yapımının bakteri için toksik olabilmesidir. *MecR1* ve *mecl*'nin stafilokokların beta laktamaz geni olan *blaZ*'nin düzenlenmesinde görev yapan *blaR1* ve *blaI* ile homolojisinin yüksek olması nedeniyle *mecA* regülatör genlerinin *blaZ* sisteminden alındığı düşünülmektedir. Ancak, beta laktam antibiyotiklerle karşılaşmadan sonra PBP2a'nın ekspresyonu (48 saate kadar uzayabilir) beta laktamaz (15 dakika içinde gerçekleşir) kadar hızlı ve güçlü bir biçimde indüklenemez. Bunun nedeni beta laktam antibiyotiklerin *mecR1* geninin ürünü olan *mecR1* membran reseptörünü etkin biçimde aktive edememeleridir. Bu nedenle *mecA* geni taşımalarına karşın pre-MRSA adı verilen bazı suşlar metisiline duyarlı olabilirler. *Mecl* veya *mecA* promoter/operatör bölgelerinde mutasyon veya delesyonu olan suşlarda ise, *mecl*'nin baskılaması ortadan kalkar ve konstitütif PBP2a sentezi gerçekleşir. Antibiyotik kullanımının seçici baskısına bağlı olarak seleksiyona uğrayan bu bakterilerde homojen veya heterojen metisilin direnç fenotipi gelişir. Homojen direnç fenotipinde koloniyi oluşturan mikroorganizmaların tümünde yüksek düzey (MIK>128mg/L) metisilin direnci varken, heterojen fenotipte ise bakterilerin az bir kısmında ($1/10^6$) yüksek düzey metisilin direnci eksprese edilmektedir (25, 26, 27, 28, 29).

Günümüzde beş tip SCCmec tanımlanmıştır. SCCmec Tip 1 bilinen ilk MRSA suşudur (Jevons suşu) ve diğer antibiyotiklere direnç geni bulundurmamaktadır. Tip 2 ve 3'ün özelliği ise çoklu ilaca dirençli olmaları ve özellikle hastane ortamından izole edilmeleridir. Tip 4 SCCmec tipik olarak toplumdan kazanılmış stafilokoklarda tanımlanmıştır. Boyutları hastane kökenlerinden daha küçüktür (yaklaşık 15 kb) ve çok sayıda antibiyotik direnç geni taşımadığından mobilize olması daha kolaydır (27, 28, 29).

MecA geninin ürünü, 76 kDa ağırlığında bir protein olan ve PBP2a ya da PBP2 adı verilen bir enzimdir. Bu yüksek molekül ağırlıklı transpeptidaz enzimi diğer PBP'ler gibi hücre duvarı peptidoglikanlarının çapraz bağlarının oluşumunu katalizler, ancak metisilin ve diğer beta laktam antibiyotiklere çok düşük afinite gösterir. Bu nedenle PBP2'ye sahip olan stafilokok kökenleri tüm beta laktam antibiyotiklere intrinsek olarak dirençlidirler. PBP2'nin fonksiyon görebilmesi için bazı substratlara gereksinimi vardır ve bu substratların oluşumunu etkileyen faktörler metisilin direncini etkileyebilir (25, 27).

Beta laktam antibiyotikler yüksek molekül ağırlıklı PBP'lerin transpeptidaz bölgesini inhibe ederler, ancak transglikolizidaz bölgesine etkili değildirler. Bu bölgenin inhibisyonunun metisilin direncinde önemli azalmaya neden olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle PBP'nin transglikolizidaz bölgesine etkili bileşiklerin geliştirilmesi, metisiline dirençli stafilokokların tedavisi için ümit verici olarak görülmektedir (29,30).

Glikopeptid Direnci

Metisiline dirençli stafilokok, *Clostridium difficile* ve enterokok infeksiyonlarının tedavisinde artan glikopeptid kullanımı son yıllarda vankomisine dirençli stafilokokların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Vankomisine karşı duyarlılık azalması ilk olarak daha az virülan olduğu düşünülen koagülaz negatif stafilokoklarda bildirilmiştir (31).

1997 yılında ilk olarak Japonya'dan Hiramatsu ve arkadaşları tarafından SA-RVS susu bildirilmiştir. MİK değeri 8 µg/ml olan bu suş ilk VISA (vankomisine orta düzeyde duyarlı *S. aureus*) olarak literatürde yerini almıştır (3). Bu olgu bildirimini Amerika Birleşik Devletleri (ABD), Japonya, Fransa, İngiltere ve Almanya'dan bildirilen VISA'lar izlemiştir. Bu suşların ortak özellikleri hepsinin MRSA olması ve klonal olmamalarıdır (32). Orta düzey glikopeptid direnci peptidoglikan duvar yapısını etkileyen kromozomal mutasyonlardan kaynaklanır. Bu suşlarda hücre duvarı daha kalın ve düzensizdir. Çapraz bağ sayısı azalmış ve vankomisini bağlayabilecek serbest D-Ala-D-Ala kalıntısı artmıştır. VISA'lar glikopeptid tedavisine yanıtızlığa yol açabilmelerinin yanı sıra, düşük düzeyde direnç ve heterojenik fenotip laboratuvar tanısını zorlaştırmaktadır (33, 34).

VRSA (vankomisine dirençli *S. aureus*) suşları yayılım ve direnç açısından VISA'lardan farklıdır. VISA'lardaki kromozal dirençten farklı olarak VRSA

suşlarında direnç *Enterococcus faecalis*'teki *vanA* operonunun konjugal transferi sonucu gelişmiştir. İlk VRSA vakasında hastanın infekte kronik bacak ülserinden VRSA ile birlikte vankomisine dirençli enterokok (VRE) izole edilmiştir. Bu suşta *vanA* ve *mecA* genleri tespit edilmiştir. VanA tipi dirençte mekanizma terminal peptiddeki D-Ala-D-Ala'nın yerini D-Ala-D-Lac'ın alması ve vankomisinin bu yapıya bağlanamamasıdır. VRSA'lardaki vankomisin MİKdeğeri ≥ 128 µg/ml olarak bildirilmektedir (35).

Kinolon Direnci

Gram-negatif bakterilere karşı çok düşük MİK değerlerine sahip olan kinolonlar için gram pozitif bakterilerde MİK değerleri oldukça yüksektir ve terapötik doza yakındır. Sınırdaki aktif bu ilaçların MRSA gibi problemlili gram pozitif bakterilerin tedavisinde kullanımı dirençli kökenlerin seçilmesini sağlamıştır. Kinolon direnci ilaç efluks pompası *norA*'nın fazla ekspresyonu ya da hedef topoizomerez IV ve DNA girazdaki yapısal mutasyonlara bağlı olarak gelişmektedir (36).

Makrolid-Linkozamid-Streptogramin Direnci (MLS)

S. aureus kökenlerinde en sık rastlanan MLS direnç mekanizmaları ribozom modifikasyonu ve ilaç efluks pompası indüksiyonudur. Ribozom modifikasyonu "*erm* geni" tarafından kodlanan 23S rRNA'ya metil gruplarının eklenmesi ile olur. Transpozon veya plazmid gibi mobil elementler üzerindedir ve bazı ilaçlar tarafından indüklenebilir. Sadece makrolidler iyi indükleyicilerdir, ancak bir kez indüklendikten sonra Linkozamid ve StreptograminB'lere de çapraz direnç gelişir. Hastane kaynaklı MRSA'larda MLSB direnci çok yüksek oranlarda (>%90) vardır (37).

Metisilin diencinin saptanmasında kullanılan yöntemler

Metisilin direncinin fenotipik olarak belirlenebilmesi için Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)'un önerdiği yöntemler sefoksitin ya da oksasilin kullanılarak yapılan disk difüzyon, oksasilin agar tarama ve dilüsyon ile oksasilin MİK'i belirleme testleridir. Difüzyon testlerinde *S. aureus* ve *S. lugdunensis* dışındaki koagülaz negatif stafilkoklar için eğer penisilinaza dayanıklı bir penisilin test edilecekse, saklanma sırasındaki dayanıklılığı ve

heterojen direnç fenotipini belirleme olasılığının daha yüksek olması nedeniyle oksasilin kullanılmalıdır. Difüzyon yöntemi ile *S. aureus* için metisilin direncini belirlemede sefoksitin ve oksasilin diskleri ile benzer sonuçlar alınmaktadır. Ancak, sefoksitin disk testinin okunması daha kolaydır ve bu nedenle tercih edilmektedir (4).

Stafilokoklarda disk difüzyon yöntemi ile metisilin direnci yukarıdaki öneriler doğrultusunda 30 µg sefoksitin ya da 1 µg oksasilin diski kullanılarak Mueller Hinton agar besiyerinde araştırılmalıdır. Normal atmosfer koşullarında inkübasyon ısı 33-35°C ve süresi sefoksitin için 16-18, oksasilin için ise 24 saat olmalıdır. 30 µg'lık sefoksitin diski kullanılarak yapılan difüzyon testi ile *S. aureus* için ≤21 mm'lik inhibisyon zonları dirençli, ≥22 mm'lik inhibisyon zonları duyarlı olarak kabul edilmektedirler. 11 µg'lık oksasilin diski kullanılarak yapılan disk difüzyon testi ile *S. aureus* için de ≤10 mm'lik zon çapları dirençli ≥13 mm'lik zon çapları duyarlı olarak kabul edilir. Eğer *S. aureus* için oksasilin disk difüzyon sonucu orta düzeyde duyarlı (11-12 mm) çıkarsa, sefoksitin disk, oksasilin dilüsyon ya da oksasilin agar tarama testleri yapılarak orta düzeyde duyarlı yerine bu testler ile alınan sonuç bildirilmelidir (4).

Stafilokoklarda metisilin direnci, sefoksitin ya da oksasilin kullanılarak sıvı veya agar dilüsyon yöntemleri ile de belirlenebilir. Sıvı dilüsyon testlerinde eğer sefoksitin test ediliyorsa katyon ayarlı Mueller Hinton broth, oksasilin test ediliyorsa %2 NaCl eklenmiş Mueller Hinton broth, agar dilüsyon testlerinde ise sefoksitin için Mueller Hinton agar, oksasilin içinde %2 NaCl eklenmiş Mueller Hinton agar kullanılır. Normal atmosfer koşullarında, 35°C ve süresi sefoksitin için 16-20, oksasilin için ise 24 saat olmalıdır. Dilüsyon testlerinde oksasilin için *S. aureus* MİK değerlerinin ≤2 mg/L bulunması durumunda bakterinin metisiline duyarlı, *S. aureus* MİK değerleri ≥4 mg/L, saptandığında ise metisiline dirençli olduğu kabul edilir. Bu sınır değerler sefoksitin için tüm stafilokoklarda sırasıyla ≤4 mg/L ve ≥8 mg/L'dir (4).

Günümüzde *mecA* ve bu genin kodladığı PBP2a'nın saptanması metisilin direncinin belirlenmesinde altın standartlardır ve *mecA* veya PBP2a'nın saptanması bakterinin metisiline dirençli olduğunu gösterir. *mecA* geni bulunmayan veya PBP2a sentezlemeyen kökenler, aynı zamanda oksasilin MİK değerleri ≤2 mg/L ise metisiline duyarlı olarak bildirilmelidirler. Ancak oksasilin için MİK değerleri ≥4 mg/L olup, *mecA* veya PBP2a negatif olan ve disk difüzyon

testinde sefoksitine de duyarlı bulunabilen bakteriler ise metisiline dirençli olarak bildirilmelidir. Bu borderline direncin nedeninin diğer PBP'lerin sentezlenme hız ve miktarlarındaki değişiklikler ya da beta laktamazların aşırı yapımı olduğu düşünülmektedir. Oksasilin MİK'inin 4-8 µg/ml olması halinde borderline direnç varlığından söz edilir. Sınırdaki dirençli oldukları için Borderline Rezistant *S. aureus* (BORSA) şeklinde adlandırılırlar (4, 25, 30).

Intermediate metisilin direnç gösteren *S. aureus* suşları ise beta laktamaz salgılamamalarına karşın PBP'leri beta laktam antibiyotiklere düşük afinite gösterirler ve Modifiye Rezistant *S. aureus* (MODSA) olarak bilinirler (4, 25, 30).

Tarama testlerinde moleküler yöntemler ve yenilikler

Son 10 yıl içinde, tarama örneklerinde hızlı MRSA tespiti için çok sayıda farklı moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Bunların büyük bir çoğunluğu, suşları *S. aureus* şeklinde tanımlayan, *mecA* ve diğer genleri tespit eden multipleks PCR primerlerine dayanmaktadır. İlk uygulanan PCR testleri, doğrudan klinik materyal üzerinde kullanıldıklarında yeterli duyarlılığı gösterememişlerdir. Önceleri bu yöntemler genellikle sadece saflaştırılmış stafilokok kültürleri için geçerli ise de son dönemlerde doğrudan MRSA'ların tespiti amaçlı uygulanabilmektedirler (38, 39, 40).

İzotermal Sinyal Çoğaltma Yöntemi

Bu test etken bakterilerin RNA'sının çoğaltılması temelinde koagülaz ve *mecA* genlerinin tespitini hedef almakta böylece *S. aureus*'u ve metisilin direncini eşzamanlı bir şekilde tanımlamaktadır. Bu yöntemin klasik PCR'la alınan sonuçlarla karşılaştırıldığında benzer duyarlılık ve özgüllük oranına sahip olduğu ancak örneklerin deneyden önce oksasilin içeren sıvı besiyerinde inkübasyonu gerekmektedir. Bu yöntem inkübasyondan sonra MRSA'ların 3-4 saat içerisinde tanınmasına olanak sağlar (41).

IDI MRSA PCR Testi

IDI-MRSA testinde, duyarlılık ve özgüllüğün daha yüksek olmasının sağlanabilmesi için *mecA* genini taşıyan SCCmec ve *S. aureus*'a özgül olan *orfX* genlerinin kesişimi amplifiye edilmektedir. Food and Drug Administration (FDA)'nın onayladığı ilk amplifikasyon testidir. Bu test real time PCR formatına dayanmaktadır ve tarama örneğinin alınmasından itibaren 2 saat içinde tanımlanabilir (42).

GeneXpert MRSA

FDA onaylı bu yöntemde ikinci kuşak real-time PCR teknolojisi kullanılmaktadır. Tüm test basamakları (örnek toplama, real-time PCR amplifikasyonu ve tespiti) tek bir kartuşun içerisinde gerçekleşmektedir. Böylece test 70 dakika gibi kısa bir süre içerisinde tamamlanmaktadır. Devamlı olarak örnek yüklenebilir ve tek bir örneğin bile çalışılabilir olması kullanım kolaylığı sağlamaktadır. Ayrıca özel bir PCR laboratuvarı gerektirmez. Bu yöntemde *spa* ve SCCmec olmak üzere iki gen bölgesi araştırılmaktadır. Bu gen bölgelerinden *spa*'nın saptanması *S. aureus* olarak yorumlanırken MRSA varlığı için her iki gen bölgesinin de saptanması gereklidir (42).

Kan Kültüründen Doğrudan MRSA Tespiti

Multipleks bir PCR yöntemi olan bu testte strip üzerinde DNA bantlarının görünmesi temeline dayalı olup kan kültürlerinden identifikasyonu beklemeden 17 bakteri türünü, bu arada metisilin (*mecA*) ve vankomisin (van A, B, C1 VE C2/C3) direnç genlerini belirleyen bir testtir. Ekstraksiyon, amplifikasyon ve revers hibridizasyon aşamalarından sonra strip üzerinde belirlenen bantların kontrol bantları ile karşılaştırılması temeline dayanır. Kan kültürünün pozitif sinyal vermesinden 4-4.5 saat sonra sonuç veren sistem amplifikasyon sonrasında revers hibridizasyon işlemi manuel yapılabildiği gibi, Auto-lipa cihazı kullanılarak da otomatize bir şekilde çalışabilmektedir (43).

GenoType Staphylococcus

PVL (Panton-valentine Leukosidin) ve *mecA* geninin belirlenmesi esasına dayanır. MRSA'nın yanında 5 KNS identifikasyonu yapar. Kültürden sonra 4 saat içerisinde sonuç verir (42).

GenoType MRSA

PVL ve *mec* genini belirler. Özellikle *S. aureus* ve *S. epidermidis*' i identifiye eder. Kùltürden çalışılmalıdır (42).

GenoType MRSA Direkt

Kùltüre gereksinim duyulmadan direkt örnekten çalışılır MRSA'lardaki SCCmec tip 1-5 gen bölgesi hedeflenerek 4 saat içersinde tanımlama yapılır (42).

GenoQuick MRSA Ver 2

Bu test serinin en son versiyonu olup örnekten direkt MRSA'a ait DNA ekstraksiyonu sonrası multipleks amplifikasyon esasına dayanır. Daha sonra revers hibridizasyon sonucu oluşan strip bantlarına göre MRSA'lar tespit edilir (42).

Hastane infeksiyonu etkeni olarak MRSA'nın önemi

MRSA'nın neden olduğu hastane salgınları birçok kuruluş için önemli sorunlar yaratmaktadır. Salgınlarda onlarca hasta ve sağlık çalışanı etkilenmektedir. Küçük salgınların kontrol altına alınması üç ay kadar sürerken, genellikle üçüncü basamak sağlık kuruluşlarında ortaya çıkan daha büyük boyutlu salgınların yıllarca sürdüğu bildirilmektedir. Önemli bir boyut da, bir hastanedeki salgının hasta sevk ve nakilleri nedeniyle bölgedeki diğer hastaneleri etkilemesidir. Hastanede yatarken MRSA kolonizasyonu gelişen kişilerde %30-60 oranında MRSA infeksiyonu ortaya çıktığı bilinmektedir (44).

Son 20 yıl içinde MRSA, birçok ÷lkede hastane infeksiyonlarının kontrolünde önemli bir sorun olmakla birlikte sıklığı, ÷lkelere ve merkezlere göre değişiklik göstermektedir. Toplumda ve hastanelerde sık gör÷len patojenleri, direnç paternlerini ve değişik coğrafi bölgelerdeki dağılımını araştırmak amacıyla oluşturulan SENTRY projesi, MRSA sorununun tüm dünyadaki boyutunu daha iyi ortaya koymaktadır. 1997 yılında başlatılan çalışma, 1999 yılında ABD, Kanada, Latin Amerika, Avrupa ve Batı Pasifik olmak üzere beş bölgede 21 ÷lke ve 75 merkezde yürüt÷lmüştür. İki yıllık bir süreyi kapsayan bu çok merkezli çalışmada *S. aureus*' un deri/yumuşak doku, alt solunum yolu infeksiyonları ve bakteremilerde en sık gör÷len etken olduğu saptanmıştır (45, 46, 47).

Ülkemizde de *S. aureus* infeksiyonları, hastane infeksiyonları içinde ilk sıralarda yer almaktadır. Bazı merkezlerde ikinci, dördüncü sıralarda saptanmasına karşın bu merkezlerde, *S. aureus* infeksiyonlarının yıllar içinde daha üst sıralara taşındığı izlenmektedir. Ayrıca, hastane kökenli *S. aureus* suşlarında metisilin direncinin %50'yi geçtiği ve direnç oranlarının da yıllar içinde arttığı ortaya çıkmaktadır (48, 49, 50, 51).

Başta YBÜ (yoğun bakım üniteleri) olmak üzere hastanelerin bazı bölümleri MRSA infeksiyonları açısından daha yüksek risk oluşturmaktadır. Kolonizasyon ve infeksiyona çok yatkın olan kritik durumdaki hastalar, çeşitli girişimlere, yoğun antibiyotik baskısına, sağlık çalışanlarının sık ve yakın temasına maruz kaldıkları için hem endojen floranın hem de ortam bakterilerinin tehdidi altındadır. Bu koşullar dirençli bakteri suşlarının seçilmesine yol açarken, MRSA infeksiyon ve kolonizasyonunu da ön plana çıkarmaktadır (44).

Sağlık kuruluşlarının yanı sıra MRSA'nın toplumda da salgınlara yol açtığı ve giderek prevalansının arttığı bildirilmektedir. Sağlık kuruluşları ile doğrudan veya dolaylı olarak teması kesinlikle olmayan ve MRSA izole edilen kişiler toplum kökenli rezervuar olarak kabul edilmektedir. Ancak toplum kökenli bir MRSA infeksiyonu saptandığında, genellikle olgunun bir süre önce hastanede yattığı veya hastanede yatan biri ile yakın teması olduğu ya da uzun süre antibiyotik tedavisi alması gibi diğer risk faktörlerinden biri bulunduğu tespit edilmektedir. Almanya ulusal referans laboratuvarında 1998-2000 yılları arasında izole edilen 9871 MRSA suşunun %6'sının hastanede yatmayan, başka nedenlerle muayenehaneye başvuran kişilere ait olduğu belirlenmiştir. Bu olgular incelendiğinde, tümünün kültür alınmadan önceki altı ay içinde hastaneye yattığı veya hastane ile teması olduğu ortaya çıkmıştır (52). Detroit'te ise 1980-1981 yıllarında ortaya çıkan toplum kökenli MRSA salgını önce hastane salgınları için yeni bir kaynak olarak yorumlanmıştır. Ancak salgından etkilenenlerin 2/3'ünün intravenöz (IV) uyuşturucu kullananlar olduğu tespit edilmiştir (53).

MRSA infeksiyonlarının kontrolü

MRSA kontrol programları kolonizasyonun önlenmesi ve etkenin hastalar arası taşınmasının engellenmesine odaklanmaktadır. Böyle bir program el yıkama, izolasyon önlemlerinin uygulanması, iletişim, taşıyıcıların tedavisi, eğitim,

sürveyans, kontrollü antibiyotik kullanımı gibi temel öğeler üzerinde yapılandırılmaktadır (54).

MRSA ile kolonize kişilere antibiyotik tedavisi uygulanması ile kaynağın küçültülmesi mümkündür. Ancak dekolonizasyon tedavisi rutin olarak önerilmemektedir. Sağlık çalışanları için, salgın ile ilişkisi olduğunun gösterildiği durumlarda veya tedavi gerektiren bir MRSA infeksiyonu varlığında antibiyotik tedavisi uygulanmalı ve iş kısıtlaması açısından değerlendirilmelidir. Yara yerinde MRSA kolonizasyonu veya infeksiyonu olan hastalar ise mutlaka temas izolasyonuna alınmalıdır. Temas izolasyonunun sonlandırılması kontrol kültürlerinin sonucuna bağlıdır. Hasta, antibiyotik tedavisi tamamlandıktan üç gün sonra ve 24 saat arayla alınan infeksiyon alanı ve burun kültürlerinde MRSA üremediği kesin olarak tespit edilince temas izolasyonundan çıkarılmalıdır (54).

MRSA infeksiyonlarının önlenmesinde sürveyansın önemi

MRSA için kültür ve duyarlılık verileri sürekli olarak izlenmelidir. İzole edilen suşların kökenine (toplum kökenli, başka sağlık kuruluşu vb.) ait bilgilerin toplanması oldukça yararlıdır. Bu veriler MRSA'nın hastane içi yayılımının izlenmesini ve bir salgının erken fark edilmesini sağlamaktadır. Gereğinde, bir epidemiy varlığında ek sürveyans yöntemleri kullanılarak tarama amacıyla alınan kültürlerinin duyarlılığı ve negatif prediktif değeri en yüksek düzeye (%100'e yakın) çıkarılmalıdır (3).

MRSA infeksiyonlarının ekonomik yükü

MRSA infeksiyonlarının tedavisi, kullanılan antibiyotiklerin maliyetinin yanı sıra hastanede uzun süre yatış gerektirmesi ve iş gücü kaybı nedeniyle ciddi mali yük oluşturmaktadır (44).

ABD'de bir üniversite hastanesinin yenidoğan yoğun bakım ünitesi (YBÜ)'de 10.5 ay süren ve 18 kolonize, dört infekte olguya yol açan salgının tahmini maliyeti 48.617-68.637 dolar olarak belirlenmiştir. Aynı hastanenin bir başka yenidoğan YBÜ'nde ise 75 MRSA bakteriyemisine neden olan, 14 olgunun kaybedildiği ve 51 ay süren salgının tahmini maliyeti 1.306.600 dolar olarak bildirilmektedir (55). Fransa'da MRSA infeksiyonuna bağlı ortalama maliyet 9275 dolar (1400-16720 dolar), ortanca maliyet 5885 dolar bulunurken, kontrol programının her hasta için maliyetinin 340-1480 dolar olduğu saptanmıştır (56).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Araştırmada Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Bakteriyoloji Laboratuvarı stoklarından seçilen 100 *Staphylococcus aureus* suşu kullanılmıştır. Suşların canlandırılması için stok besiyerlerinden her suş için kanlı agar besiyerlerine ekim yapılmış olup, 35⁰C'da 24 saat inkübe edilmiştir. Üreme olmayan plaklar için inkübasyon süresi 24 saat daha uzatılmıştır.

Disk difüzyon testi

Suşların oksasiline ve sefoksitine duyarlılıklarını belirlemek için 1µg oksasilin (Becton Dickinson, USA) ve 30 µg sefoksitin (Becton Dickinson, USA) içeren diskler kullanılmıştır. Her bir suş için 0.5 Mc Farland standardına uygun bakteri süspansiyonları hazırlanmış ve NaCl içermeyen Mueller Hinton plak besiyerlerine (Becton Dickinson, USA) ekim yapılmıştır. Plaklar 35⁰C'de 24 saat (sefoksitin için 18 saat) inkübe edildikten sonra zon çapları ölçülerek suşların duyarlılıkları CLSI önerileri doğrultusunda belirlenmiştir (4).

Oksasilin E-Test yöntemi

Oksasilin MIK değerlerinin belirlenmesi amacı ile 0.5 Mc Farland standardına uygun bakteri süspansiyonu elde edildikten sonra steril eküvyonlar kullanılarak NaCl içermeyen Mueller Hinton agara üç farklı açıda homojen bir şekilde ekim yapılmıştır. Plaklar 35⁰C'lik etüvde 15-20 dakika kurutulduktan sonra antibiyotik emdirilmiş E-test şeritleri (AB Biodisk, İsveç) besiyerine yerleştirilmiştir. Besiyerleri 35⁰C'de 24 saat inkübe edildikten sonra, inhibisyon zonunun E-test şerit kenarını kestiği noktadaki antimikrobiyal yoğunluk Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MIK) olarak kaydedilmiştir. MIK değeri 2 µg/ml ve altında olan suşlar penisiline duyarlı, MIK değeri 4 µg/ml ve üstünde olan suşlar ise oksasiline dirençli olarak değerlendirilmiştir.

Oksasilin agar tarama testi

Oksasilin agar tarama testi için %4 NaCl ve 6 µg/ml oksasilin içeren agar (Becton Dickinson, USA) plakları kullanılmıştır. Her bir suş için 0.5 Mc Farland standardına uygun bakteri süspansiyonları hazırlanmış ve birer mikrolitre besiyerlerine inoküle edilmiştir. Plaklar 35⁰C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası arkadan gelen ışık önünde plaklar üreme yönünden incelenmiştir. Bir veya birden fazla koloni görülen plaklardaki suşlar oksasiline dirençli olarak değerlendirilmiştir.

Lateks aglutinasyon testi

S. aureus suşlarında PBP2a varlığını saptamak amacı ile lateks aglutinasyon testi (Oxoid, UK) üretici firma önerileri doğrultusunda çalışılmıştır. Katı besiyerinde üretilmiş bakterilerden mikrosantrifüj tüpüne birkaç koloni alınmış ve dört damla 0.1 mol/L NaOH (reagent I) ilave edilerek vorteks yardımı ile homojenize edilmiştir. Solusyon üç dakika 95⁰C'da ısıtıldıktan sonra bir damla 0.5 mol/L KH₂PO₄ (reagent II) eklenmiştir. 1500 G' de 5 dakika santrifüj edilerek her suş için testte kullanılacak olan ekstraksiyon ürünü elde edilmiştir. Lateks aglutinasyon kartları üzerindeki test ve kontrol daireleri içine test lateks ve kontrol lateks reagentlerinden birer damla, süpernatanttan 50 µL ilave edilerek aglutinasyon varlığı araştırılmıştır. Test lateks kartında aglutinasyon var kontrol lateks kartında aglutinasyon yok ise PBP2a pozitif, test ve kontrol lateks kartlarının her ikisinde de aglutinasyon yok ise PBP2a negatif kabul edilmiştir.

MecA geninin saptanması

Genotype MRSA (Hain Lifescience, Germany) testi metisilin dirençli *S. aureus* kökenlerinin tanımlanmasını sağlayan DNA strip teknolojisi temeline dayanan bir testtir. Test üç aşamadan oluşmaktadır:

1. Taze üremiş kültür materyelinden DNA izolasyonu
2. Biotinle işaretlenmiş primerler kullanarak yapılan amplifikasyon
3. Ters hibridizasyon
 - amplifikasyon ürünlerinin kimyasal denatürasyonu
 - tek iplikçikli, biyotinle işaretlenmiş ampikonların membrana bağlanmış problarla hibridizasyonu ve yıkama
 - streptavidin/alkalen fosfatazdan oluşan konjüгатın eklenmesi

- alkalen fosfatazın substratının eklenerek boyanma reaksiyonun oluşturulması

DNA izolasyonu

Katı besiyerinde üretilmiş kültürlerden beş adet koloni alınarak 150 µl distile su ile süspanse edilmiştir. Elde edilen karışım 95°C'da 20 dakika inkübe edilmiştir. Sonikatörde 15 dakika bekletilip maksimum hızda 5 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatanttan 5 µl alınarak PCR için kullanılmıştır.

Amplifikasyon

Her bir örnek için 45 µl amplifikasyon karışımı hazırlanmıştır.

PCR karışımı

35 µl PNM miksi

5 µl 10 x buffer

5 µl MgCl₂

0.5 µl Taq DNA Polimeraz

45 µl PCR miksi ve 5 µl DNA solusyonu 95°C da 5 dakika 1 siklus, 95°C da 20 saniye 22 siklus, 60°C da 30 saniye 22 siklus olmak üzere PCR cihazında amplifiye edilmiştir.

Hibridizasyon

1. Elde edilen PCR ürününden 20 µl ve 20 µl denatürasyon sıvısından hibridizasyon bloğunda kuyucukların içinde karıştırıldıktan sonra stripler bu solusyon içerisine yerleştirilmiştir.

2. Önceden ısıtılmış hibridizasyon sıvısından 1000 µl kuyucuklara pipetlenmiştir ve 45°C da 30 dakika hibridizasyon blok cihazında inkübe edilmiştir.

3. Pastör pipeti ile hibridizasyon sıvısı geri aspire edildikten sonra kuyucukların içine 1000 µl stringent wash solusyonundan ilave edilmiş ve 45°C da 15 dakika inkübe edilmiştir.

4. Stringent wash solusyonu aspire edildikten sonra şeritler 1 ml rinse solusyonu ile 25°C da 1 dakika inkübe edildikten sonra rinse sıvısı boşaltılmıştır.

5. Şeritler 1 ml dilüe konjüгат her kuyucuk için 1000 µl ve 1/100 dilusyon olacak şekilde CON C ve CON D ile 30 dakika inkübe edilmiştir.

6. Şeritler 1000 µl Rinse solusyonuyla iki kez ve arkadan 1000 µl distile su ile yıkandıktan sonra sıvılar tamamen boşaltılmıştır.

7. Şeritler 1000 µl dilüe substrat içinde 25 dakika oda ısısında inkube edilmiştir.

8. Reaksiyonun durdurulması için stripler 1000 µl distile su ile yıkanmıştır ve penset yardımı ile şeritler emici kağıt üzerine alınmıştır.

Sonuçların yorumlanması

Hibridizasyon işleminden sonra test şeritlerinde oluşan CC (konjugat kontrolü) ve UC (universal kontrolü) bantları değerlendirme kartlarında bulunan CC ve UC çizgileriyle hizalanarak striplerde oluşan diğer bantlar değerlendirilmiştir.

Strip üzerinde *mecA* genine ait prob bölgesinde bant oluşumu olumlu, bu bölgede bant oluşturmayan örnekler olumsuz olarak değerlendirilmiştir.

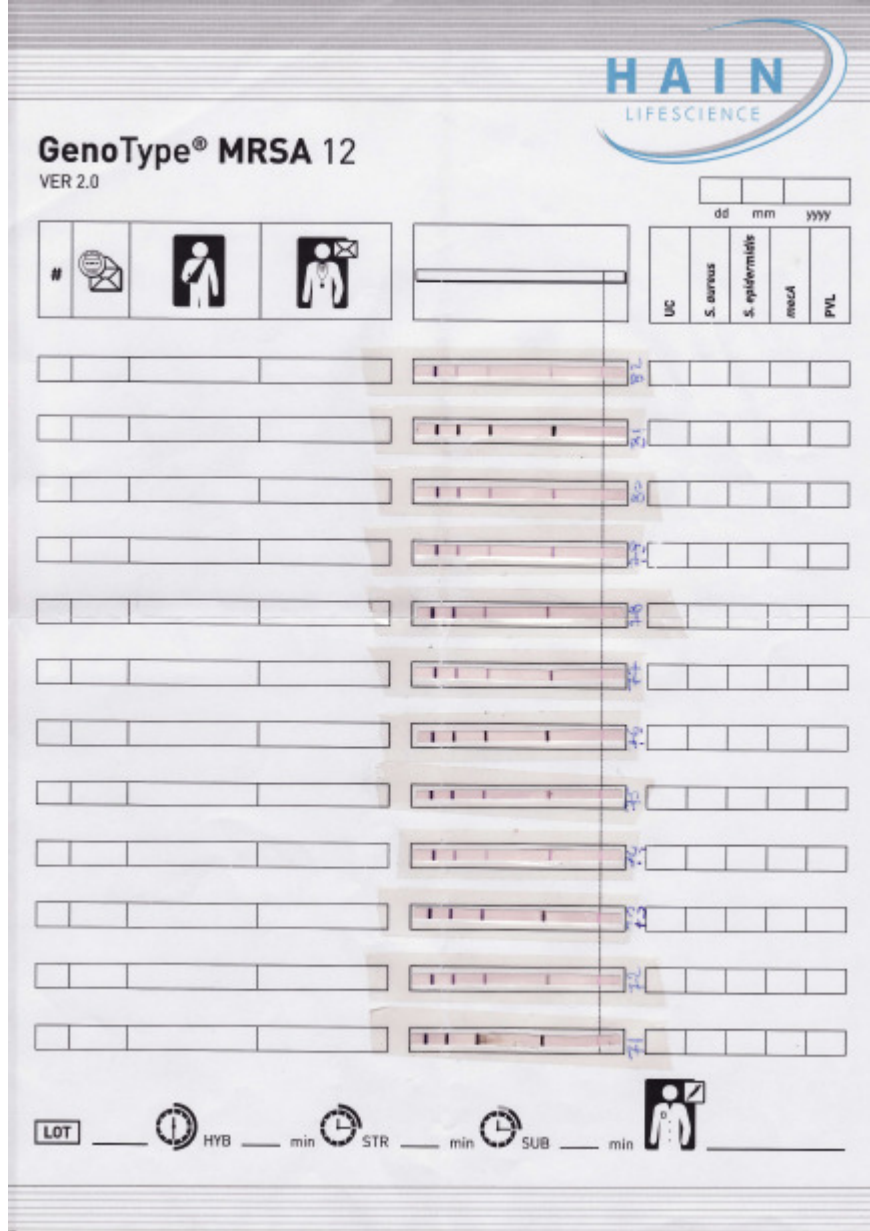
CC: Bu zonda oluşan bant konjugat bağlanması ve substrat reaksiyonun etkinliğini göstermektedir.

UC: Bu prop test edilmiş tüm bakterilerde görülen oldukça iyi korunmuş DNA bölgesine yöneliktir. Bu bant bakteriyel DNA'nın bulunduğunu ve DNA izolasyonu ile amplifikasyonun doğru olarak yapıldığını gösterir.

Kalite kontrol çalışmaları

Duyarlılık testlerinde ATCC 25923 ve ATCC 43300 kalite kontrol suşları kullanılmıştır.

Şekil 1. Genotype MRSA stribi üzerinde bant oluşumu



İstatistiksel değerlendirme

Elde edilen veriler bilgisayar ortamında SPSS 15.0 istatistik paket programında değerlendirilmiş, Genotype MRSA yöntemi altın standart kabul edilerek fenotipik yöntemlerin özgüllük ve duyarlılıkları ilgili formüller kullanılarak hesaplanmıştır.

BULGULAR

Çalışmada laboratuvar stoklarından seçilen 100 *S. aureus* suşu kullanılmıştır. Tüm suşlar disk difüzyon, oksasilin E-test yöntemi, oksasilin agar tarama, MRSA lateks aglütinasyon ve Genotype MRSA testleri ile çalışılmıştır. Kullanılan yöntemlerle elde edilen duyarlılık ve direnç oranları, lateks aglütinasyon ve Genotype MRSA sonuçları, *mecA* geni varlığına göre yöntemlerin MRSA ve MSSA olarak belirledikleri suş sayıları, yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri tablolarda (Tablo 2-6) verilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen 100 *S. aureus* suşunun 90'ının *mecA* geni taşıdığı, 10 suşun ise *mecA* olumsuz olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda fenotipik yöntemlerin tümünün özgüllüğü %100 olarak değerlendirilirken, duyarlılığı en yüksek fenotipik yöntemin PBP2a'yı saptayan lateks aglütinasyon testi olduğu gösterilmiştir (%100). Fenotipik testlerin Genotype MRSA ile uyumunun %86.6-100 arasında olduğu saptanmıştır.

Genotype MRSA ile *mecA* pozitif 90 suşun 78'i disk difüzyon yöntemi ile oksasilin ve sefokisitine dirençli bulunmuştur. *MecA* geni olumsuz 10 *S. aureus* suşunun tamamı ise oksasiline benzer şekilde sefoksitin disk difüzyon ile de doğru tanımlanmıştır. Ancak *mecA* geni taşımalarına rağmen sefoksitin disk yöntemi ile 12, oksasilin disk yöntemi ile 9 suş MSSA (metisiline duyarlı *S. aureus*) olarak tanımlanmıştır. Oksasilin disk difüzyon testi ile MSSA olarak saptanan 9 suşun 5'i, sefoksitin disk difüzyon yöntemi ile MSSA olarak saptanan 12 suşun 8'i agar tarama testi ile MRSA olarak tanımlanmışlardır. Disk difüzyon yöntemi ile oksasiline dirençli bulunan 3 suş sefoksitine duyarlı olarak değerlendirilmiştir. Oksasilin E-test yöntemi ile bu suşların ikisi dirençli biri duyarlı bulunmuştur. Agar tarama testi, lateks aglütinasyon ve Genotype MRSA yöntemleri ile bu suşların üçü'de MRSA olarak değerlendirilmiştir.

PCR ile *mecA* pozitif bulunan 90 suşun 80'ni E-test yöntemi ile oksasiline dirençli bulunurken, 10 suş *mecA* geni olumlu olduğu halde Oksasilin E-test ile duyarlı bulunmuştur. Oksasilin MİK aralıkları *mecA* olumsuz ve olumlu suşlarda sırasıyla 0.016-0.75 µg/ml ve 0.75-250 µg/ml arasında saptanmıştır (Tablo 3).

MecA geni olumlu 90 örnekten 86'sı oksasilin agar tarama testi ile, 90 suşun 90'nı da lateks aglutinasyon testi ile MRSA olarak değerlendirilmiştir. Her iki yöntemle de *mecA* geni olumsuz suşların tümü MSSA olarak tanımlanırken, oksasilin agar tarama testi ile dört suş *mecA* taşımalarına rağmen MSSA olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 2. Disk difüzyon ve agar tarama testleri sonuçları

Antibiyotik	Dirençli (n)	Duyarlı (n)	TOPLAM (n)
Oksasilin	81	19	100
Sefoksitin	78	22	100
Agar tarama (6µg/ml oksasilin)	86	14	100

Tablo 3. Oksasilin E-test sonuçları

Oksasilin MİK (µg/ml)	Sayı
256	80
128	0
64	0
32	0
16	0
8	0
4	0
2	0
1	0
0.75	2
0.5	1
0.38	1
0.25	4
0.19	1
0.125	3
0.094	2
0.064	0
0.047	4
0.032	1
0.016	1
TOPLAM	100

Tablo 4. Latex Aglutinasyon ve Genotype MRSA test sonuçları

Yöntem	Pozitif (n)	Negatif (n)	TOPLAM (n)
PBP2a	90	10	100
<i>mecA</i>	90	10	100

Tablo 5. *mecA* geni varlığına göre fenotipik yöntemlerin belirledikleri suş sayıları

Kullanılan Yöntem	<i>mecA</i> +		<i>mecA</i> -	
	MRSA (n)	MSSA (n)	MRSA (n)	MSSA (n)
Oksasilin disk difüzyon	81	9	0	10
Sefoksitin disk difüzyon	78	12	0	10
Oksasilin E-test	80	10	0	10
Oksasilin agar testi	86	4	0	10
Lateks aglutinasyon	90	0	0	10

Tablo 6. Genotype MRSA testine göre fenotipik yöntemlerinin duyarlılık ve özgüllükleri

Yöntemler	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	Uyumluluk (%)
Oksasilin disk difüzyon	91.0	100.0	91
Sefoksitin disk difüzyon	86.6	100.0	88
Oksasilin E-test	88.8	100.0	90
Oksasilin agar testi	95.6	100.0	96
Lateks aglutinasyon	100.0	100.0	100

TARTIŞMA

MRSA infeksiyonlarının erken tanısı ve duyarlılık test sonuçlarının doğru belirlenmesi tedavi ve kontrol önlemlerinin hızlı bir şekilde başlamasına olanak sağlamaktadır (57). Direncin belirlenmesinde yalancı duyarlı sonuçlar tedavi yetersizliğine ve MRSA suşlarının yayılmasına, yalancı dirençli sonuçlar ise glikopeptitlerin aşırı kullanımına ve gereksiz izolasyon önlemleri nedeniyle ekonomik kayıplara yol açmaktadır (57, 58).

Günümüzde MRSA tüm dünyada yaygın olarak görülmekte olup, prevalansı bölgeler arasında farklılıklar göstermektedir. 1997-1999 yıllara arasında 17 ülkenin katılımı ile gerçekleştirilen SENTRY çalışmasında Türkiye için MRSA oranı % 37.5 olarak bildirilirken, Avustralya'da %23.6, Avrupa'da %26.3, Amerika ve Güney Amerika %34.2-34.9, Güney Afrika'da %42.9, Japonya'da %71.6'ya varan direnç oranları bildirilmiştir (57).

Akdeniz ülkelerinin (ARMed) antibiyotik direncini izlemeyi hedefleyen başka bir sürveyans çalışmasında ise, ülkemizdeki MRSA suşlarının oranı 2003, 2004, 2005 yıllara için sırasıyla % 43, % 40, ve % 35 olarak rapor edilmiştir. Aynı çalışmada, izolatların metisilin dışında, siprofloksasin, tetrasiklin, gentamisin ve eritromisin direnç oranları da incelenmiş olup en yüksek çoğul dirençlilik oranı (% 73) Türkiye için bildirilmiştir (58).

Ülkemizin çeşitli merkezlerinde yapılan çalışmalarda MRSA oranları %25-61, yoğun bakım ve yanık üniteleri için %56-92 gibi yüksek direnç oranları rapor edilmiştir (59, 60).

S. aureus'un metisilin direnç mekanizmasının temeli genomunda taşıdığı *mecA* geni kontrolündeki PBP2'yi, PBP2a'ya dönüştüren gen ekspresyonunu artırarak etkenin hedefe ilgisinin belirgin bir şekilde kaybolmasına neden olmasıdır. Homojen dirençte, hücrelerin hepsi yüksek konsantrasyondaki metisilin varlığında üreyebilme özelliği gösterirken, heterojen dirençte bakteri topluluğunda bulunan tüm hücreler *mecA* genini taşımalarına rağmen topluluğun sadece belirli bir kısmında direnç açığa çıkar. Bu nedenle değişik kültür koşullarında metisilin

direncinin fenotipik olarak ortaya konulmasının regülasyonu oldukça karışıktır (61).

Günümüzde MRSA'ların saptanmasında CLSI tarafından önerilen fenotipik yöntemler oksasilin/sefoksitin disk difüzyon ve MİK yöntemleri, %6 oranında oksasilin içeren agar tarama ve PBP2a saptamaya yönelik lateks aglütinasyon testleridir (4).

Çalışmamızda 35⁰C'de sefoksitin için 18 saat, oksasilin disk difüzyon ve oksasilin agar tarama testleri için 24 saat inkübasyon sonrası yöntemlerin özgüllüğü %100 olarak saptanırken, agar tarama testinin duyarlılığı %96.5, oksasilin disk difüzyon testinin duyarlılığı %91, sefoksitin disk difüzyon yönteminin duyarlılığı ise %86.6 olarak saptanmıştır.

Cauwellier ve ark.'nın (62), 2004 yılında yaptıkları bir çalışmada oksasilin disk difüzyon ve agar tarama testleri için %83.5 ve %91.7 duyarlılık, her iki test için %100 oranında özgüllük bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, 30⁰C'de sefoksitin disk yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü %100, 35⁰C'de ise testin duyarlılığı %99 olarak bildirilmiştir. Benzer olarak, 2008 yılında Finlandiya'da Kerttula ve ark. (63), MRSA'ların saptanmasında çeşitli fenotipik ve genotipik yöntemleri değerlendiren çalışmalarında sefoksitin disk difüzyon yönteminin oksasiline göre daha üstün olduğunu saptamışlardır.

Kore'de 1208 izolatla yapılan bir çalışmada, sadece *mecA* negatif 15 suşun oksasiline dirençli sefoksitine duyarlı, *mecA* taşıyan iki izolatın ise oksasiline duyarlı sefoksitine dirençli oldukları saptanmıştır. İki yöntem arasındaki uyumsuz sonuçların %1.9 oranını geçmediği ve sefoksitin disk difüzyon testinin direnci saptamada daha iyi sonuç verdiği rapor edilmiştir (64).

Ülkemiz'de Murat Telli ve ark. (65), *mecA* pozitif ve negatif *S. aureus* kökenlerini belirlemede, oksasilin disk difüzyon, sefoksitin disk difüzyon ve oksasilin agar tarama testlerinin duyarlılık ve özgüllüklerini sırasıyla, %98.8-99.1, %98.3-99.1, %98.8-98.3 olarak bulmuşlar ve sefoksitin disk difüzyon yönteminin rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında tercih edilebilecek bir yöntem olabileceğini bildirmişlerdir.

Bu çalışmada sefoksitin disk difüzyon yönteminin özgüllüğü literatürde bildirilen sonuçlar ile uyumlu olmakla birlikte duyarlılığı daha düşük bulunmuştur (62, 63, 64). Bu nedenle direncin doğru yorumlanması için laboratuvarımızda rutin

olarak oksasilin disk difüzyon testinin kullanılmasının, ek bir yöntem ihtiyacı duyulduğunda agar tarama testinin yararlı olacağı düşünülmüştür.

CLSI 2008 dokümanlarında, KNS'lerde MİK testlerine kıyasla sefoksitin disk difüzyon testinin özgüllüğünün daha yüksek olmasına karşın, *S. aureus*'ta duyarlılık ve özgüllük yönünden eşdeğer olduğunu ve *mecA* genine bağlı direnci belirlemede sefoksitin MİK testinin oksasilin MİK testine alternatif olarak kullanılabileceği bildirilmektedir (66). Bu çalışmada her iki yöntemin özgüllüğü %100 olup, oksasilin E-test yönteminin duyarlılığı %88.8, sefoksitin disk difüzyon yönteminin duyarlılığı ise %86.6 olarak saptanmıştır. Skov R. ve ark. (67) tarafından 2006 yılında yapılan bir çalışmada, sefoksitin disk difüzyon ve sefoksitin MİK testlerinin *mecA* taşıyan suşlarda direncin varlığını öngörmede diğer fenotipik yöntemlere göre daha üstün oldukları vurgulanmıştır. Çalışmamızda sefoksitin MİK değerleri belirlenmemiş olup, duyarlılığının daha yüksek olması nedeni ile metisilin direncinin araştırılmasında oksasilin disk difüzyon testinin oksasilin E-test yönteminden daha iyi sonuç verdiği saptanmıştır. Elde edilen sonuçlar, laboratuvarımızda sefoksitin disk difüzyon testinin yanı sıra direncin saptanmasında MİK yöntemlerinin de kullanılabilirliğine ilişkin ileri çalışmaların yapılmasının gerekliliğini göstermektedir.

PCR ve PBP2a saptayan lateks aglutinasyon testleri inkübasyon ısı, süresi ve tuz konsantrasyonu gibi parametrelerden etkilenmemeleri nedeni ile klasik duyarlılık yöntemlerine göre birçok avantaja sahiptirler (68). Bu nedenle günümüzde, oksasilin direncinin saptanmasında *mecA* veya *mecA* geninin kodladığı PBP2a'nın saptanması, direncin belirlenmesi için en kesin yöntem olarak gösterilmekte ve ağır infeksiyonlarda disk difüzyon testi sonuçlarının doğrulanması için kullanılması önerilmektedir (66, 69). Bu çalışmada MRSA lateks aglutinasyon testinin duyarlılığı ve özgüllüğü %100 olarak belirlenmiş olup, literatürde bildiren sonuçlar ile uyumlu (duyarlılık %93.5 - %100, özgüllük %96.5- %100) bulunmuştur.

Sonuç olarak çalışmamızda, *mecA* pozitif *S.aureus* kökenlerini belirlemede, çalışılan fenotipik yöntemlerin özgüllüğü %100 olarak saptanırken, oksasilin disk difüzyon yönteminin duyarlılığı sefoksitin disk difüzyon yönteminden daha yüksek, MRSA lateks aglutinasyon testinin duyarlılığı ve özgüllüğü ise en yüksek bulunmuştur. Disk difüzyon ve E-test gibi konvansiyonel yöntemler daha ucuz ve tekrarlanabilirliği kolay testler olmalarına rağmen, çevresel faktörlerden

etkilenmeleri nedeni ile oksasilin direncinin saptanmasında lateks aglütinasyon ve Genotype MRSA'ya göre daha düşük duyarlılık ve özgüllüktedirler. Bununla birlikte, PCR ve PBP2a saptayan testlerin, hızlı sonuç vermelerine ve mükemmel doğrulama testleri olmalarına rağmen, pahalı olmaları rutin kullanımlarını sınırlandırmaktadır. Bu nedenle, laboratuvarımızda MRSA'ların saptanmasında rutin olarak oksasilin disk difüzyon testinin kullanılmasının, doğrulama gereken durumlarda ise lateks aglütinasyon testine başvurulmasının, rapor edilen sonuçların güvenilirliği açısından yararlı olacağı düşünülmüştür.

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarının doğru olarak belirlenmesi, bu direncin heterojen olması nedeniyle her zaman mümkün olmamaktadır. Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen 100 *S. aureus* suşunda metisilin direncinin belirlenmesinde sefoksitin ve oksasilin disk difüzyon, oksasilin E-test, oksasilin agar tarama ve MRSA lateks aglütinasyon testlerinin duyarlılık ve özgüllükleri araştırılmıştır. Altın standart yöntem olan PCR (Genotype MRSA) ile birlikte değerlendirildiğinde, kullanılan tüm yöntemlerin özgüllüğü %100 olarak saptanırken, sefoksitin disk difüzyon yönteminin duyarlılığı diğer fenotipik yöntemlere göre daha düşük bulunmuştur. Lateks aglütinasyon testi ise *mecA* geni taşıyan tüm suşları MRSA olarak tanımlamıştır.

Sonuç olarak, laboratuvarımızda rutin olarak ucuz ve uygulanabilirliği kolay bir yöntem olan oksasilin disk difüzyon testinin kullanılmasına, tedaviye yanıt alınamayan olgularda MRSA lateks aglütinasyon testi ile doğrulama yapılması gerektiği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Waldvogel FA. *Staphylococcus aureus*. In: Mandell G, Bennet JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th edition. New York, Churchill Livingstone; 2000: 2069-92.
2. Kurutepe S, Sürücüoğlu S, Gazi H, Teker A, Özbakkaloğlu B. Metisiline dirençli ve duyarlı *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotiklere direnç oranları. İnfeksiyon Dergisi. 2007; 21: 187-191.
3. Tünger A. *Staphylococcus aureus*: mikrobiyoloji, patogenez ve epidemiyoloji. Önemli ve sorunlu gram-pozitif bakteri infeksiyonları 2004; 9-22.
4. Clinical and Laboratory Standard Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Supplement, CLSI Document M100- S16, Wayne, PA (2006).
5. Derek F. J. Brown, David I. Edwards, Peter M. Hawkey, Donald Morrison, Geoffrey L. Ridgway, Kevin J. Towner, Michael W. D. Wren. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). J Antimicrob Chemotherapy. 2005; 56: 1000–18.
6. Forbes BA, SahmDF, Weissfeld AS. Staphylococcus, Micrococcus and similar organisms. In Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 10th edn.1998; 607–618.
7. Moreillon P, Que Y, Glauser MP. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock). Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases 6th edition Volume 2, Elsevier Inc. 2005; 2321-52.

8. Saravolatz LD, Markowitz N, Pohlod DJ, Arking L, Fisher E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Epidemiologic observations during a community outbreak. Ann Intern Med.1982; 96: 11-16.
9. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC,Winn WC. Staphylococci and related organisms. In: KonemannEW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC(Eds). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Philadelphia, Lippincott, 1997: 539-76.
10. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev. 2000;13: 16-34.
11. Çetin ET, Ang O. Staphylococci resistant to methicillin. Br Med J. 1962; 2: 51.
12. Dufour P, Gillet Y, Bes M. Community- acquired *Staphylococcus aureus* infections in France: Emergence of a single clon that produces Penton- Valentine Leucocidin. Clin Infect Dis. 2002; 35: 819-824.
13. Cengiz AT. Staphylococcus. Ustaçelebi Ş (editor). *Staphylococcus aureus*. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara Güneş Kitabevi Ltd Şti,1999; 339-348.
14. Murray P, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover RH. Identification of *Staphylococcus aureus*. Manual of Clinical Microbiology. 8th edition. Washington, D.C., ASM Press. 2003; 391-397.
15. Kluytmans J. A. J. W, Wertheim H. F. L. Nasal carriage of *S. aureus* and prevention of nosocomial infections. Infection No.1. 2005; 33: 3-8.
16. Kluytmans J, van Belkum A, Verburgh H: Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev. 1997; 10: 505-20.
17. Nouwen JL, van Belkum A, Verburgh HA: Determinants of *Staphylococcus aureus* nasal carriage. Neth J Med. 2001; 59: 126-133.

18. Kaleli İ, Ozen N, Yalçın AN, Akşit F. Hastane personelinde burunda *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığının saptanması. *İnfeksiyon Derg.* 1997; 11: 243.
19. Karabiber N. Normal populusyonda ve hastane laboratuar personelinde *Staphylococcus aureus* burun taşıyıcılığı. *Mikrobiyol Bul.* 1988; 22: 105.
20. Abbott KC, Agodoa LY,. Hospitalizations for bacterial endocarditis after initiation of chronic dialysis in the United States. *Nephron.* 2002; 91: 203-9.
21. Moreillon P, Que YA. Infective endocarditis. *Lancet.* 2004; 363: 135-49.
22. Osiyemi O, Dickinson G. Gram-positive pneumonia. *Curr Infect Dis Rep.* 2000; 2: 207-14.
23. Dündar V, Öztürk Dündar D. Stafilokok infeksiyonları Willke Topcu A (editor). *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Cilt 2. Etkenlere göre infeksiyonlar.* 2002 Nobel Tıp Kitapevleri; 1507-1516.
24. Dündar V. Metisiline Dirençli Stafilokok İnfeksiyonları. *Klimik Dergisi Cilt 13, Özel Sayı* 2000; 26-7.
25. Stefani S, Agodi A. Molecular epidemiology of antibiotic resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2000; 13: 143-53.
26. Dowson CG. Coffey TJ, Spratt BG. Origin and molecular epidemyology of penicilin- binding protein mediated resistance to β -lactam antibiotics. *Trends Microbiol.* 1994; 2: 361-66.
27. Kelly BG, Vespermann A, Bolton DJ. Horizontal gene transfer of virulence determinants in selected bacterial foodborne pathogens. *Food Chem toxicol.* (In press) 2008.

28. Rice LB, Bonomo RA, Genetic and biochemical mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents, In Lorian V (Eds). Antibiotics in Laboratory Medicine. Lippincott Williams & Wilkins, USA. 2005; p:441-508.
29. Hawkey PM. Molecular epidemiology of clinically significant antibiotic resistance genes. Br J Pharmacol. 2008;153: 406-13.
30. Summers AO. Genetic linkage and horizontal gene transfer, the roots of the antibiotic multi-resistance problem. Anim Biotechnol. 2006; 17: 125-35.
31. Schwalbe RS, Stapleton JT, Gilgan PH. Emergence of Vankomicin-resistance in coagulase-negative staphylococci. N Eng J Med 1987; 316: 927-31.
32. Tenover FC, Biddle JW, Lancaster MV. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. Emerg Infect Dis. 2001; 7: 19.
33. Fridkin SK, Hageman J, McDougal LK, Mohammed J, Jarvis WR, Perl TM, Tenover FC, for the Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus* Epidemiology Study Group. Epidemiological and Microbiological Characterization of Infections Caused by *Staphylococcus aureus* with Reduced Susceptibility to Vancomycin, United States, 1997-2001. Clin Infect Dis. 2003; 36: 429-39.
34. Sieradzki K, Roberts RB, Haber SW. The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infection. N Eng J Med. 1999; 340: 517-23.
35. Sievert DM, Boulton ML, Stoltman G, Johnson D. *Staphylococcus aureus* Resistant to Vancomycin - United States, 2002. MMWR. 2002; 51: 565-67.
36. Borner K, Hoffken G, Lode H. Pharmacokinetics of ciprofloxacin in healthy volunteers after oral and intravenous administration. Eur J Clin Microbiol. 1986; 5: 179-86.

37. Leclercq R, Courvalin P. Intrinsic and unusual resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991; 35: 1273-76.
38. Boyce JM, Havill NL. Comparison of BD GeneOhm Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) PCR versus the CHROMagar MRSA Assay for Screening Patients for the Presence of MRSA Strain. *Journal of Clinical Microbiology.* 2008; 46: 350-51.
39. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 2006; 13: 222-35.
40. Boye K, Bartels MD, Andersen IS, Moller JA, Westh H. A new multiplex PCR for easy screening of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* SCCmec types I–V. *Clin Microbiol Infect.* 2007; 13: 725-27.
41. Levi K, Bailey C, Bennett A, Marsh P, Cardy DL, Towner KJ. Evaluation of an Isothermal Signal Amplification Method for Rapid Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from Patient-Screening Swabs. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 3187-91.
42. Eigner U, Weizenegger M, Fahr AM, and Witte W. Evaluation of a Rapid Direct Assay for Identification of Bacteria and the *mecA* and *van* Genes from Positive-Testing Blood Cultures. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 5256-62.
43. Prère MF, Baron O, Fayet O. Rapid identification of bacteria, *mecA* and *van* genes from blood cultures. *Pathol Biol.* 2007; 55: 375-77.
44. Prof. Dr. Sercan Ulusoy, Prof. Dr. Gaye Usluer, Prof. Dr. Serhat Ünal. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'a bağlı hastane infeksiyonlarının kontrolü. *Önemli ve Sorunlu Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları* 2004: 56-68.

45. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Beach M and the SENTRY Participants group. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, LatinAmerica, Europe, and the Western Pacific region for the Sentry Antimicrobial Surveillance Program, 1997–1999. *Clin Infect Dis.* 2001; 32: 114-32.
46. Fluit AC, Welders CLC, Verhoef J, Schimitz FJ. Epidemiology and susceptibility of 3.051 *Staphylococcus aureus* isolates from 25 University hospitals participating in the European Sentry Study. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 3727-32.
47. Bell JM, Turnidge JD, and SENTRY APAC Participants. High prevalance of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from hospitalized patients in Asia-Pacific and South Africa: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1998-1999. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 879-81.
48. Aslan H, Gürdoğan K. Yoğun bakım ünitelerinde gözlenen hastane infeksiyonları. *Hastane İnfeks derg.* 1999;41:3165-9.
49. Çetin ÇB, Turgut H, Kaleli, Yalçın AN, Orhan N. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi yoğun bakım ünitesinde nozokomiyal infeksiyonlar. *Hastane İnfeks Derg.* 2002; 6: 98-101.
50. Erol S, Özkurt Z, Altoprak Ü, Parlak M. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakülteleri hastanelerinde 2001 yılında gözlenen hastane infeksiyonları. *Hastane İnfeks Derg.* 2003; 7: 153-56.
51. Dökmetaş İ, Elaldı N, Bakır M ve ark. Nöroşirürji Kliniği ve Nozokomiyal İnfeksiyon: Bir Üniversite Hastanesinin Üç Yıllık Takip Sonuçları. *Hastane İnfeks Derg.* 2002; 6: 46 - 52.
52. Gastmeier P, Sohr D, Geffers C, Nassauer A, Dettenkofer M and Rüden H.

Occurrence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections in German intensive care units. *Infection* 2002; 30: 198-202.

53. Saravolatz LD, Markowitz N, Arking L, Pohlod D, Fisher E. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections: a new source for nosocomial outbreaks. *Ann Intern Med* 1982; 97: 325-29.

54. Ulusoy S, Doğanay M, Ünal S (editörler). Çoğul dirençli gram-pozitif bakteriler. Hastane İnfeksiyonları. 1. baskı. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2003:247.

55. Rubin RJ, Harrington CA, Poon A, Dietrich K, Greene JA, Moiduddin A: The economic impact of *Staphylococcus aureus* infection in New York City hospitals. *Emerg Infect Dis* 1999; 5: 9-17.

56. Lepelletier D, Richet H. Surveillance and control of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* infections in French hospitals. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2001; 22: 677-82.

57. Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, et al. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific Region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 114-32.

58. Borg MA, de Kraker M, Scicluna E, et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in invasive isolates from southern and eastern Mediterranean countries. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 60: 1310-15.

59. Derbentli Ş. Stafilokoklarda antibiyotik direnci: 2003-2004 Türkiye haritası ANKEM Derg. 2005;19: 54-60.

60. Çetinkaya Y, Ünal S. Stafilokokal nazal taşıyıcılık önemi ve tedavisi. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi.* 1999; 3: 22-32.

61. Tomasz A, Drugeon H B, de Lencastre H M, Jabes D, McDougall L, Bile J. New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989; 33: 1869-74.
62. Cauwelier B, Gordts B, Descheemaeker P, Van Landuyt H. Evaluation of a disk diffusion method with cefoxitin (30 microg) for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004; 23: 867-68.
63. Kerttula AM, Mero S, Pasanen T, Vuopio-Varkila J, Virolainen A. Evaluation of phenotypic and molecular methods for screening and detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Scand J Infect Dis.* 2008; 40: 663-66.
64. Lee Y, Kim CK, Kim M, Yong D, Lee K, Chong Y. Detection of *mecA* in strains with oxacillin and cefoxitin disk tests for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus*. *Korean J Lab Med.* 2007; 27: 276-80.
65. Murat T, Bülent S, Duygu E. *Staphylococcus aureus*'ta metisilin direncinin belirlenmesinde sefoksitin disk, oksasilin disk, oksasilin agar tarama *pbp2a* lateks testlerinin karşılaştırılması. *İnfeksiyon Dergisi.* 2006; 20: 93-6.
66. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Eighteenth informational supplement, Approved Standard M100-S18, CLSI, Wayne, PA (2008).
67. Skov R, Smyth R, Larsen AR, et al. Phenotypic detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* by disk diffusion testing and E-test on Mueller-Hinton agar. *J Clin Microbiol* 2006; 44: 4395-9.

68. Diab M, El-Damarawy M, Shemis M. Rapid identification of methicillin-resistant staphylococci bacteremia among intensive care unit patients. *Medscape J Med.* 2008; 10: 126.

69. Felten A, Grandy 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: 2766–71.