



T. C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

**GRAM POZİTİF BAKTERİ ÜREMESİ SAPTANAN KAN KÜLTÜRLERİNDE
GENOTİPLENDİRME İLE İDENTİFİKASYON VE DİRENÇ TAYİNİ**

ZİYA EDOĞAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof.Dr. Cihadiye Elif ÖZTÜRK

DÜZCE 2019

Form:6

KABUL VE ONAY

Mikrobiyoloji Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan
“Gram Pozitif Bakteri Üremesi Saptanan Kan Kültürlerinde Genotiplendirme ile İdentifikasyon ve Direnç
Tayini”
adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 07/08/2019

TEZ SINAV JÜRİSİ

Prof. Dr. Cihadiye Elif ÖZTÜRK
Düzce Üniversitesi
Başkan



Dr. Emel ÇALIŞKAN
Düzce Üniversitesi
Üye



Dr. Öğr. Üyesi Fatma AVCIOĞLU
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun **28/08/2019** tarih ve **2019/276** sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Adnan ÖZÇETİN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

18.07.2019

Ziya ERDOĞAN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bu tezin hazırlanması süresince kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösteren, eğitimim boyunca sevgi ve ilgisini eksik etmeyip bana destek olan değerli hocam ve tez danışmanım sayın Prof. Dr. C.Elif ÖZTÜRK hocama sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans eğitimimde hocalarım olan, bilgi ve deneyimlerini paylaşmaktan mutluluk duyan sayın Prof. Dr. Şükrü ÖKSÜZ ve sayın Dr. Öğr.Üyesi Emel ÇALIŞKAN hocalarımıza teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimim boyunca bana destek olan Düzce Üniversitesi Rektör Yardımcısı sayın Prof. Dr. İdris ŞAHİN hocama teşekkür ederim. Tezimin verilerini değerlendirmede bana yardımcı olan Doç. Dr. Şengül CANGÜR hocama ayrıca teşekkür ederim. Tezimin yazım aşamasında bilgisine ve deneyimine başvurduğum sayın Emine SÖNMEZ'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca dostluğu ve yardımlarıyla bana destek olan Biyolog Dursun ATİK' e teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana yardımcı olan Düzce Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çalışan kıymetli Biyolog ve Laborant arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bana her zaman destek olan eşim Meryem ERDOĞAN' a, kızlarım Selin ERDOĞAN ve Hazal ERDOĞAN'a teşekkür ederim. Ayrıca bu günlere gelmem için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan başta annem Akile ERDOĞAN olmak üzere bütün aileme teşekkürlerimi sunarım.

Ziya ERDOĞAN

2019

İÇİNDEKİLER

BEYAN	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar	vii
RESİMLER	viii
KISALTMALAR	ix
ÖZET	1
ABSTRACT	2
1.GİRİŞ ve AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Sepsis.....	4
2.1.1. Epidemiyoloji.....	5
2.1.2. Patogenez	6
2.1.3. Etiyoloji.....	7
2.1.4. Prognoz	7
2.1.5. Gram pozitif bakteriyel sepsisler.....	8
3.GEREÇ ve YÖNTEM	20
3.1. Araştırma Tipi	20
3.2. Örnekleme	20
3.3. Verilerin Toplanması.....	20
3.4 Laboratuvar Analizleri	20
3.5. Test Prosedürü.....	21
3.5.1. Çalışmada kullanılan kit ve malzemelerin listesi	21
3.5.2. DNA ekstraksiyonu	23

3.5.3. Multipleks amplifikasyon testi	24
3.5.4. Hibridizasyon	25
3.6. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Yorumlanması	26
3.7. İstatistiksel Analiz	28
4. BULGULAR	29
5. TARTIŞMA	41
6.SONUÇLAR	51
7.KAYNAKLAR	52
8.ÖZGEÇMİŞ.....	62



TABLÖLAR

Tablo 1. Bakteri kültüründe tanımlanan bakteriler ve kliniklere göre dağılımı.....	29
Tablo 2. Bakteri kültürü ve genotipleme sonuçlarının karşılaştırılması	34
Tablo 3. Bakteri kültürü/ antibiyogramı ile saptanan antibiyotik direnç oranları	36
Tablo 4. Stafilokoklarda oksasilin direnç oranlarına göre mecA geni varlığının incelenmesi	37
Tablo 5. Enterokoklarda vanA geni varlığına göre glikopeptid direnç/duyarlılık oranlarının karşılaştırılması	38
Tablo 6. Stafilokoklarda mecA geni varlığına göre antibiyotik direnç oranları	39

RESİMLER

Resim 1. Çalışmada kullanılan strip	27
Resim 2. Yorumlama tablosu	28
Resim 3a. Genotipleme çalışmasındaki sonuçlar	30
Resim 3b. Genotipleme çalışmasındaki sonuçlar	31
Resim 3c. Genotipleme çalışmasındaki sonuçlar	32
Resim 3d. Genotipleme çalışmasındaki sonuçlar	33



KISALTMALAR

DSÖ	: Dünya sağlık örgütü
YB	: Yoğun bakım ünitesi
ACCP/SCCM	: American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine
SIRS	: Sistemik enflamatuar yanıt sendromu
MODS	: Multiple organ disfonksiyonu
ATS	: American Thoracic Society
ESICM	: European Society of Intensive Care Medicine
SIS	: Surgical Infection Society
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
MRSA	: Metisiline dirençli <i>S. aureus</i>
MIK	: Minimal inhibitör konsantrasyon
VISA	: Vankomisine orta düzeyde duyarlı <i>S. aureus</i>
hVISA	: Heterojen vankomisine orta düzeyde duyarlı <i>S. aureus</i>
VRSA	: Vankomisine dirençli <i>S. aureus</i>
MSSA	: Metisiline duyarlı <i>S. aureus</i>
PBP	: Penisilin bağlayan protein
SCCmec	: Stafilokokal kaset kromozomu
MBC	: Minimal bakterisidal konsantrasyon
HK-MRSA	: Hastane kaynaklı metisiline dirençli <i>S. aureus</i>
TK-MRSA	: Toplum kaynaklı metisiline dirençli <i>S. aureus</i>
PVL	: Panton-Valentine leukocidin geni
VRE	: Vankomisine dirençli enterokok
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
PCR	: Polimer zincir reaksiyonları
EUCAST	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
PAP-AUC	: Popülasyon profili analizi
BHI	: Brain heart infusion
KNS	: Koagülaz negatif stafilokok
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
RNA	: Ribo nükleik asit

PYR	: L-pirolidol-â-naftilamid
VA	: Vankomisin
TEİ	: Teikoplanin
CİP	: Siprofloksasin
OX	: Metisilin/Oksasilin
TMP-SXT	: Trimetoprim/sulfametoksazol
GN	: Gentamisin
DEN	: Denatürasyon solüsyonu
STR	: Stringent Yıkama Solüsyonu



ÖZET

GRAM POZİTİF BAKTERİ ÜREMESİ SAPTANAN KAN KÜLTÜRLERİNDE GENOTİPLENDİRME İLE İDENDİFİKASYON VE DİRENÇ TAYİNİ

Ziya ERDOĞAN

Yüksek Lisans Tezi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı Prof.Dr. Cihadiye Elif ÖZTÜRK

Temmuz 2019 72 sayfa

Sepsiste etken bakterinin ve antibiyotik dirençlerinin hızlı şekilde tanımlanması çok önemlidir. Tedavinin en kısa sürede başlanması ile morbidite/mortalite azalmakta, hastanede yatış süresi kısaltılmakta, gereksiz antibiyotik kullanımı önlenmekte ve hastane maliyetlerinin düşmesi sağlanmaktadır. Otomatize kan kültür sistemleri, bakteriyel patojenlerin tanımlanma süresini önemli ölçüde kısaltmıştır. Buna rağmen doğru tedaviye en erken dönemde başlanabilmesi için daha hızlı tanımlama sistemleri gerekmektedir. Çalışmamızda, hastanemiz servislerinde yatan hastalara ait Gram pozitif bakteri üremesi olan kan kültürlerinde “Genotype® BC Gram-positive (Hain Lifescience, Almanya)” testi kullanılarak genotiplendirilmesi, mecA, vanA, vanB, vanC1, vanC2/C3 genlerinin hızlı tespiti amaçlanmıştır. Çalışmaya, bakteri kültürü ile 35(% 77.7)’i MR-KNS olan 45 KNS, 9(%52.9)’u MRSA olan 17 *S.aureus*, 2(%22.2)’si VRE olan 9 Enterokok ve bir *S. grup D* tanımlanmış toplam 72 örnek dahil edilmiştir. Genotipleme yöntemiyle 37(%75.5)’sinde Mec A pozitif olan toplam 49 KNS, 9(% 52.9)’unda mecA pozitif olan toplam 17 *S.aureus*, 2(%20)’sinde vanA pozitif olan toplam 10 Enterococcus, 2 *S.pneumoniae* ve 2 *S. mitis/oralis* bulunmuştur. Genotipleme yöntemi ile kültürde tespit edilemeyen 2 *S. pneumoniae*, 2 *S. mitis/oralis* belirlenmiştir. İstatistiksel değerlendirmede; tüm bakteri türleri için bakteri kültürü ile genotipleme yöntemleri arasında anlamlı düzeyde bir uyum bulunmuştur (p=0,999). BC Gram pozitif testinin, sepsis etkeni olan bakterileri, bu bakterilere ait direnç genlerini ve miksenfeksiyon etkenlerini 4-5 saatte doğru olarak tespit ettiği gözlenmiştir. Bu nedenlerle genotiplendirmenin sepsis düşünülen hastalarda erken klinik tanıya ve tedaviye katkıda bulunabileceği düşünülmüştür. Ancak çalışmamızda kültürde bakteri saptanan 10 örnekte genotipleme yöntemi sonuçlanmadığı görülmüştür. Bu nedenle sepsis tanısında kültür ve moleküler yöntemlerin birlikte kullanılmasının çok önemli olduğu düşünülmüştür.

Anahtar Sözcükler: Sepsis, Kan kültürü, Genotipik testler, Gram pozitif kok, mecA, van genleri, hızlı moleküler test.

ABSTRACT

IDENTIFICATION AND RESISTANT GENE DETECTION WITH GENOTYPING IN BLOOD CULTURES WITH GRAM POSITIVE BACTERIA GROWTH

Ziya ERDOĞAN

Master of science thesis. Department of Microbiology

Supervizor Prof.Dr.Cihadiye Elif ÖZTÜRK

July 2019 72 pages

Rapid identification of the bacteria and antibiotic resistance causing sepsis is very important. Beginning with the appropriate treatment as soon as possible reduced morbidity/mortality, shortened the hospitalization time, prevented the unnecessary antibiotic use and reduced the hospital costs. Automated blood culture systems have significantly reduced the identification time of bacterial pathogens. However, faster identification systems are required to begin the right treatment as early as possible. The aim of this study is identification and resistant gene detection (*mecA* gene and *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3* genes that cause methicillin and vancomycin resistance) with genotyping method (Genotype® BC Gram-positive) in blood cultures with gram positive bacteria growth which were obtained from inpatient from Düzce University Hospital's services. The study included a total of 72 Gram positive bacteria (which are 45 CNS, 17 *S. aureus*, 9 Enterococci and one *S. group D*) identified in blood culture samples. Genotyping revealed a total of 49 CNS of which 37 (75%) is *mecA* positive; a total of 17 *S. aureus* of which 9 (52.9%) is *mecA* positive; a total of 10 enterococci of which 2(20%) *vanA* positive; 2 *S. pneumoniae* and 2 *S. mitis / oralis*.

Two *S. pneumoniae* and 2 *S. mitis / oralis* which could not be detected in the culture, were determined by genotyping method. In the statistical evaluation performed as a result of genotyping study; there was a significant correlation between bacterial culture and genotyping methods for all bacterial species ($p = 0.999$). Using the BC Gram positive test, sepsis causative bacteria from blood culture bottles and resistance genes of these bacteria were detected correctly within 4-5 hours. For this reason it was found that genotyping may contribute to early clinical diagnosis and treatment of sepsis patients. However, in our study, genotyping method was not found in 10 samples with bacteria detected in culture. Therefore, it is thought that the use of culture and molecular methods together is very important in the diagnosis of sepsis.

Key words: Sepsis, Blood culture, Genotypic tests, Gram positive cocci, *mecA*, *van* Genes, rapid molecular testing.

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Sepsisli hastaların kan kültürlerinde üreyen bakteriyel patojenlerin ve antibiyotik dirençlerinin hızlı şekilde tanımlanması tedavi için en uygun antibiyotiğin seçilmesini sağlamaktadır. Uygun tedavinin en kısa sürede başlanması ile; morbidite/mortalite azalmakta, hastanede yatış süresi kısaltılmakta, gereksiz antibiyotik kullanımı önlenmekte ve hastane maliyetlerinin düşmesi sağlanmaktadır^{1,2,3,4,5,6,7}.

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan otomatize kan kültür sistemleri, bakteriyel patojenlerin tanımlanma süresini önemli ölçüde kısaltmıştır^{1,2,6}. Ancak yine de sonuçların raporlanması, kültürlerde pozitif sinyal alındıktan sonra en az iki günde gerçekleşmektedir. Dolayısı ile doğru tedaviye en erken dönemde başlanabilmesi için daha hızlı tanımlama sistemleri gerekmektedir¹.

Son dönemde Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) sepsisi küresel sağlık önceliği olan hastalık olarak tanımlamıştır^{8,9}. Dünyada sepsisin gerçek sayısı bilinmemektedir. Yayımlanmış verilere göre, küresel olarak yılda 30 milyon sepsis olgusu olduğu ve bunların 6 milyonunun ölüm ile sonuçlandığı tahmin edilmektedir^{8,10}. Bu tahmin, yüksek yaşam standartlarına sahip ülkelerde hastanede tedavi edilen sepsis verilerine dayanmaktadır. Ama dünya nüfusunun % 87' sinin yaşadığı düşük ve orta gelirli ülkelerden gelen istatistikleri içermemektedir. Bu ülkelerden yapılan bildirimlerde sepsise bağlı ölümlerin çoğunluğunun, altta yatan enfeksiyona bağlı ölüm olarak kayıtlara geçtiği ve aslında sepsis sayısının bundan çok daha fazla olduğu düşünülmektedir¹¹. Sistemik bir enfeksiyonun sepsis tablosuna gitmesi enfeksiyonun şiddeti ve hastanın durumuna bağlı olarak çok değişken sürelerde gerçekleşen dinamik bir süreçtir. Birçok hasta sepsis tablosuna girdikten sonra geri dönüşümsüz bir süreç başladığı için enfeksiyon etkenlerinin mümkün olan en erken şekilde tanımlanmaları hayati önem taşımaktadır.

Bu çalışmada, Düzce Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi servislerinde yatan hastalara ait kan kültürlerinde, bakteri kültür yöntemleri ile tanımlaması yapılan Gram pozitif bakterilerin, “Genotype® BC Gram-positive (Hain Lifescience, Almanya)” testi kullanılarak genotiplendirilmesi, metisilin ve vankomisin dirençlerine neden olan, sırasıyla mecA geni ve vanA, vanB, vanC1, vanC2/C3 genlerinin hızlı tespiti amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Sepsis

Sepsis, konağın enfeksiyona karşı geliştirdiği sistemik enflamatuvar cevap olarak tanımlanmaktadır. Ölümcül bir hastalıktır. Modern tıbbın önemli bir problemi olmaya devam etmektedir. Yıllar içerisindeki artış eğrisi yukarı yöndedir. Bu artışa sebep olan farklı nedenler söz konusudur. En önemlileri medikal teknolojide yaşanan gelişmeler, yaşlı nüfus artışı, yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören hasta sayısında ve bu hastalara yapılan invaziv işlemlerdeki artışlardır. Yoğun Bakım Ünitelerinde (YBÜ) mortalitenin en önemli nedenlerinden biridir. Uygun ve yoğun bir tedavi yaklaşımının hızlı bir şekilde uygulanması mortalitenin azaltılmasını sağlamaktadır^{12,13}.

Klinik bulguların farklılığı ve farklı klinik seyirler sebebi ile tanıda gecikmeler sıklıkla yaşanmaktadır. Klinik tabloyu tanımlamak ve ortak bir terminoloji geliştirebilmek için "American College of Chest Physicians and The Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM)" 1991 yılında ortak toplantı gerçekleştirmiştir. Bu toplantıda sepsis kliniğini tanımlayan ve derecelendiren tanımlar yapıp kullanılmaya başlanmıştır^{13,14}.

ACCP/SCCM Konferansında kabul edilen tanımlar şu şekildedir:

Enfeksiyon: Mikroorganizmaların varlığının sebep olduğu enflamatuvar yanıt ya da konağın steril dokularında mikroorganizmaların invazyonunu gösteren durumdur^{12,13,14}.

Bakteriyemi: Kan dolaşımında canlı bakteri bulunmasıdır. Tanısı hastadan alınan kan kültürü örneklerinin pozitifliği ile konur^{12,13,14}.

Sistemik Enflamatuvar Yanıt Sendromu (SIRS): Farklı klinik uyarılara karşı konağın verdiği cevabı tanımlar.

Aşağıdaki bulgulardan en az ikisinin varlığı ile tanımlanır:

- Vücut ısısı $> 38^{\circ}\text{C}$ ya da $< 36^{\circ}\text{C}$
- Kalp hızı > 90 atım/dakika
- Solunum hızı > 20 /dakika ya da $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg
- Lökosit sayısı $> 12.000/\text{mm}^3$ ya da $< 4000/\text{mm}^3$ ya da periferik yayma preparatında %10'un üzerinde genç nötrofillerin saptanması^{12,13,14}.

Sepsis: Konakta enfeksiyona karşı gelişen sistemik enflamatuvar yanıt olarak tanımlanır. İki ya da daha fazla SIRS bulgusu ile ortaya konur^{12,13,14}.

Ağır sepsis: Sepsis ile beraber organ fonksiyon bozukluğu, hipoperfüzyon ya da hipotansiyonun görülmesi olarak tanımlanmıştır^{12,13,14}.

Sepsise bağlı hipotansiyon: Hastanın sistolik kan basıncının 90mm/Hg'nin altına düşmesi ya da herhangi bir neden olmadan hastanın bilinen sistolik kan basıncının 40mm/Hg ve daha fazla düşmesi olarak tanımlanmıştır^{12,13,14}.

Septik şok: Uygun sıvı tedavisi uygulanmasına rağmen sepsiste hipotansiyon ile beraber hipoperfüzyonun devam etmesi olarak tanımlanmıştır^{12,13,14}.

Multiple organ disfonksiyonu (MODS): Sepsis tablosu içerisinde organ fonksiyon değişikliklerinin görülmesi olarak tanımlanmıştır^{12,13,14}. Sepsis ile ilgilenen bazı derneklerin [ACCP, SCCM, American Thoracic Society (ATS), European Society of Intensive Care Medicine (ESICM) ve Surgical Infection Society (SIS)] Aralık 2001'de Washington'da düzenlediği "Uluslararası Sepsis Tanımları Konferansında", sepsis fizyopatolojisindeki gelişmeler ve 1992'de kabul edilen tanımlar göz önünde bulundurularak, sepsis tanımı yeniden düzenlenmiştir. Sepsisin tanısında kullanılacak kriterler belirlenmiştir. Bu toplantıda sepsisin tanısında kullanılacak herhangi bir altın standart olmadığı, önerilerin sadece hasta başında klinisyenin karar vermesinde yardımcı olacağı şeklinde özetlenmiştir^{13,15}.

2.1.1. Epidemiyoloji

Sepsis ve sepsisin neden olduğu klinik tabloların gerçekte görülme sıklığını ortaya koymak zordur. Toplum kaynaklı gelişen sepsislerin görülmesi azalırken, hastane kaynaklı enfeksiyonların neden olduğu sepsislerde artış görülmektedir. Martin ve arkadaşları ABD'(Amerika Birleşik Devletleri)nde 1979-2000 yılları arasında 10319418 sepsis vakası izlediklerini bildirmişlerdir¹⁶. Bu rakam belirtilen dönemde klinikte tedavi gören hastaların %1.3'ünü oluşturmaktadır. Yıllık %13.7 oranında sepsis insidansında artış saptamışlardır. Bu artışın nedenleri olarak sepsisin daha iyi tanınması ile daha fazla sepsis tanısının konulması, kliniklerde ve YBÜ' lerede invaziv girişimlerin artışı, mikrobiyal direnç artışı bildirilmiştir^{13,16}.

Toplum kaynaklı sepsis insidansı konusunda ülkemizde yeterli çalışma yapılmadığından elde yeterli veri bulunmamaktadır. Bununla beraber YBÜ'lerimizde hastane kaynaklı bakteriyemi ve sepsis insidansı %7,6-15,8 olarak belirtilmiştir^{17,18,19}.

2.1.2. Patogenez

Sepsis patogenezi karmaşık olaydır. Bakterinin konağa yerleşmesi, konağın savunma mekanizmaları ile etkileşimi sonucunda hastalık ortaya çıkmaktadır. Hastalığın ortaya çıkışını, konağın immün sistemi ve bakteriyel virülans faktörleri belirler¹³.

Konağa ait faktörler ve enfeksiyonun giriş kapısı

Sepsise neden olan bakteriler dolaşıma genellikle damar dışı bir enfeksiyon odağından yayılım sonucu girer. Bazen de enfeksiyon damar içi katater, septik tromboflebit, bakteriyel endarterit, endokardit, mikotik anevrizmalar ve damar greftlerinden kaynaklanabilir. Sepsislerde en sık primer enfeksiyon odağını; üriner sistem, solunum sistemi, genital sistem, deri ve yumuşak doku, karın içi ve damar içi kataterler oluşturur. Hastane dışında gelişen sepsislerde en sık giriş kapısını solunum sistemi ve üriner sistem oluştururken, nozokomiyal sepsislerde ise damar içi katater ve üriner katater enfeksiyonları oluşturmaktadır. Yoğun bakım ünitelerinde ise nozokomiyal pnömoniler öne çıkmaktadır¹³.

Enfeksiyona karşı konağı koruyan savunma mekanizmalarının bozulması, lokal veya sistemik enfeksiyonlara zemin hazırlar. Konak savunma mekanizmalarını üç kategoride toplayabiliriz; anatomik bariyer, hücresel defans (fagositik hücreler, lenfositler) spesifik ve nonspesifik hücresel hümmoral defans. Bakteriyel enfeksiyonlara karşı organizmayı koruyan en önemli defans sistemi anatomik bariyerdir. Sağlam deri ve mukozalar mikroorganizmaların daha derin dokuya girmesini engeller. Travma yanık veya perkutan damar içi kataterler bu bariyeri kırar. Diğer önemi bir savunma mekanizması ise vücut sekresyon ve ekskresyonlarının normal akımıdır. Bunların obstrüksiyonu, o anatomik bölgede doku basıncının artmasına, kan akımının azalmasına ve bakteriyel proliferasyona neden olur¹³.

Sepsisli hastalarda bakteriyemi; İmmün sistemi sağlam, sağlıklı kişilerde lokal enfeksiyonun (peritonit, apse, hidronefroz, kolanjit gibi) yayılması, yenidoğanlarda, immün sistemi baskılanmış hastalarda küçük bir enfeksiyon odağının varlığı ve

damariçi katater, intravenöz mayi kullanımı gibi nedenlerle bakteri lokal bariyeri aşarak direk dolaşıma geçer¹³.

Streptococcus pneumoniae, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* ve *Staphylococcus aureus* genellikle belirlenebilen herhangi bir fokal enfeksiyon olmadan bakteriyemi yapabilirler¹³.

Mikrobiyal faktörler

Sepsis etkeni olan bakterilerin çoğunluğu endojen floradan kaynaklanmaktadır. Enfeksiyonun gelişmesinde bakteriyel virülans faktörleri (adherans, seruma direnç, anti fagositik yüzey, enzim ve toksinler gibi) rol oynar. Sepsis ve onun sonucu olarak gelişen klinik tabloların oluşmasında bakteriyel invazyasyon ile beraber bakteriyel hücresel yapıların ve toksinlerinde önemli rolü vardır. Bu hücresel yapılar ve toksinler organizmada değişik biyolojik sistemleri aktive eder. Sepsisteki fizyopatolojik değişikliklerden sorumlu endojen mediyatörlerin açığa çıkmasını sağlar¹³.

2.1.3. Etiyoloji

Sepsis etiyojisinden birçok bakteriyel etken sorumludur. Antibiyotikler kullanım alanına girmeden önce streptokoklar ve stafilokoklar en sık sepsis etkeni iken antibiyotiklerin kullanılmaya başlanması ile Gram negatif bakteriler gittikçe artan oranlarda sepsis etkeni olarak izole edilmeye başlanmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, Gram pozitif bakterilerin de sepsis etkeni olarak izole edilme oranlarında artış gözlenmektedir. Özellikle de stafilokokların neden olduğu sepsislerde artış olduğu dikkati çekmektedir¹³.

2.1.4. Prognoz

Sepsis tedavisinde yeni gelişmelere rağmen ölüm oranı hala yüksektir. Değişik çalışmalarda ölüm oranı %20-80 arasında bildirilmektedir^{20,21}. Gram negatif bakteriyel sepsislerde ölüm oranı %45-50, Gram pozitif bakteriyel sepsislerde ölüm oranı %20-30 ve anaerop sepsislerde ise ölüm oranı %15-30 dur. Yapılan çalışmalarda sepsis evreleri ile ilgili mortalite oranları SIRS'te %6-27, sepsiste %10-36, ağır sepsiste %18-52 septik şokta ise %50-78 bulunmuştur¹³.

Sepsiste prognozu etkileyen faktörler şu şekilde sıralanabilir¹³;

-Altta yatan hastalık: Nötropeni, hipogammaglobulinemi, diabet, alkolizm, böbrek yetmezliği, solunum yetmezliği.

-Tedavi başladığında enfeksiyona bağlı komplikasyonların gelişmiş olması (şok, anüri gibi).

-Bakteriyeminin şiddeti (polimikrobiyal bakteriyemi).

-Enfeksiyon kaynağı.

-Enfeksiyonun geliştiği yer (nozokomiyal).

-Hastanın yattığı servis (yoğun bakım ünitesi).

-Antibiyotik tedavisinin uygunluğu.

-Tedavinin başlanmasına kadar geçen zaman.

-İleri yaş.

2.1.5. Gram pozitif bakteriyel sepsisler

Stafilokok sepsisi

Stafilokoklar hareketsiz, sporsuz, katalaz testi pozitif, kapsülsüz veya az miktarda kapsül içeren, 0,5-1,5mm çapında gram pozitif koklardır. Tek, çift, dörtlü veya kısa zincirler şeklinde görülebilirler. Bakterilerin çoğalırken üç boyutta bölünebilmeleri ve bölünmeden sonra tam ayrılmanın olmaması nedeni ile mikroskopik görünümleri üzüm salkımı şeklindedir. Çoğunlukla fakültatif anaeropturlar²².

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus, tüm dünyada hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonlara yol açan önemli bir patojendir. Başta yoğun bakım ünitelerinde olmak üzere metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) enfeksiyonlarının sayısının giderek arttığı rapor edilmektedir^{23,24,25}. Son yıllarda, MRSA enfeksiyonlarının epidemiyolojisinde dört önemli değişiklik meydana gelmiştir. Bu değişikliklerden ilki *S. aureus* izolatlarında görülen metisilin direnç oranlarındaki artıştır. Yapılan çalışmalarda, YBÜ'lerinden izole edilen *S. aureus* suşlarının yaklaşık %80'inde metisiline direnç saptanmıştır^{23,25}. İkinci önemli değişiklik, MRSA suşlarında görülen vankomisin duyarlılığındaki azalmadır. Bu suşların vankomisin minimal inhibitör konsantrasyon (MIK) değerleri $\leq 2 \mu\text{g/ml}$

olmak üzere duyarlı sınırlarında olmasına rağmen, vankomisin ile klinik tedavide başarısız sonuçlar elde edilmektedir. Üçüncüsü, MRSA izolatları arasında vankomisine orta düzeyde duyarlı *S. aureus* (VISA), heterojen VISA (hVISA) ve vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA)'ların görülmeye başlamasıdır. Dördüncü önemli değişiklik ise MRSA sorununun sadece hastanelerde sınırlı kalmayıp toplumda da görülmeye başlamasıdır^{23,26,27}.

S. aureus doğumdan itibaren göbük, perine ve deriye kolonize olur. Sonrasında özellikle burunda yerleşir. İnsanların %20'si sürekli taşıyıcıdır. %20'sinde *S. aureus* hiçbir şekilde kolonize olmaz. Kalan %60'ı zaman zaman burunlarında *S. aureus* taşırlar²².

S. aureus % 5' lik koyun kanlı agarda beta hemoliz yapar. Koloni rengi krem rengi ile altın sarısı arasındadır. Koagülaz testi pozitifdir. Bu özelliği ile değer stafilokok türlerinden ayrılırlar. *S. lugdunensis* ile beraber insanda görülen en virulan stafilokok türüdür²².

S. aureus'larda görülen ilk antibiyotik direnç 1930'lu yıllarda klinik olarak kullanılmaya başlanan sülfonamid grubu antibiyotiklerle başlayıp, günümüzde kullanılan linezolid ve daptomisine kadar gelmiştir. 1941 yılında klinik kullanıma giren penisilin G ile *S. aureus* enfeksiyonlarında ciddi bir azalma görülmüştür. Bu durum oldukça kısa sürmüştür. Penisilinaz (beta-laktamaz) enzimi sentezleyen izolatların ortaya çıkmasıyla penisilin direnci görülmüştür. Bu direnç β -laktamaz (penisilinaz) enziminin β -laktam halkasını parçalayarak penisilini inaktive etmesiyle oluşur. β -laktamaz çoğunlukla başka antibiyotiklere karşı da direnç genleri içeren bir plazmitte bulunan bla geni ile kodlanıp hücre dışına atılır^{22,23,28,29}.

β -laktamaza dirençli yarı sentetik penisilinler (metisilin, oksasilin, nafsilin) 1960'larda kullanılmaya başlanmıştır. Bunlar penisiline duyarlı stafilokoklara, penisiline oranla daha az etki etmektedir. β -laktamaza dirençli penisilinlerin kullanılmaya başlanmasından kısa bir süre sonra bunlara karşı dirençli suşların olduğu tespit edilmiştir. Bu antibiyotiklerin hiç kullanılmadığı ülkelerde de bu dirençli suşların tespiti, bu direnç tipinin stafilokoklarda daha önceden edinildiğini ortaya koymuştur. Bu direnç tipine intrensek direnç yada metisilin direnci denir²².

Günümüzde MRSA enfeksiyonlarının klinik tedavisinde en sık kullanılan ilaçlar glikopeptid grubundan olan vankomisin ve teikoplanin antibiyotiklerdir. Klinik tedavide

linezolid, daptomisin ve tigesiklin gibi yeni antibiyotikler de kullanılmaktadır. Ancak stafilokoklarda antibiyotiklere karşı görülen hızlı direnç gelişimi hem glikopeptid grubu ilaçlara hem de diğer yeni geliştirilen ilaçlara karşı da ortaya çıkmıştır. 1996 yılında VISA izolatları ve 2002 yılında da VRSA suşları saptanmaya başlanmıştır. Yeni antibiyotiklerden linezolid 2000 yılında klinik olarak kullanılmaya başlanmış, bir yıl sonra da ilk linezolide dirençli MRSA izolatı tanımlanmıştır^{23,30}.

Benzer biçimde daptomisin, ilk kez 2003 yılında klinik olarak kullanılmaya başlanmış ve iki yıl sonra da bu ilaca dirençli suşlar görülmüştür^{23,31}.

Metisilin direnci ve mecA geni

Metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) suşlarında beş tane penisilin bağlayan protein (PBP) mevcuttur. Metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA)'larda bu proteinlerden farklı olarak, 78 kDa molekül ağırlığında, "PBP2a" olarak adlandırılan bir PBP daha mevcuttur. PBP2a, beta-laktamlara çok düşük afinite gösterir. Böylelikle beta-laktamların varlığında, yüksek afiniteli PBP'lerin işlevini görerek peptidoglikan sentezini devam ettirir^{22,23,28,32}.

PBP2a, 2.1 kb büyüklüğünde ve tüm MRSA suşlarında mevcut olan mecA geni tarafından kodlanır. Metisiline dirençli olan tüm stafilokok izolatlarında bu gen bulunur. MecA geni, stafilokokal kaset kromozomu (SCCmec) olarak adlandırılan kaset bölgesinde bulunur. SCCmec kasetinin büyüklüğü 20 kb - 60 kb arasındadır. Ccr (ccrABveya ccrC) ve mecA gen komplekslerinde görülen yapısal değişikliklere göre bugün için tanımlanmış 11 alt tipi (Tip I-XI) bulunmaktadır. Mec A geni kromozom üzerinde IS431 ve IS527 insersiyon sekans elemanları arasında yerleşmiştir. Bu özellik gene başka bakteriye geçme ve yanına başka ilaç direnç genlerini alabilme özelliği de verir. MRSA suşlarının β -laktam dışı birçok antibiyotiğe de çoklu direnç göstermesinin nedeninde bu özelliktir^{22,23,33}.

MRSA'lar çoklu ilaç direnci gösteren patojenler olarak oldukça önemlidirler. Bütün beta-laktam grubu antibiyotikler ile beraber linkozamidler, makrolidler ve aminoglikozidlere karşı da direnç gösterirler^{22,23,34}. Günümüzde MRSA'lar bütün dünyada yaygın olarak görülmekte olup, prevalansı ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir. Avrupanın kuzey ülkelerinde MRSA prevalansı %1'in altında

iken,güney Avrupa ülkelerinde, Amerika'da ve Asya'daki bazı ülkelerde bu oran %50'lere ulaşmıştır. ABD'deki yoğun bakım ünitelerinde ise %60'ı geçmiştir^{23,35,36}.

Metisilin direnci homojen ve heterojen olarak görülmektedir. Homojen metisilin direncinde kolonideki tüm bakteriler mecA genine sahiptir. Bu gen tümünde ekspresse olmuştur. Heterojen dirençte de kolonideki tüm bakteriler mecA geni taşımalarna rağmen bir kısmında ekspresse olup in vitro olarak tespit edilebilir ve laboratuvar tanısını güçleştirebilir. Metisilin direncinin saptanmasında 30 µg sefoksitin ile yapılan disk difüzyon testi, %2 NaCl ihtiva eden katyon ayarlı Mueller Hinton agarda yapılan oksasilin MIC ve oksasilin agar tarama testi, mecA ve PBP2a' yı saptamaya yönelik moleküler testler kullanılmaktadır²².

β-laktamlara duyarlı olan bazı *S. aureus* suşları MIC degerinden 32 kat ya da daha fazla minimal bakterisidal konsantrasyon (MBC) değeri gösterir. Bu özelliğe tolerans adı verilir. Bazı *S. aureus* suşları mecA geni taşımayıp, PBP-2a üretmeyip, metisilin direncini tespit etmek için kullanılan oksasiline karşı sınırda direnç gösterirler. Bunun nedenleri suşların aşırı β-laktamaz üretmesi ve PBP-2 geninde nokta mutasyonlar olmasıdır²².

Hastane kaynaklı MRSA (HK-MRSA) ve toplum kaynaklı MRSA (TK-MRSA) enfeksiyonlarının görülmesi 1990'lardan itibaren artmıştır. TK-MRSA'lar, HK-MRSA'lardan moleküler olarak farklılık gösterir. HK-MRSA suşlarında, genellikle tip I, II veya III SCCmec tip I, II yada III genetik materyaline sahiptir. TK-MRSA suşlarında ise SCCmec tip IV , V veya VII genetik materyali ile beraber "Panton-Valentine leukocidin (PVL)" geni bulunmaktadır. PVL, kuvvetli virülans faktördür. HK-MRSA suşlarından SCCmec tip II ve tip III taşıyanlar metisilin yanında klindamisin, makrolid, tetrasiklin ve streptogramin B antibiyotiklerine karşı dirence sahiptirler. TK-MRSA suşlarında çoğunlukla klindamisin, trimetoprim-sülfametoksazol, tetrasiklin, gentamisin, florokinolonlar ve kloramfenikole duyarlıdır^{23,28,36}.

TK-MRSA'lar ile HK-MRSA'lar moleküler farklılıklarının yanı sıra oluşturdukları enfeksiyonlar bakımından da farklılıklar gösterirler^{23,37}.

Glikopeptid direnci ve vanA geni

Günümüzde MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde, glikopeptid grubu antibiyotiklerden vankomisin ve teikoplanin kullanılmaktadır. Vankomisin, *Streptomyces orientalis*'ten

teikoplanin de *Actinoplanes teichomyceticus*' tan izole edilmiştir. Glikopeptidler, hücre duvarı sentezini inhibe ederek etkilerini gösterirler. Hücre duvarı sentezlenirken, peptidoglikanın D-alanil-D-alanin ucuna bağlanarak transpeptidasyon aşamasını inhibe ederler^{23,36}.

Vankomisin, yalnızca Gram pozitif bakterilere etkili olan bir antibiyotik olarak kullanıma girmiştir ve yıllar boyunca vankomisine karşı direnç izlenmemiştir. İlk olarak 1989 yılında vankomisine dirençli enterokoklar (VRE) görülmüştür. 1996 yılında ise vankomisine orta düzeyde duyarlı *S. aureus* (VISA) suşu tespit edilmiştir. 1997 yılında heterojen VISA (hVISA), 2002 yılında vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA) suşu saptanmıştır^{23,36}.

Japonya'dan Hiramatsu ve arkadaşları, 1996 yılında vankomisine azalmış duyarlılığa sahip klinik MRSA izolatını saptamışlardır. Bu suşun vankomisin MİK değeri, mikrodilüsyon yöntemi ile 8 µg/ml olarak tespit edilmiştir^{23,38}. Bunu takiben Amerika'dan iki ve Fransa'dan bir olgu olmak üzere vankomisine azalmış duyarlılık gösteren diğer *S. aureus* izolatları da tespit edilmiştir^{23,39,40}. Vankomisin MİK değerleri 8µg/ml olarak saptanan bu suşlar, "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" kriterlerine göre vankomisine orta düzeyde duyarlı *S. aureus* (VISA) olarak tanımlanmıştır^{23,39,40}. Tüm vakaların ortak özelliği olarak, direncin tespitinden altı ay önceki dönemde çokça ve uzun süreli vankomisin ya da teikoplanin tedavisinin uygulanmış olmasıdır. 1996 yılından sonra Asya, Amerika ve Avrupa ülkelerinden, vankomisin MİK değerleri 8-16µg/ml arasında değişen diğer VISA izolatları bildirilmiştir^{23,41,42}. 2007 yılına kadar dünyadan bildirilen tüm VISA suşları yaklaşık 100 olguyla sınırlı kalmıştır^{23,34}.

Hiramatsu ve arkadaşları, 1997 yılında "heterojen VISA (hVISA)" olarak adlandırılan farklı bir vankomisin direnç tipi tanımlamışlardır^{23,38}. "Mu3" olarak adlandırılan ilk hVISA izolatından sonra farklı ülkelerden değişik oranlarda hVISA izolatları bildirilmiştir^{23,43}. MRSA'larda VISA izolatlarına ender olarak rastlanmakla birlikte, hVISA suşları %0.71-65 arasında görülmektedir^{23,43,44,45,46}.

A.B.D. Michigan'da 2002 yılında bir diyaliz hastasında vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA) suşu tespit edilmiştir. Bu olguda vanA geninin varlığı polimer zincir reaksiyonları (PCR) ile ortaya konmuştur^{23,47}.

VRSA'larda ortaya çıkan bu direnç, aşırı peptidoglikan üretimi, artan PBP-2 aktivitesi ile beraber vanA geninin varlığına bağlıdır. Enterokoklarda vanA genini kodlayan Tn1546 transpozonu *S. aureus*'a nakledilebilmektedir. VanA geni bu yolla vankomisine dirençli enterokoklardan *S. aureus*'a geçmiştir. VanA geninin varlığında peptidoglikan sentezlenirken D-alanin-D-alanin yerine D-alanin-D-laktat sentezlenir. Vankomisin yapısı değişen moleküllere bağlanamayacağından hücre duvarı sentezini inhibe edemez^{22,23,26,47}.

VISA' larda ve hVISA' larda vanA geni bulunmaz. VISA' lardaki direnç iki mekanizma ile açıklanmaktadır. Birincisi aşırı vankomisin tüketimidir. Zira VISA suşlarının hücre duvarları, vankomisine duyarlı *S. aureus*'lara göre daha kalındır^{23,48}. İkinci mekanizma ise tıkanma (clogging)'dır. Sentezlenen peptidoglikan tabakalarındaki tuzak moleküller çok miktarda vankomisin molekülünü tutar ve ardlarından gelen diğer vankomisin moleküllerinin önünde engel oluşturur. Bu nedenle vankomisin molekülleri, ortaya çıkan bu engelden geçemeyip hedeflerine ulaşamazlar^{23,49}.

Vankomisine duyarlı olmayan *S. aureus*'ların saptanması için önerilen yöntemler

Disk difüzyon hVISA veya VISA'yı tespit etmede kullanılamaz fakat, sınırlı sayıda destekleyecek çalışma olmasına rağmen VRSA için kullanılabilir^{50,51}.

MİK belirlenmesi

EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) ISO 20776-1 tarafından önerilen sıvı mikrodilüsyon testi altın standarttır. Gradyent şerit yöntemleri ile elde edilen sonuçlar, sıvı mikrodilüsyon ile elde edilen sonuçlardan 0.5-1 kat daha yüksek olduğu unutulmamalıdır^{50,52,53}. *S. aureus*' da vankomisine direnç için EUCAST sınır değeri MİK >2mg/L'dir. MİK'in >2mg/L olduğu (sıvı mikrodilüsyon ile) kesinleşen suşların referans laboratuvara gönderilmesi gerekir. MİK belirlenerek hVISA saptanamamaktadır⁵⁰.

VRSA, VISA ve hVISA saptamada kullanılan testler

hVISA'nın tespit edilmesi zordur, bundan dolayı saptama, tarama ve doğrulama olarak ayrılmıştır. Tarama için birkaç özgül test geliştirilmiştir. Doğrulama, suşun değişik vankomisin konsantrasyonu içeren bir dizi agar plağında popülasyon profili analizini yaparak (PAP-AUC) sağlanır^{50,54}. Bu yöntemi kullanmada yeterli tecrübesi

olmayanlarca yapılması zordur ve genellikle referans laboratuvarlarında yapılmaktadır. Vankomisin ve kazein tarama agarında uygulanan yöntemde yüksek duyarlılık ve özgülük saptanmış olup^{50,55}, sadece bir çalışmada değerlendirildiğinden henüz yöntem olarak önerilmesi mümkün değildir⁵⁰.

Makro gradiyent test

Azalmış vankomisin duyarlılığını ortaya koyar fakat saptanan sonuçlar MİK değeri değildir. Ayrıca, bu test hVISA, VISA ve VRSA'yı ayırdetmemektedir. Testin inokulumu (2.0 McFarland) standart gradiyent testlerinden daha yüksektir. Test Mueller Hinton agar yerine Brain Heart Infusion (BHI) da yapıp, 48 saat sonra okunmalıdır. Vankomisin ve teikoplanin için MİK ≥ 8 mg/L veya sadece teikoplanin için ≥ 12 mg/L, pozitif sonuç olarak kabul edilir. Her iki kriterde teikoplanin bulunduğu için vankomisin test edilmesi teikoplanin sonucuna dayanmaktadır⁵⁰.

Algoritma şu şekilde olmalıdır:

Teikoplanin sonucu ≥ 12 mg/L; VRSA, VISA veya hVISA

Teikoplanin sonucu 8mg/L; vankomisini test et. Eğer vankomisin sonucu ≥ 8 mg/L ise, o zaman VRSA, VISA veya hVISA.

Teikoplanin sonucu < 8 mg/L; VRSA, VISA veya hVISA değil⁵⁰.

Glikopeptid direncinin saptanması için gradient test (G-test)

G-test sonucu vankomisin veya teikoplanin için ≥ 8 mg/L ise test sonucu pozitifdir⁵⁰.

Teikoplanin tarama agarı

Teikoplanin içeriği 5mg/L olan Mueller Hinton agarı kullanılır^{50,56}. 2.0 McFarland standardına eşdeğer bulanıklık elde etmek için bakteri %0.9 serum fizyolojik içinde süspanse edilir. Agar yüzeyine 10 μ L inokulum damlatılır ve plak 24-48 saat 35 °C'da inkübasyona bırakılır. 48 saatte üreme olması glikopeptidlere azalmış duyarlılığa işaret eder⁵⁰.

hVISA/VISA için doğrulama testleri

Tarama testinde azalmış duyarlılık gösteren ve MİK testinde VRSA veya VISA olarak tanımlanmayan her suş hVISA olabilir. Bu suşlar referans laboratuvarında PAP-AUC testi ile araştırılmalıdır^{50,53}.

Koagülaz negatif stafilokoklar (KNS)

KNS ler içinde 32 tür mevcut olup, 15 tanesi (*S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis*, *S. schleiferi*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. cohnii*, *S. simulans*, *S. auricularis*, *S. xylosus*, *S. caprae*, *S. saccharolyticus*, *S. pasteurii*) insanda kolonize olabilmektedir. İnsanda en fazla patojen olanlar *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* tur. KNS'lar derinin normal flora elemanlarıdır. Deri vede mukozada en çok bulunanların *S. epidermidis* ve *S. hominis*'tir. Flora elemanı olmaları nedeni ile, enfeksiyon bölgesinden alınan örneklerde çoğunlukla kontaminan olarak gözlenirler²².

KNS' ler "Slime" adı verilen biofilm oluştururlar. Slime polisakkarit yapıdadır. Vücutta yabancı cisim olarak bulunan IV kanül, prostetik materyal KNS suşlarının oluşturduğu slime tabakasına yatak oluşturup, fagositozu engelleyip, slime tabakasının içerisine antimikrobiyal ajanların girmesini engelleyip, enfeksiyon oluşumuna yatkınlık sağlarlar²².

KNS' ların oluşturduğu enfeksiyonlar genellikle katater veya yabancı cisim ile ilişkilidir²².

Enterokok sepsisi

1899 yılında Fransa' da yayınlanmış bir yazıda intestinal kaynaklı Gram pozitif koklar 'enterocoque'olarak tanımlanmıştır. 1906'da endokarditli bir hastanın kanından izole edilen Gram pozitif bakteriye *Streptococcus faecalis* adı verilmiştir. 1919 yılındada *Streptococcus faecium* tanımlanmıştır²².

Son zamanlarda yapılan Deoksiribo nükleik asit (DNA)-DNA, DNA-ribozomal RNA (ribo nükleik asit) hibridizasyon çalışmaları neticesinde Streptococcus cinsine ait olmadıkları ortaya konmuştur. 1984 yılında Enterococcus sınıfı içerisinde 16 tür yer alacak şekilde sınıflandırılmışlardır. İnsanda en çok rastlanan türleri *E. faecalis* ve

E. faecium’dur. *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. durans*, *E. gallinorum*, *E. hirae*, *E. raffinosus*, *E. malodoratus*, *E. dispar*, *E. Mundtii*’de diğ er sık rastlanan türlerdir²².

Enterokoklar tek tek, ikili yada kısa zincir oluşturabilen, katalaz testi negatif olan Gram pozitif koklardır. Mikroskopik görünimleri *Streptococcus pneumoniae*’dan ayırt edilemez. Fakültatif anaerop bakterilerdendirler. Optimal üreme sıcaklıkları 35 °C olup 10-45°C arasındaki ısılarda çoğalabilirler. Eskülin ve L-pirolidol-â-naftilamid’i (PYR) hidroliz ederler. Kanlı agarda 24 saatlik inkübasyonun sonunda geniş beyaz koloniler oluştururlar. Koloniler hemolizsiz oluşu tipiktir²².

İnsan ve hayvan barsak florasında bulunurlar. Normal barsak florasının önemli bir kısmını Enterokoklar oluşturur. İnsan dışkısında en çok izole edilen türler sırası ile *E. faecalis* ve *E. faecium*’dur. Barsak florasının normal elemanları olduklarından Enterokok enfeksiyonları sıklıkla hastanın kendi florasından kaynaklanan endojen tipte olmaktadır²².

Enterokoklar, en sık görülen nozokomiyal patojenler arasında ikinci sıradadırlar. Enterokok bakteriyemisi hematolojik malignansilerde nadir bir komplikasyon olarak görülmektedir²².

Enterokok enfeksiyonlarının %60’ı nozokomiyaldir. Bu enfeksiyonların yarısı YBÜ’lerinde görülür. Tüm enterokok enfeksiyonlarının %80-90’ından *E. faecalis*, %5-10’undan *E. faecium* sorumludur²².

Enterokok suşları hastalar arasında, hastane içerisinde bir bölümden başka bir bölüme yayıldığına dair güçlü kanıtlar vardır. Nozokomiyal enfeksiyona sebep olan enterokok suşları sağlık personellerinin ellerinde ve çevrede bulunmaktadır²².

Enterokoklarda görülen glikopeptid direnç tipleri

Son dönemde vankomisine dirençli enterokoklar (VRE) sayılarındaki artışın sonucunda, direnç genlerinin kodladığı proteinlerin yapıları ve işlevleri daha kapsamlı şekilde araştırılmıştır. Vankomisine dirençli enterokoklar (VRE), direncin sadece vankomisine, vankomisin ile beraber teikoplanine dirençli olmasına, direncin indüklenebilir yada yapısal olmasına, diğ er bakterilere aktarılabilir olmasına göre sınıflandırılıp vanA’dan

vanG'ye kadar isimlendirilen yedi grupta incelenmiştir. En iyi bilinenleri vanA, vanB, vanC ve vanD tipleridir^{57.58.59}.

VanA direnç tipi

VRE'lerde en iyi bilinen direnç mekanizmasıdır. Vankomisin ve teikoplanine karşı oluşan yüksek dirence 39-40 kDa ağırlığındaki vanA proteinleri sebep olur. Dirence sebebiyet veren genler, sadece vankomisin varlığında sentezlenebilen ve hücre duvar sentezi için gerekli olan bir ligaz (vanA genince kodlanır), bir D-D-dipeptidaz (vanX genince kodlanır), ile bir D,D-karboksiptidaz'dır (vanY geni tarafından kodlanır). VanA fenotipi vankomisine (MİK: > 64-1000 µg/ml) ve teikoplanine (MİK: >16-512 µg/ml) yüksek düzeyde indüklenebilir dirence yol açar. Modifiye edilmiş hedef D-ala-D-lak'dır. Bu direnç gelişimi özellikle *E. faecalis*, *E. faecium* ve *E. avium*' da görülür. Yedi genden oluşan vanA gen kümesi plazmid DNA'ya entegre olmuş bir transpozon üzerindedir. Tn1546 adını alan 10.5 kb'lık bu transpozon, dört fonksiyonel grubun toplam dokuz polipeptidi kodladığı genetik materyaldir^{57.58.60}.

Bu transpozonu oluşturan ilk fonksiyonel grup, transpozisyonda görev alıp ters yönde transkripsiyona uğrayan iki açık okuma bölgesi olup ORF1 yapısal transpozazı , ORF2 bir rezolvazı kodlar. İkinci bölgede vankomisin direnc genlerinin regulasyonundan sorumlu vanR ve vanS genleri bulunur. Üçüncü fonksiyonel grupta, depsi-peptidlerin oluşumundan ve glikopeptid direncinden sorumlu genler (vanH, vanA, vanX) bulunur. Dördüncü fonksiyonel grupta vanY geni bulunur. vanX geni ile benzer özellik gösterir. Enterokoklarda vanA fenotipi içeren genetik yapılar benzerlik gösterip Tn 1546 ile taşınırlar. Kazanılmış direnç genleri plazmidler ve transpozonlar aracılığıyla diğer türlere kolayca aktarılır. Bunlar arasında en önemlisi vanA geni içeren vankomisine dirençli *Staphylococcus aureus* (VRSA) suşlarıdır^{57.61.62.63.64.65.66.67.68}.

Van B direnç tipi

Tn1547 transpozonunu üzerinde bulunan vanB geni tarafından sentezlenen, 39,5 kDa moleküler ağırlıklı vanB membran proteini ile oluşturulur. Vankomisin direnci orta düzeyde olup, vankomisine dirençli (MİK: 4-1000 µg/ml) ancak teikoplanine duyarlıdır (MİK: 0.5-1 g/ml). Modifiye edilmiş hedef Dala-D-lak'dır. İndüklenebilir, kazanılmış bir direnctir. *E. faecium* ve *E. faecalis* türlerinde görülür^{57.58}.

VanC direnç tipi

E. gallinarum (vanC-1), *E. casseliflavus* (vanC-2) , *E. flavescens* (vanC-3) izolatlarında bulunan düşük düzeyde vankomisin direnci olarak tanımlanır. Bu direnç tipinde vankomisin direncini kodlayan genler endojeniktir ve *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. flavescens* türlerine spesifik ligazlara sahiptir. Molekül büyüklüğü 38 kDa olan vanC membran proteinince oluşturulan, indüklenemez dirençtir tipidir. Modifiye edilmiş hedef D-ala D-ser'dir. Bütün suşlar yapısal olarak dirence sahip olmalarından ötürü intrinsik bir dirençtir ve direnç aktarımı sözkonusu değildir^{57,69}.

VanD direnç tipi

Sadece *E. faecium* türünde tespit edilmiştir. Orta düzey vankomisin direnci (MİK: 16-64 g/ml) ve düşük düzey teikoplanin direnci (MİK: 2-4 g/ml) mevcuttur. İndüklenebilir bir direnç tipidir. Oluşumundan vanD membran proteini sorumludur. Modifiye edilmiş hedef D-ala-D-lak'dır, vanA ve vanB operonları ile benzerlik gösterir^{57,70}.

Streptokoklar

Gram pozitif kok yada oval yapılı, hareketsiz, spor oluşturmeyen çiftler halinde bulunan, sıvı besiyerlerinde üretildiklerinde zincir oluşturan 2µm' den küçük bakterilerdir. Katalaz enzimi üretmezler. Türlerinin çoğu fakültatif anaeroptur. Üremeleri zor olduğundan kan veya serum ile zenginleştirilmiş besiyerlerinde üretilmelidirler. Kanlı agarda farklı hemolitik aktivite gösterirler. Kanlı agarda şeffaf zon oluşturacak şekilde hemoliz yapanlara beta hemolitik, yeşilimsi zon oluşturacak şekilde hemoliz yapanlara alfa hemolitik, hemoliz oluşturmayanlara ise gama hemolitik streptokok adı verilir. İnsanda enfeksiyon yapan streptokoklar için en iyi beta hemoliz %5 koyun kanlı agarda gözlenir⁷¹.

Streptokok cinsine ait türler 16S r RNA dizi analizine dayanılarak sınıflandırılan yedi gruba ayrılmıştır⁷¹.

Piyojenik grup

Bu gruptaki türler iyi tanımlana , kolay ayırt edilebilen, beta hemoliz özelliğine sahip türlerdir. *Streptococcus pyogenes*, *S. agalactiae* bu grupta en iyi bilinen patojenlerdir⁷¹.

Sanguinis grubu

S. sanguinis, *S. parasanguinis*, *S. gordonii* türleri bu gruptandır. Ağız forası üyeleridirler. Viridans streptokok enfeksiyonlarından sorumludurlar⁷¹.

Mitis grubu

S. pneumoniae, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. crista* bu grupta yer almaktadır. Genellikle ağız florası üyeleridir. *S. pneumoniae* insan enfeksiyonlarından sıklıkla izole edilen bir patojendir⁷¹.

Mutans grubu

Streptococcus mutans bu grupta yer alır. İlk kez 1924 yılında diş çürüklerinden izole edilmiş olup güçlü asidojen bir bakteridir. Kandan izole edilen viridans streptokokların büyük bir kısmı *S. mutans* suşlarıdır⁷¹.

Salivarius grubu

Gama hemoliz özellik gösteren, birbirleri ile genetik akrabalığı bulunan *S. salivarius*, *S. thermophilus*, *S. vestibularis* bu grubun üyeleridir⁷¹.

Anginosus grubu

S. anginosus, *S. constellatus*, *S. intermedius* bu grupta yer alırlar⁷¹.

Bovis grubu

S. bovis, *S. equinus*, *S. alactolyticus* bu gruba dahildir⁷¹.

3.GEREÇ ve YÖNTEM

Bu araştırma “Gram pozitif bakteri üremesi saptanan kan kültürlerinde genotiplendirme ile idendifikasyon ve direnç tayini” proje başlığı, 2017.04.01.618 proje numarası ile Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

3.1. Araştırma Tipi

Bu çalışmada Düzce Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi kliniklerinde tedavi gören hastaların Gram pozitif bakteri üremesi olan kan kültürü örneklerinin genotiplendirme yöntemi ile identifikasyon ve direnç tayini belirlenebilmesi amacıyla planlanan kesitsel tipte bir araştırmadır.

3.2. Örneklem

Düzce Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi kliniklerinde tedavi gören hastalardan 14.04.2018-26.1.2019 tarihleri arası test edilen 2132 kan kültüründen, ardışık iki veya daha fazla Gram pozitif üremesi olan 82 adedi çalışmaya dahil edilmiştir. 10 adet kan kültürü şişesi, genotiplendirme çalışması sonuçlandırılmadığından çalışmadan çıkarılmıştır.

3.3. Verilerin Toplanması

Çalışmaya dahil edilen kan kültürü örneklerinin alındığı hastalara ait sosyodemografik veriler, bakteri isimleri ve antibiyotik duyarlılıkları [metisilin/oksasilin (OX), sefoksitin (FOX), vankomisin (VA), teikoplanin (TEİ), siprofloksasin (CİP), gentamisin (GN), trimetoprim/sulfametoksazol (TMP-SXT)] çalışmacı tarafından hastane bilgi yönetim sisteminden alınmıştır.

3.4 Laboratuvar Analizleri

“Genotype® BC Gram positive Ver. 3.0 (Hain Lifescience Almanya) ” testi 17 farklı Gram pozitif bakteri türü (*Streptococcus anginosus / constellatus / intermedius / mutans / sanguinis*, *Streptococcus mitis / oralis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae ssp. equisimilis*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus simulans*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus*

gallinarum ve *Enterococcus casseliflavus*.) ile beraber metisilin (*mecA*) ve vankomisin (*vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2/C3*) direnç genlerini tespit edebilmektedir

Düzce Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Mikrobiyoloji laboratuvarında kan kültürü sistemi olarak BD BACTEC™ FX(ABD) kan kültür sistemi ve otomatik bakteri identifikasyon sistemi olarak [VITEK® 2 Compact (BioMérieux Fransa)] kullanılmıştır. Çalışmaya dahil edilen örneklerden GENO CARD (Hain Lifescience Almanya) ekstraksiyon kiti ile nükleik asit ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen ekstraksiyon ürünlerinin PCR amplifikasyon miksi (Tag Polimeraz, 10x Buffer (15mM MgCl₂), 25mM MgCl₂, H₂O) kullanılarak FlouoroCycler12 (Hain Lifescience, Almanya) cihazında PCR'ları yapılmıştır. PCR ürünlerinin, GenoType BC Gram pozitive VER 3.0 (Hain Lifescience Almanya) kiti kullanılarak TwinCubatör (Hain Lifescience Almanya) cihazında genotip testleri yapılmıştır.

3.5. Test Prosedürü

3.5.1. Çalışmada kullanılan kit ve malzemelerin listesi

DNA ekstraksiyon aşamasında kullanılan malzemelerin listesi

GENO CARD ekstraksiyon kiti

Delme matı

1,5 ml'lik DNA,RNA free eppendorf tüpü

5cc Steril enjektör

0-10µl, 1-100µl otomatik pipet

10µl, 100µl steril filtreli otomatik pipet ucu

0,1ml'lik steril eppendorf tüpü

Sınıf II biyogüvenlik kabini

% 99.8'lik Etanol

Etüv (38 °C' ye ayarlanmış)

Sodyum hipoklorit çözeltisi (% 3'lük)

PCR aşamasında kullanılan malzemelerin listesi

Taq DNA polimeraz 5U/μl 50μl (Qiagen Almanya)

PCR Amplifikasyon miksi (Hain Lifescience Almanya)

- PNM1 1,68ml x2

- PNM2 1,68ml x2

- 10x PCR Buffer 250μlx2

- 25 mM MgCl₂ solüsyonu 300μl x2

- H₂O 1ml

0,1ml steril eppendorf tüpü

0-10μl, 1-100μl otomatik pipet

10μl, 100μl steril filtreli otomatik pipet ucu

FlouroCycler12 Thermal Cycler cihazı (Hain Lifescience Almanya)

Hibridizasyon aşamasında kullanılan malzemelerin listesi

BC Gram pozitive VER 3.0 (Hain Lifescience Almanya) kiti

-DEN solüsyonu 960μl x4

-HYB Solüsyonu 96ml

-STR Solüsyonu 96ml

-CON-CSolüsyonu 960 μl

-CON-D Solüsyonu 96ml

-SUB-C Solüsyonu 960 μl

-SUB-D Solüsyonu 96ml

-RIN Solüsyonu 96ml x3

-Strip 96 adet

-Hibridizasyon küveti x3

TwinCubatör

0-10µl, 1-100µl, 100-1000µl otomatik pipet

10µl, 100µl, 1000µl steril filtreli otomatik pipet ucu

Sodyum hipoklorit çözeltisi (% 3'lük)

Distile su

Pens

3.5.2. DNA ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyon aşaması kontamine DNA içermeyen temiz bir çalışma alanında, aşağıda anlatılan protokol ile GENO CARD testi kullanılarak yapılmıştır.

1. Ekstraksiyon kartındaki yuvarlak numune alanının ortasında bir kan kültürü damlası

dikkatlice damlatılıp karşısındaki alanına örnek numarası yazılmıştır .

2. Kan kültürü örneğinin damlatıldığı ekstraksiyon kartı 15 dakika boyunca 38°C'lik sıcaklıktaki bir etüvde kurutulmuştur.

3. Delme matı, ucundaki koruyucu aparat çıkarılıp %3'lük sodyum hipoklorit çözeltisi ile dekontamine edildikten sonra ekstraksiyon kartının yan tarafında belirlenmiş alanından bir iki tane boş disk kesilip atılarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

4. Delme matını, kan kültürü örneği damlatılmış ve kurutulmuş olan ekstraksiyon kartına dik olarak yerleştirilip saat yönünde bastırıp döndürerek delme işlemi yapılmıştır.

5. Aparatın pistonuna basılarak disk 0,1ml 'lik PCR reaksiyon tüpüne aktarılmıştır. (Her örnek için iki disk kesilip iki farklı 0,1'lik eppendorf tüpüne aktarılmıştır.)

6. Delme aparatının ucunu dekontamine etmek için %3'lük sodyum hipoklorit çözeltisi ile silinip, numune alanının sağındaki oval alandan peş peşe 3 disk kesilip atılmıştır.

3.5.3. Multipleks amplifikasyon testi

Amplifikasyon mix' inin hazırlanması

Her örnek için iki farklı amplifikasyon miksi hazırlanmıştır. PNM1 içeren amplifikasyon miksi örnekten genotip tespiti, PNM2 içeren amplifikasyon miksi ise gen bölgelerinin tespit edilmesi için yapılmıştır. Bu iki amplifikasyon miksinin PCR reaksiyonları yapılmıştır. Amplifikasyon miksleri, DNA ekstraksiyonunun yapıldığı alandan farklı temiz bir alanda yapılmıştır. Amplifikasyon mikslerini buz üzerinde hızlı bir şekilde pipetleyerek, geciktirmeden FlouroCycler12 Thermal Cycler cihazına konulmuştur.

Amplifikasyon için, Qiagen Taq DNA Polimeraz kullanılmıştır. Bu enzimi kullanırken, örnek başına aşağıdaki miktarlar kullanılarak amplifikasyon miksi hazırlanmıştır..

- 35 µl PNM 1 ya da PNM 2
- 5 µl 10x PCR Tampon
- 2 µl 25 mM MgCl₂ solüsyonu
- 0.2 µl (1 U) Taq DNA Polimeraz
- 3 µl deiyonize steril su

Ekstraksiyondan elde edilen disklerin PCR reaksiyon tüpünün kenarlarına yapışıp yapışmadığı kontrol edilip, yapışanlar düzeltilmiştir.

Amplifikasyon protokolü

FlouroCycler12 Thermal Cycler cihazında aşağıdaki protokol tanımlanıp PCR testi yapılmıştır.

95°C, 5 dak. 1 döngü

95°C, 30 sn. }
58°C, 2 dak. } 10 döngü

95°C, 25 sn. }
53°C, 40 sn. } 20 döngü
70°C, 40 sn. }

8 dak. 70°C 1 döngü

Isıtma Hızı $\leq 2.2^{\circ}\text{C}$

3.5.4. Hibridizasyon

Hibridizasyona hazırlık

Çalışmaya başlamadan önce TwinCubator®' cihazının ısısı 45°C 'ye getirilmiştir. BC Gram pozitive kitinde bulunan HYB ve STR solüsyonları 38°C sıcaklığına getirilip homojenize edilmişlerdir. Kit içerisindeki diğer solüsyonların ısısı oda sıcaklığına getirilmiştir. Uygun hacimli steril tüpler kullanılarak kitin içerisindeki CON-C solüsyonu ile CON-D solüsyonu, çalışmada gerekli olacak miktarda 1/1000 oranında dilüe edilmiştir. Benzer şekilde SUB-C solüsyonu ile SUB-D solüsyonu 1/1000 oranında dilüe edilmiştir.

Hibridizasyon

1. Reaksiyon küvetinin kenarına $40\mu\text{l}$ denatürasyon sıvısı (DEN) pipetlenmiştir.
2. Reaksiyon küvetinin kenarına konulan DEN solüsyonunun içine $20\mu\text{l}$ PNB1 ile hazırlanmış PCR ürünü ve $20\mu\text{l}$ PNB2 ile hazırlanmış PCR ürünü pipetlenip, iyice karıştırılıp, oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilmiştir.karıştırılmıştır.
3. Reaksiyon küvetinin içine 1 ml hibridizasyon solüsyonu (HYB) ilave edilip iyice karıştırılmıştır.
4. Mavi renk ile işaretlenmiş kenarına numarası yazılan strip temiz bir pens yardımı ile renk işaretinin olduğu kenarından tutularak, renk işareti üstte olacak şekilde küvete yerleştirilmiştir.
5. Reaksiyon küveti TwinCubator'a yerleştirilip 45°C 'de 30 dakika çalkalanarak inkübe edilmiştir.
6. Hibridizasyon solüsyonu küvetten otomatik pipet kullanılarak tamamen aspire edilmiştir.
7. Reaksiyon küvetine 1 ml Stringent Yıkama Solüsyonu (STR) ilave edilip 45°C 'de 15 dakika çalkalanarak inkübe edilmiştir.
8. Stringent Yıkama Solüsyonu küvetten otomatik pipet kullanılarak hiç sıvı kalmayacak şekilde aspire edilmiştir.tamamen aspire edilmiştir.

9. Reaksiyon küvetine 1 ml Rinse solüsyonu (RIN) ile konulup oda ısısında 1 dakika boyunca stripler yıkanmıştır. Ardından RIN solüsyonu otomatik pipet kullanılarak aspire edilmiştir.

10. Reaksiyon küvetine 1 ml dilüe edilmiş conjugate solüsyonu konulup, stripler oda ısısında çalkalanarak 30 dakika inkübe edilmiştir. Ardından conjugate solüsyonu otomatik pipet kullanılarak aspire edilmiştir.

11. Reaksiyon küvetine 1 ml Rinse solüsyonu (RIN) konulup stripler oda ısısında çalkalanarak 1 dakika yıkanmıştır. Bu işlem 2 kez tekrarlanmıştır. Ardından 1 ml distile su ile 1 dakika yıkanmıştır. Yıkama işlemlerinden sonra sıvılar otomatik pipet kullanılarak tamamen boşlatılmıştır. Son yıkamadan sonra reaksiyon küvetinde hiç sıvı kalmamasına dikkat edilmiştir.

12. Reaksiyon küveti içindeki striplerin üzerine 1 ml 1/1000 oranında dilüe edilmiş substrat solusyonu eklenip oda ısısında ışıktan koruyarak ve çalkalamadan 5 dakika inkübe edilmiştir.

13. Stripler distile su ile iki kez peşpeşe yıkanıp aspire edilerek reaksiyon sonlandırılmıştır.

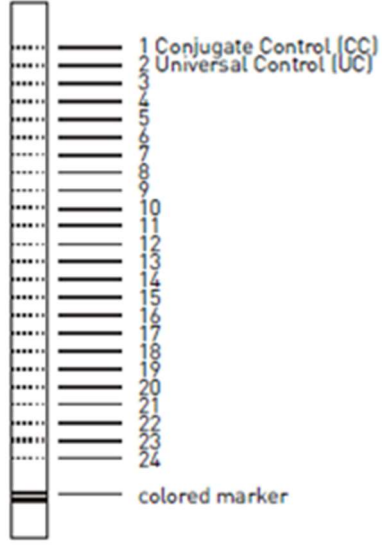
14. Stripler küvetten başka bir temiz pens ile çıkarılıp, kurutma kağıdının arasına konarak kurutulmuştur. Sonrasında temiz bir kağıdın üzerine selofan bant yardımı ile bant bölgeleri üste gelecek şekilde yapıştırılmıştır.

3.6. Sonuçların Değerlendirilmesi ve Yorumlanması

Beyaz kağıdın üzerine yapıştırılan stripler yorumlama tablosu üzerine yaklaştırılarak pozitif bant bölgelerinin karşılığına denk gelen bakteri genomu ve direnç genleri tespiti yapılmıştır. Yorumlama tablosu resim 2 de gösterilmiştir.

Her stripin üzerinde toplam 24 tane bant bölgesi mevcuttur. Bu bölgelerden birincisi olan konjugat kontrol bölgesi (CC), konjugatın stripe bağlanıp bağlanmadığını gösterir. İkinci bölge ise universal kontrol bölgesi (UC) olup, tüm bakteri türlerinde ortak olarak gözüken yüksek düzey bir DNA bölgesini tespit etmekte olup, bakteriyel DNA nın varlığını ortaya koyar. Stripin genel görünüşü resim 1 de gösterilmiştir

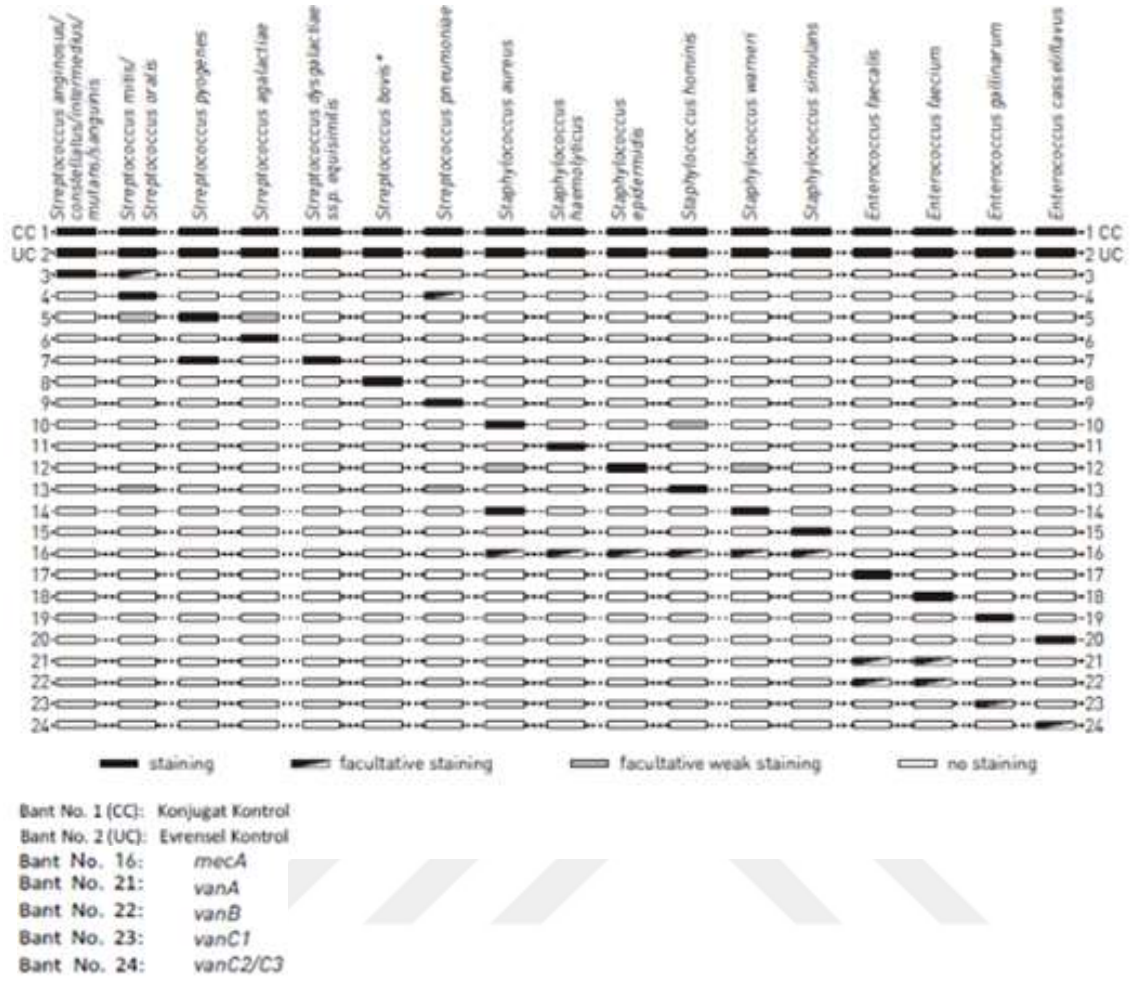
Resim 1. Çalışmada kullanılan strip



Not: Strip orijinal boyutta değildir.



Resim 2. Yorumlama Tablosu



3.7. İstatistiksel Analiz

Çalışmadaki tüm verilerin uygun tanımlayıcı istatistikleri hesaplanmıştır. Oranlar arası karşılaştırmalarda Ki-Kare ve Fisher Exact testleri kullanılmıştır. Test sonuçları arasındaki uyum Mc Nemar testi ile incelenmiştir. Bakteri türleri için uygulanan her bir test için sensitivite, spesifisite ve pozitif kestirim değerleri hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmaya, Düzce Üniversitesi Sağlık ve Uygulama Araştırma Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 14.04.2018-26.01.2019 tarihleri arasında gönderilen Gram pozitif bakteri üremesi olan 72 kan kültür örneği dahil edilmiştir.

Çalışmaya alınan örneklerin alındığı hastaların yaş ortanca değeri 72 (min:1 maks:91) olup, 36'sı (%50) kadın 36'sı (%50) erkek idi.

Çalışmaya alınan kan kültürü örneklerinin tamamı yoğun bakım ünitelerinden gönderilmiş olup, çalışmaya dahil edilen hastalarda tanımlanan bakteriler ve buldukları kliniklere göre dağılımı Tablo 1'de gösterilmiştir.

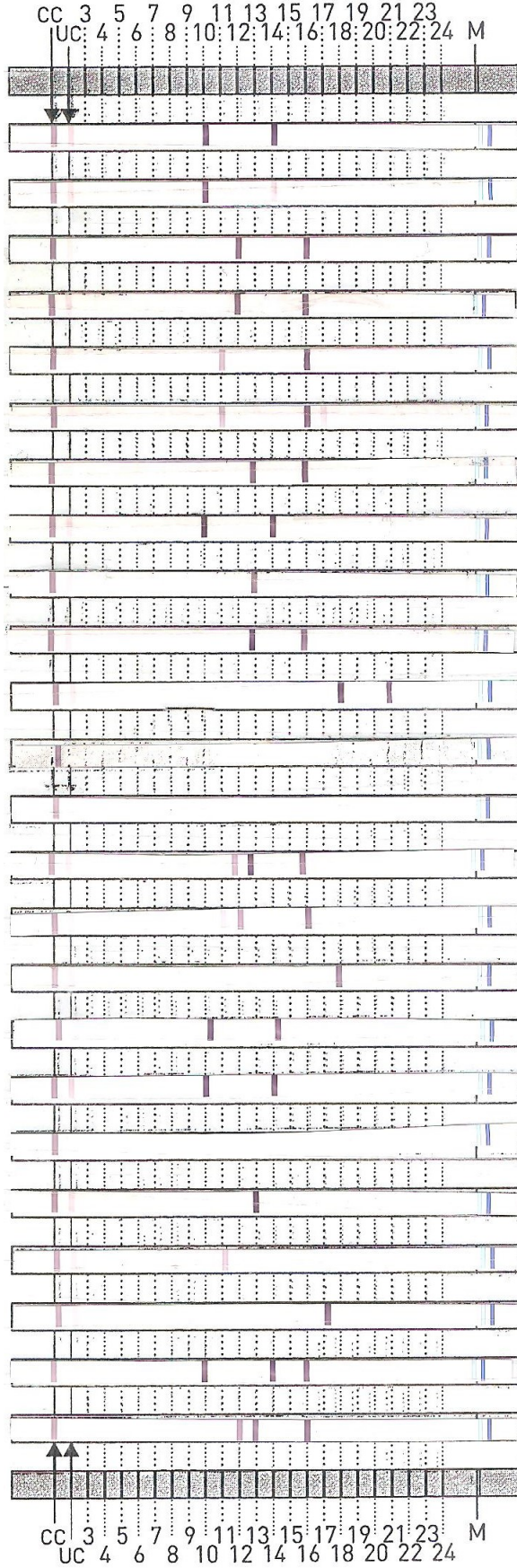
Tablo 1. Bakteri kültüründe tanımlanan bakteriler ve kliniklere göre dağılımı

Bakteri	DYB n	An.YB n	KVCYB n	KYB n	BCYB n	YDYB n	PYB n
KNS n: 45	29	8	2	4	2	0	1
<i>S.aureus</i> n: 17	7	3	5	1	0	1	0
<i>E. faecalis</i> n: 5	2	1	1	0	1	0	0
<i>E.faecium</i> n: 4	3	1	0	0	0	0	0
<i>S. grup D</i> n:1	1	0	0	0	0	0	0
Toplam n: 72	41 % 56,9	13 %18	8 %11,4	5 % 6,9	3 % 4,2	1 %1,3	1 %1,3

DYB:Dahiliye yoğun bakım, An.YB: Anestezi yoğun bakım, KVCYB: Kalp damar cerrahisi yoğun bakım, KYB: Koroner yoğun bakım, BCYB: Beyin cerrahi yoğun bakım, YDYB: Yenidoğan yoğun bakım, PYB: Pediatri yoğun bakım

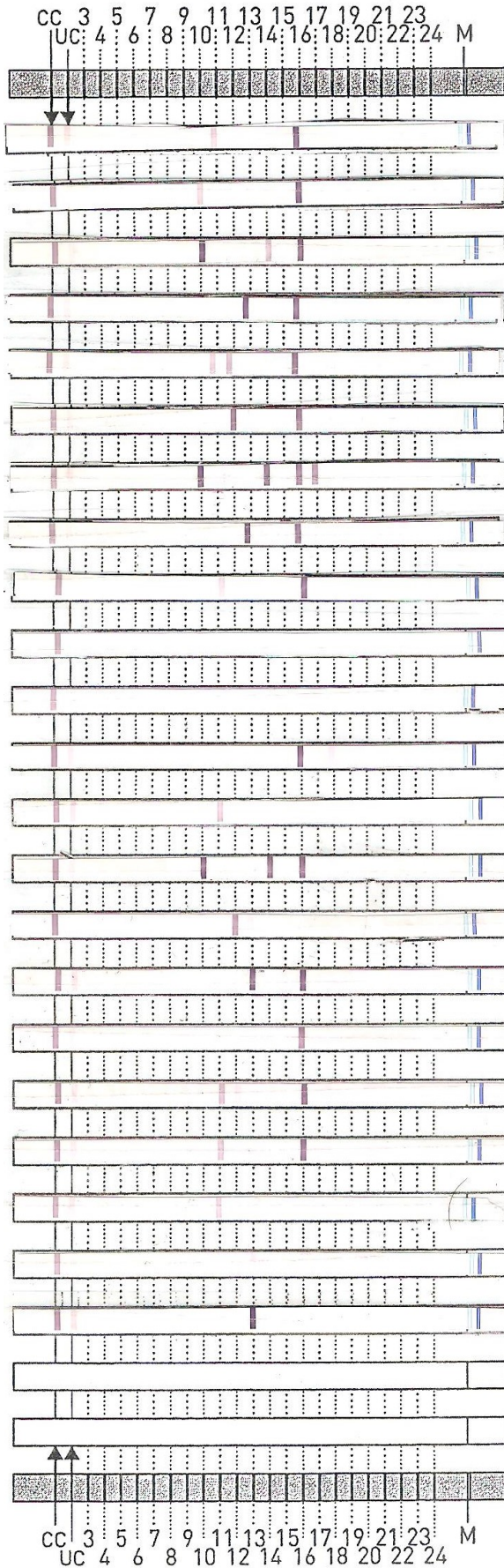
Genotipleme yöntemi ile belirlenen bakteri isimleri ve direnç durumları Resim 3a, 3b, 3c, 3d'de gösterilmiştir.

Resim 3a Genotiplendirme çalışmasındaki sonuçlar



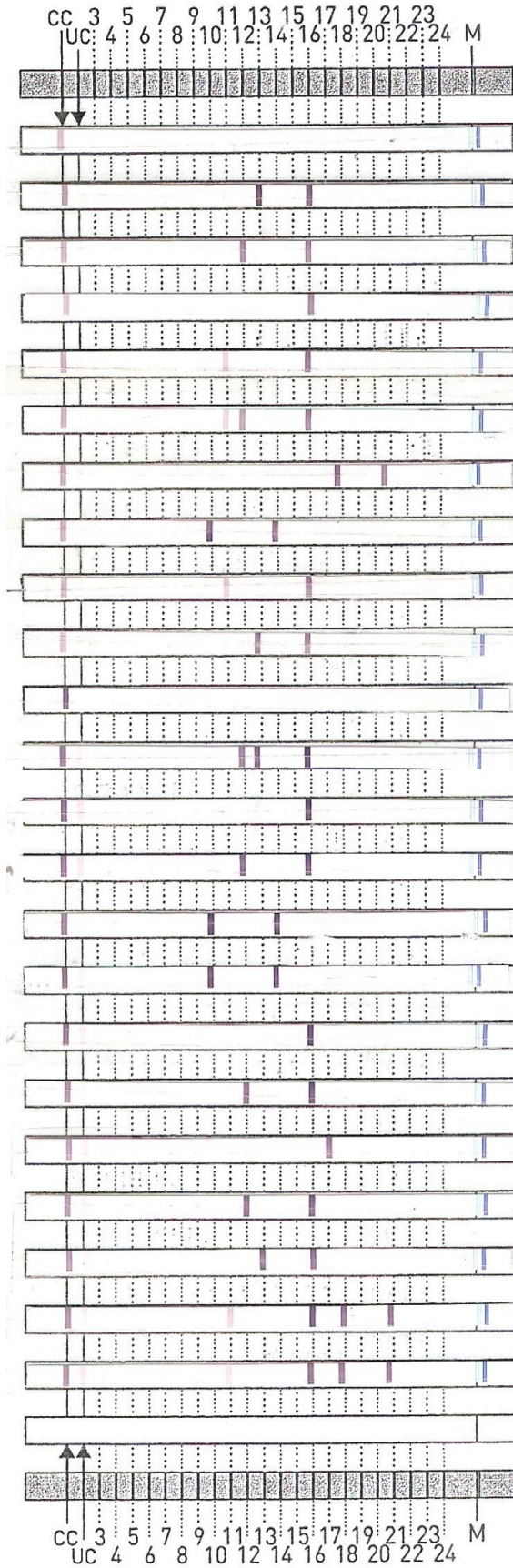
BAKTERİ ADI	DİRENÇ GENİ
<i>S. aureus</i>	
<i>S. aureus</i>	
KNS	Mec A
KNS	Mec A
KNS	Mec A
KNS + <i>E. faecalis</i>	
KNS	Mec A
<i>S. aureus</i>	MecA
KNS	
KNS	Mec A
<i>E. faecium</i>	Van A
NEGATİF KONTROL	
NEGATİF KONTROL	
KNS	Mec A
KNS	
<i>E. faecium</i>	
<i>S. aureus</i>	
<i>S. aureus</i>	
NEGATİF KONTROL	
KNS	
KNS	
<i>E. faecalis</i>	
<i>S. aureus</i>	Mec A
KNS + KNS	Mec A

Resim 3b Genotiplendirme çalışmasındaki sonuçlar



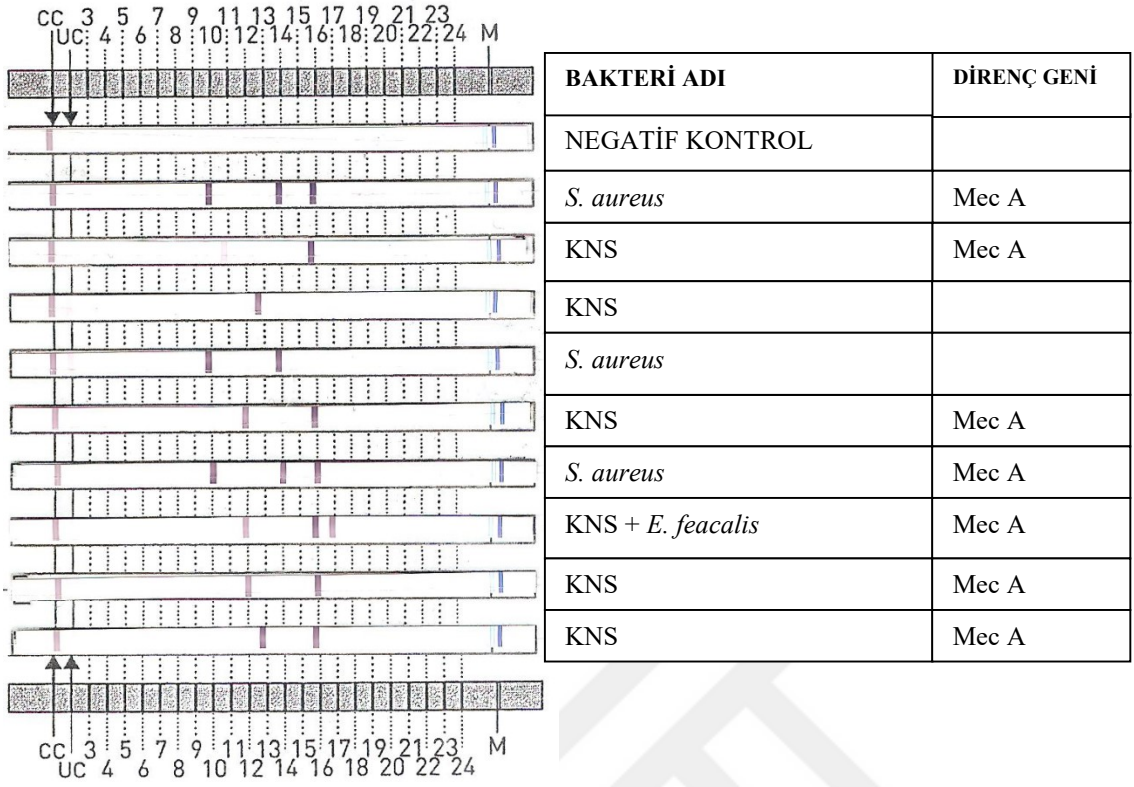
BAKTERİ ADI	DİRENÇ GENİ
KNS	Mec A
<i>S. aureus</i>	Mec A
<i>S. aureus</i>	Mec A
KNS	Mec A
KNS	Mec A
KNS	Mec A
<i>S. aureus</i> + <i>E. feacalis</i>	Mec A
KNS	Mec A
KNS	Mec A
NEGATİF KONTROL	
NEGATİF KONTROL	
KNS	Mec A
KNS	
<i>S. aureus</i>	Mec A
KNS	
KNS	Mec A
KNS	Mec A
KNS	Mec A
KNS	
KNS	
<i>S.mitis/oralis</i> + <i>S.pneumoniae</i>	
-	-
-	-

Resim 3c Genotiplendirme çalışmasındaki sonuçlar



BAKTERİ ADI	DİRENÇ GENİ
NEGATİF KONTROL	
KNS	Mec A
KNS	Mec A
KNS	Mec A
KNS	Mec A
KNS	Mec A
<i>E. faecium</i>	Van A
<i>S. aureus</i>	
KNS	Mec A
<i>S. aureus</i>	Mec A
NEGATİF KONTROL	
KNS+ <i>S.pneumoniae</i> + <i>S.mitis/oralis</i>	Mec A
KNS	Mec A
KNS	Mec A
<i>S. aureus</i>	
<i>S. aureus</i>	
KNS	Mec A
KNS	Mec A
<i>E. faecalis</i>	
KNS	Mec A
KNS	Mec A
KNS + <i>E. faecium</i>	Mec A+VanA
KNS + <i>E. faecium</i>	Mec A+VanA
-	-

Resim 3d Genotiplendirme çalışmasındaki sonuçlar



Bakteri kültüründe elde edilen veriler genotipleme sonuçları ile karşılaştırılarak incelenmiştir.

Tablo 2. Bakteri kültürü ve genotipleme sonuçlarının karşılaştırılması

Bakteri adı	Kültür		Genotip		p	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	PKD (%)
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif				
KNS	45	4	48	1	0,375	92	0	98
<i>S. aureus</i>	17	3	17	3	0,999	82	0	82
Enterococcus	9	3	10	2	0,999	70	0	70
<i>S. grup D</i>	1	0	0	1	-			
<i>S.pneumoniae</i>	0	2	2	0	-			
<i>S.mitis/oralis</i>	0	2	2	0	-			
Toplam	72	6	79	6	0,999	92	0	92

PKD: Pozitif Kestirim Değeri

Bakteri kültüründe toplam 45 tane KNS suşu tanımlanmışken, bu suşlardan 1 tanesi genotipleme ile KNS olarak değil *S. aureus* olarak tespit edilmiştir.

Genotipleme ile 48 KNS tespit edilmiştir. Bakteri kültürü ile tanımlanmış olan üç *S. aureus* ve bir *E. faecalis* genotipleme yöntemi ile KNS olarak tanımlanmıştır. İstatistiksel değerlendirmede; KNS'ler için bakteri kültürü ile genotipleme sonuçlarının anlamlı düzeyde uyumlu olduğu saptanmıştır ($p=0,375$). KNS'ler için bakteri kültürünün duyarlılık değeri %92 iken pozitif kestirim değeri %98 olarak tespit edilmiştir.

Bakteri kültüründe *S. aureus* olarak değerlendirilen 17 suşun genotipleme yöntemi ile 3 tanesi farklı bakteri olarak tespit edilmiştir. Bu üç suşun, ikisi KNS, biri ise KNS + *E. faecalis* olarak tanımlanmıştır. Ayrıca, genotipleme yöntemi ile saptanmış olan 17 *S. aureus* suşunun üçü (ikisi KNS, biri *E. faecalis*) bakteri kültüründe farklı bir bakteri olarak değerlendirilmiştir. İstatistiksel değerlendirmede; *S. aureus* türü için bakteri kültürü ile genotipleme sonuçları arasında anlamlı düzeyde bir uyum görülmüştür

($p=0,999$). *S. aureus* için bakteri kültürünün duyarlık değeri %82 iken, pozitif kestirim değeri %82 olarak saptanmıştır.

Bakteri kültüründe Enterococcus olarak değerlendirilen 9 suşun 2'si genotipleme yöntemi ile Staphylococcus olarak tanımlanmıştır. Öte yandan genotipleme yöntemi ile Enterokok olarak saptanmış 10 suşun üçünde bakteri kültüründe enterokok tespit edilememiştir. Bu bakterilerden birinde genotipte *E. faecalis* + KNS tespit edilmişken kültürde sadece KNS; bir tanesinde genotipte *E. faecium* + KNS saptanmışken, kültürde sadece KNS; bir tanesinde ise genotipte *E. faecalis* + KNS tespit edilmişken, kültürde sadece *S. aureus* bulunmuştur. İstatistiksel değerlendirmede; enterokoklar için bakteri kültürü ile genotipleme sonuçları arasında anlamlı düzeyde bir uyum olduğu görülmüştür ($p=0,999$). Enterokları saptamada kullanılan kültür testinin duyarlılık değeri %70 iken pozitif kestirim değeri %78 olarak bulunmuştur.

Bakteri kültüründe tespit edilen bir *Streptococcus grup D* suşu genotipleme yöntemi *Streptococcus mitis/oralis* + *Streptococcus pneumoniae* olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, bakteri kültüründe KNS olarak değerlendirilen bir örnekte genotipleme yöntemi ile KNS + *Streptococcus mitis/oralis* + *S. pneumoniae* olarak saptanmıştır. Bununla ilgili istatistiksel değerlendirme yapılmamıştır.

Yapılan istatistiksel değerlendirmede; tüm bakteri türleri için bakteri kültürü ile genotipleme yöntemleri arasında anlamlı düzeyde bir uyum vardır ($p=0,999$). Tüm bakteri türleri için bakteri kültür testinin duyarlılık değeri %92, pozitif kestirim değeri %92 ve doğruluk oranı %85 olarak bulunmuştur.

Kan kültürlerinden izole edilen bakterilerin antibiyotik direnç oranları Tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3. Bakteri kültürü/ antibiyogramı ile saptanan antibiyotik direnç oranları

Bakteri	Oksasilin		Vankomisin		Siprofloksasin		Gentamisin		TMP-SXT	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
KNS n:45	39	86,6	0	0	32	71,1	19	42,2	9	20
<i>S. aureus</i> n:17	9	52,9	0	0	4	23,5	6	35,2	2	11,7
<i>E. faecium</i> n:5	-	-	2	40	4	80	2	40	3	60
<i>E. faecalis</i> n:4	-	-	0	0	4	100	3	75	2	50

KNS' lerde antibiyotik (siprofloksasin, TMP-SXT ve gentamisin) direnç oranları incelendiğinde en düşük direnç oranı TMP-SXT' de saptanmıştır (p=0,001). *S. aureus*'da antibiyotik direnç oranları incelendiğinde ise siprofloksasin, TMP-SXT ve gentamisin duyarlılıklarının benzer olduğu görülmüştür (p=0,368). Enterokoklarda direnç oranları incelendiğinde en düşük direnç vankomisine karşı olduğu saptanmıştır. Ancak istatistiksel değerlendirme yapılamamıştır.

Bakteri kültüründe tespit edilen oksasilin dirençli stafilocok suşlarında genotipleme ile mecA geni varlığını araştırılması Tablo 4' de gösterilmiştir

Tablo 4. Stafilokoklarda oksasilin direnç oranlarına göre mecA geni varlığının incelenmesi

Bakteri Adı	MecA geni varlığı	Kültürde saptanan Oksasilin direnci	p
KNS n: 45	MecA (+)	35(%89.7)	0,125
	MecA (-)	4(%10.3)	
	Duyarlılık (%)	100	
	Özgüllük (%)	60	
	PKD (%)	90	
		Kültürde saptanan Oksasilin direnci	
		Toplam:39(%86.6)	
Bakteri Adı	MecA geni varlığı	Kültürde saptanan Oksasilin direnci	p
<i>S.aureus</i> n: 17	MecA (+)	9(%100)	0,999
	MecA (-)	0	
	Duyarlılık (%)	100	
	Özgüllük (%)	100	
	PKD (%)	100	

PKD: Pozitif Kestirim Değeri

Bakteri kültüründe tespit edilen 39 oksasilin dirençli KNS suşunun 35'inde genotipleme ile MecA geni saptanmıştır.

Genotipleme testinde saptanan 48 KNS suşunun 37'sinde mecA geni tespit edilmiştir. Bunlardan 35 tanesi bakteri kültür antibiyogram sonucu ile uyumludur. Bir tanesi bakteri kültüründe *E. faecalis* olarak bulunmuş olup metisilin direnci hakkında herhangi bir bilgi bulunmaktadır. Bu suş genotipleme ile mecA pozitif KNS olarak tiplendirilmiştir. Diğeri ise kültürde MRSA olarak tespit edilmiş olup genotiplemede mecA pozitif KNS olarak saptanmıştır. Bakteri kültüründe saptanan 17 *S. aureus* suşunun 9'u MRSA olarak değerlendirilmiştir.

Enterokoklarda glikopeptid direnç oranları ile vanA geni varlığı karşılaştırılmıştır.

Tablo 5. Enterokoklarda vanA geni varlığına göre glikopeptid direnç/duyarlılık oranlarının karşılaştırılması

Bakteri Adı	VanA Geni	Glikopeptid duyarlı	Glikopeptid dirençli
<i>E. faecalis</i> n:5	pozitif	0	0
	negatif	5	0
<i>E. faecium</i> n:5	pozitif	2	2
	negatif	1	0

Enterokoklardaki glikopeptid direnci incelendiğine, antibiyotik duyarlılık testlerinde vankomisin ve teikoplanin duyarlı olarak saptanan iki *E. faecium* suşunda vanA geni pozitif olarak bulunmuştur. İki *E. faecium* suşunda antibiyotik duyarlılık testinde vankomisin ve teikoplanin dirençli saptanıp vanA geni pozitif tespit edilmiştir. Bir *E. faecium* suşunda antibiyotik duyarlılık testinde vankomisin ve teikoplanin duyarlı bulunup vanA geni negatif saptanmıştır. Vankomisin ve teikoplanine duyarlı olarak saptanan beş *E. faecalis* suşunun tamamında ise vanA geni negatif olarak saptanmıştır. İstatistiksel değerlendirme yapılmamıştır.

Stafilokoklarda mecA geni pozitif saptanan suşlarla, mecA geni negatif saptanan suşların beta laktam grubu dışındaki antibiyotiklere olan direnç oranları incelendiğine, çalışmaya dahil edilen siprofloksasin, gentamisin ve TMP-SXT antibiyotiklerinin her birine direncin mecA geni pozitif olanlarda mecA geni negatif olanlardan anlamlı şekilde yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Stafilocoklardaki mecA geni varlığı ile antibiyotik direnç oranları karşılaştırılmıştır.

Tablo 6. Stafilokoklarda mecA geni varlığına göre antibiyotik direnç oranları

Bakteri Adı	MecA geni varlığı	Siprofloksasin dirençli suş sayısı n: 32	p	SXT dirençli suş sayısı n: 9	p	Gentamisin dirençli suş sayısı n:19	p
KNS n (45)	MecA (+)	30	<0,001	6	<0,001	16	<0,001
	MecA (-)	2		3		3	
Bakteri Adı	MecA geni varlığı	Siprofloksasin dirençli suş sayısı n: 4	p	SXT dirençli suş sayısı n:2	p	Gentamisin dirençli suş sayısı n:6	p
S.aureus n (17)	MecA (+)	4	<0,001	2	0,007	3	0,029
	MecA (-)	0		0		3	

KNS' lerde mecA geni pozitif olanlarda siprofloksasin direncinin mecA geni negatif olanlardan anlamlı şekilde yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,001$). mecA geni varlığı durumunda siprofloksasin direnç görülme oranı %100 bulunmuş iken mecA geni negatif olduğunda siprofloksasin direnç görülme oranı %13,3 olarak saptanmıştır.

KNS' lerde mecA geni pozitif olanlarda TMP-SXT direncinin mecA geni negatif olanlardan anlamlı şekilde yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,001$). mecA geni varlığı durumunda TMP-SXT direnç görülme oranı %100 bulunmuş iken mecA geni negatif olduğunda TMP-SXT direnç görülme oranı %7,7 olarak saptanmıştır.

KNS' lerde mecA geni pozitif olanlarda gentamisin direncinin mecA geni negatif olanlardan anlamlı şekilde yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,001$). mecA geni varlığı durumunda gentamisin direnç görülme oranı %100 bulunmuş iken mecA geni negatif olduğunda gentamisin direnç görülme oranı %10,3 olarak saptanmıştır.

S. aureus'larda MecA geni pozitif olanlarda siprofloksasin direncinin MecA geni negatif olanlardan anlamlı şekilde yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,001$). MecA geni varlığı durumunda siprofloksasin direnç görülme oranı %100 bulunmuş iken mecA geni negatif olduğunda siprofloksasin direnci görülmemiştir.

S. aureus'larda *mecA* geni pozitif olanlarda TMP-SXT direncinin *mecA* geni negatif olanlardan anlamlı şekilde yüksek olduğu görülmüştür ($p=0,007$). *mecA* geni varlığı durumunda TMP-SXT direnç görülme oranı %100 bulunmuş iken *mecA* geni negatif olduğunda TMP-SXT direnci görülmemiştir.

S. aureus'larda *mecA* geni pozitif olanlarda gentamisin direncinin *mecA* geni negatif olanlardan anlamlı şekilde yüksek olduğu görülmüştür ($p=0,029$). *mecA* geni varlığı durumunda gentamisin direnç görülme oranı %100 bulunmuş iken *mecA* geni negatif olduğunda gentamisin direnç görülme oranı %21,4 olarak saptanmıştır.



5. TARTIŞMA

Sepsis, enfeksiyona karşı konakta gelişen kontrolsüz enflamatuvar cevap ve bunun sonucu olarak organ yetmezliği ile seyreden bir sendromdur. Sepsisi tetikleyici enfeksiyonlara bakteriler, virüsler, mantarlar ve parazitler neden olabilir. Sepsiste en sık karşılaşılan tetikleyici enfeksiyonlar, bakteriyel enfeksiyonlardır. Sepsisin erken tanınması; hastanın durumu kötüleşip ölüme sonuçlanmadan önce tedavi edilmesi açısından çok önemlidir. Antimikrobiyal direnç, enfeksiyonun tedavisini ve sepsise dönüşmeden önlenmesini oldukça zorlaştırır⁷².

Sepsisin yıllık artış hızı son on yılda %5-13 kadardır^{73,74}. Toplum ve hastane kaynaklı sepsisler dünya genelinde her yıl 31 milyon vakaya ve 6 milyon ölüme neden olmaktadır. Dünya genelinde sağlık hizmetlerine ulaşabilen her on hastadan birinde sepsis özellikleri gösteren bir enfeksiyon gelişmektedir⁷³. Sepsisin hızlı tanısı ve tedavi edilmesi hayat kurtarıcıdır. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) kliniklerde gerçekleşen ölümlerinin yarısının nedeni sepsis kaynaklı olup, yıllık 24 milyar ABD dolarından fazla maliyete neden olmaktadır⁷³. Gelişmekte olan ülkelerde sepsis insidansı için yeterli veri bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalarda global sepsis insidansı 100binde 288, ağır sepsis insidansı 100 binde 148 olarak bildirilmektedir. Hastane mortalite oranları ise sepsis için %17 ve ağır sepsis için %26 kadardır⁷⁵.

Sepsis tanısı konduğu andan itibaren 60 dakika içerisinde antimikrobiyal tedaviye başlanması önerilmektedir. Patojeni tespit etmek amacı ile yapılacak kan kültürü alınması gibi işlemlerden ötürü yaşanacak gecikmenin en fazla 45 dakika olması gerekmektedir. Sepsis tedavisinde sadece kültür odaklı mikrobiyolojik analizler kullanıldığında klinik hekimlerin, mikrobiyolojik bakteri kültür sonuçlarını bekleyecek zamanı olmamaktadır⁷⁶. Sepsis tedavisinde saatlerin önemi çok büyüktür. Yapılan çalışmalarda sepsis düşünüldüğü an itibarı ile antibiyotik tedavisindeki her bir saatlik gecikme hastalarda %8,4 oranında mortaliteye sebep olmaktadır^{77,78,79}. Bu nedenle klinik hekimler sepsis tanısı koydukları hastaya bakteri kültür sonuçları çıkana kadar, etken olabilecek tüm bakteri patojenlerine etki edebilecek antibiyotikleri içeren en geniş antimikrobiyal tedaviyi ampirik olarak başlamak zorundadır. Bu yaklaşım sonucunda hem yüksek maliyetler ortaya çıkmakta hem de antimikrobiyal direnç gelişimine neden olmaktadır⁷⁹.

Sepsis tanısında kan kültürü “altın standart” olarak kabul edilmektedir^{79.80.81}. Bakteri ve mantarların üremesine olanak tanıyan, aynı zamanda antibiyotik duyarlılığın çalışılmasına imkan veren kan kültürü testi en önemli tanı ve doğrulama yöntemi olarak kullanılmaktadır⁸².

Modern kan kültürü sistemlerinde, kültür şişelerine yapılan ekimden sonraki birkaç gün içerisinde pozitif sinyal alınabilmektedir. Kültür şişesinin negatif olduğunun tespit edilebilmesi için minimum beş gün beklemek gerekmektedir. Sepsise neden olan mikroorganizmalar vakaların %90’ında otomatize kan kültürü sistemlerinde ilk 48 saat içerisinde pozitif sinyal vermektedir. Fakat kan kültürü şişesinde üreme sinyali veren mikroorganizmaların tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testlerinin yapılabilmesi için ek birkaç güne daha ihtiyaç duyulmaktadır. Bundan dolayı mevcut otomatize kan kültürü sistemleri erken tedavinin yapılmasına yeterince olanak sağlayamamaktadır^{83.84.85.86.87.88}.

Otomatize kan kültürü sistemlerindeki bu önemli dezavantaj sebebi ile moleküler tanı yöntemlerinin kullanımı gündeme gelmiştir. Bunlardan en pratik ve en çok kullanılanı PCR yöntemidir^{89.90}.

Yapılan literatür taramasında, çeşitli çalışmalarda kan kültürlerinde üreyen mikroorganizmaların, çeşitli moleküler yöntemler kullanılarak hızlı tanımlamaları yapıp direnç genleri ortaya konulmuştur. Kullanılan moleküler hızlı tanı yöntemlerinin klinik etkileri araştırılıp sonuçlara olan etkileri bildirilmiştir^{1.3.4.7.91.92.93.94.95.96.97}.

Carver ve arkadaşları, *S. aureus* bakteriyemisi olan hastaların kan kültürü örneklerinden mecA genini moleküler yöntemle 25,4 saat daha erken tespit edip bu durumun sonucunda antimikrobiyal tedaviye erken başlanıldığını ve mortalitenin düştüğünü belirtmişlerdir⁹¹. Kerremans ve arkadaşları, kan kültürlerinde üreyen bakterilerin hızlı tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıklarının hızlı tespiti neticesinde antibiyotik kullanım miktarının azaldığını, fakat bu durumun mortalite açısından herhangi azalmaya neden olmadığını bildirmişlerdir⁹². Forrest ve arkadaşları ise, Peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization (PNA FISH) yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada, hastane kökenli enterokokal bakteriyemili hastaların kan kültürlerinden Enterococcus türlerinin hızlı tespitinin ve bunun sonucunda antimikrobiyal tedaviye erkenden başlanmasıyla, hastanede kalış süresinin 4-6 gün kısaldığını, kontaminasyon nedeni olan bakterilerin erkenden tespit edilmesi neticesinde gereksiz vankomisin

kullanımının önüne geçildiğini belirtmişlerdir⁹³. Denys ve arkadaşları, Portre Staph ID / R BCP'nin moleküler yöntemini kullanarak yaptıkları çalışmada Gram pozitif üreme tespit edilen kan kültürü örneklerinden *Staphylococcus* türlerini ve *mecA* geninin varlığını iki saat içerisinde tespit etmişlerdir⁹⁴. Bunun sonucu olarak mortalitenin, gereksiz ampirik antibiyotik kullanımın ve sağlık bakım maliyetlerinin düşebileceğini ifade etmişlerdir⁹⁴. Bununla beraber kullanılan yöntem ile “Van” genlerinin tespit edilememesinin tedavi başarısının önünde en büyük engel olabileceğini belirtmişlerdir⁹⁴. Hazelton ve arkadaşları yaptıkları çalışmada Gram pozitif üremesi olan kan kültürü örneklerinden moleküler yöntem ile MSSA, MRSA, *Enterococcus* türlerini ve *mecA* gen bölgesini üç saatte saptayıp, kullanılan moleküler hızlı tanı yönteminin mortalite üzerinde azaltıcı etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir⁹⁵. Kılıç ve arkadaşları, Gram pozitif üremesi olan kan kültürü örneklerinden Bruker MALDI-TOF MS (ABD) (Matrix - assisted laser desorption/ionization time of flight Mass Spectrometry) sistemi ile *S. aureus* ve KNS'ları diğer yöntemlere kıyasla çok daha hızlı bir şekilde tanımlamışlardır⁹⁶.

Bu çalışmalarda, sepsisli hastaların kan kültürü örneklerinden bakteriyel patojenlerin ve bunlara ait antibiyotik dirençlerin hızlı tanısının hayati öneme sahip olduğu vurgulanmaktadır. Yüksek maliyete sahip olmalarına rağmen moleküler yöntemlerle sonuçların hızlı şekilde alınmasıyla başlayan uygun tedavi ile morbidite/mortalite de azalma, hasta yatış süresinin kısalması, hasta bakım maliyetlerinin düşmesi sağlanabildiği bildirilmektedir^{1,3,4,7,91-97}. Bu gereksinimden ötürü geliştirilen GenoType BC Gram positive testi 17 adet Gram pozitif bakteri türü ile beraber metisilin direnç geni olan *mecA*'yı, vankomisin direnç genleri olan *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3*'ü tespit edebilmektedir. Kan kültüründen pozitif sinyal alınıp Gram boyama yapıldıktan sonra 4-5 saat içerisinde sonuç verebilmektedir.

Yapılan literatür taramasında GenoType BC Gram positive(Hain Lifescience Almanya) testinin kullanıldığı dört çalışmaya ulaşılmıştır^{1,3,7,97}. Gülhan ve arkadaşları yaptıkları çalışmada; Phoenix PMIC/ID Panel ile fenotipik analizi yapılan 55 Gram pozitif üreme tespit edilen kan kültürü örneğinin 17'si *S. epidermidis* (tümü metisiline dirençli), dokuzu *S. aureus* (biri metisiline dirençli), 18'i *S. hominis* (10'u metisiline dirençli), dördü *E. faecalis*, üçü *E. faecium* (biri vankomisine dirençli), ikisi *S. saprophyticus* (biri metisiline dirençli), biri *S. warneri* ve biri *S. haemolyticus* olarak tanımlamışlardır¹. “Genotype® BC Gram positive” testi ile yaptıkları genotipik çalışmanın sonuçları

değerlendirdiklerinde, 46 (%83.6) örneğin Phoenix sistemi ile tam uyumlu olarak tanımlandığı izlenmiştir¹. Her iki yöntemle de elde ettikleri sonuçları karşılaştırdıklarında, Phoenix ile metisiline dirençli *S. hominis* olarak tanımlanan üç örnekte, Genotype® BC ile mecA geni varlığı ve *S. hominis*'e ek olarak *S. epidermidis* tespit etmişlerdir. Bir örnekte Phoenix ile metisiline duyarlı *S. hominis* sonucu alınmışken, Genotype® BC ile ek olarak mecA gen varlığı saptamışlardır¹. Phoenix ile *S. saprophyticus* olarak tanımladıkları iki örnek, Genotype® BC testi panelinde bu tür bulunmadığından tanımlama yapılamamış ayrıca bu suşlardan birini Phoenix ile metisiline duyarlı olarak tespit etmelerine rağmen Genotype® BC testinde mecA geni saptamışlardır¹. Phoenix ile metisiline duyarlı *S. haemolyticus* olarak tanımladıkları bir suş, Genotype® BC testinde de *S. haemolyticus* olarak tespit edilip ek olarak mecA pozitif olduğunu bulmuşlardır¹. Phoenix ile metisiline dirençli *S. epidermidis* olarak tanımladıkları örneklerden ikisinde de Genotype® BC testi ile *S. epidermidis*'in yanı sıra ikinci bir tür daha tespit etmişlerdir (*S. epidermidis*-*S. aureus*, *S. epidermidis*-*S. hominis*)¹. Sonuç olarak “Genotype® BC Gram-positive” testi ile önemli Gram pozitif sepsis patojenlerini, mecA ve van genlerini, pozitif kan kültürlerinden hızlı ve güvenilir bir şekilde saptandığını belirleyip, Gram pozitif koklara bağlı sepsisin hızlı tanısı ve tedavinin yönlendirilmesi açısından DNA strip teknolojisine dayalı bu testin rutin tanıda pratik olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir¹. Eigner ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, Bactec9240 (Becton Dickinson A.B.D) otomatize kan kültürü sisteminde Gram pozitif üreme tespit edilen 152 kan kültürü örneğinin VITEK® 2 Compact (BioMérieux Fransa) cihazı ile fenotipik inceleme yapıldıktan sonra, “Genotype® BC Gram-positive (Hain Life Science, Almanya)” testi ile genotipik analizlerini yapmışlardır. Analitik duyarlılığını belirlemek için, referans suşları (*S. aureus* ATCC 25923, *S. pneumoniae* ATCC 33400 ve *S. epidermidis* ATCC 35547) kan kültür şişelerine inoküle etmişler ve yaklaşık olarak 104 koloni oluşturan birim (cfu)/ml'nin tespit edilebildiğini bildirmişlerdir³. Çalışmada fenotipik olarak 53 *S. aureus*, 50 *S. epidermidis*, 25 diğer KNS'lar, 12 *S. pneumoniae*, yedi *E. faecalis* ve beş *E. faecium* olmak üzere 152 Gram pozitif kok izole etmişlerdir³. Genotype® BC Gram pozitive testi kullanılarak yapılan genotipik analizde, bu bakterilerin 148'inin fenotipik yöntemle uyumlu olarak tanımlandığı bildirilmiştir³. Fenotipik olarak metisilin direnci saptanan 13 *S. aureus* izolatının 12 sinde, mecA geninin varlığını genotipik olarak saptamışlardır³. Ayrıca fenotipik olarak metisilin direnci saptanan 38 KNS suşunun genotipik incelenmesinde 37 tanesinde mecA geninin varlığını tespit etmişlerdir.

Fenotipik olarak vankomisine ve teikoplanine dirençli olarak tanımlanan bir *E. faecium* izolatu genotipik olarak incelendiğinde de vanA genini saptamışlardır³. Mikroskopik analizden sonra genotipik çalışmanın dört saat sürdüğünü belirtmişlerdir³. Sonuç olarak araştırmacılar, bu testin hızlı ve güvenilir sonuçlar verdiğini, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kolayca kullanılabileceğini bildirmişlerdir³.

Prère ve arkadaşlarının yapmış olduğu araştırmada, BacT/ALERT (BioMérieux Fransa) otomatik kan kültürü sisteminde üreme sinyali veren, Gram boyama testinde Gram pozitif kokların tespit edildiği 25 kan kültürü örneğini, “Genotype® BC gram-positive (Hain Life Science, Almanya)” kiti ile test etmişlerdir⁷. Araştırmada *S. hominis*, *S. epidermidis* (mecA pozitif) *E. faecalis*, *S. dysgalactiae*, *S. bovis*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. faecium*, *S. epidermidis* ve *S. aureus* türlerini 4-5 saat gibi kısa bir sürede saptamışlardır⁷. Test panelinde olmadığı için bir tane *Staphylococcus capitis* suşu tespit edilememiş olup, Genotype® BC ile elde edilen diğer genotipik sonuçların, biyokimyasal testlerle ve antibiyotik duyarlılık testleriyle elde edilen fenotipik sonuçlarla uyumlu olduğunu bildirmişlerdir⁷.

Steindor ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, BacTAlert (bioMérieux Fransa) otomatik kan kültürü sistemini kullanan üç farklı merkezden üreme tespit edilen 296 kan kültürü şişesini çalışmaya dahil etmişlerdir⁹⁷. Pozitif kan kültürü örneklerini Gram boyama, konvansiyonel tanımlama ve antibiyotik duyarlılık testlerinden sonra GenoType BC testi ile analiz etmişlerdir⁹⁷. 118 *S. epidermidis* suşunun 105(%89)’i, 76 *S. aureus* suşunun 67(%88,2)’si, 30 *E. faecalis* suşunun 28(%93,3)’i, 18 *E. faecium* suşunun 18(%100)’i, 13 *S. pneumoniae* suşunun 13(%100)’ü, 12 *S. hominis* suşunun 10(%83,3)’u, 9 *S. haemolyticus* suşunun 7(%77,8)’si, 6 *S. warneri* suşunun 6(%100)’sı, 8 *S. mitis/oralis* suşunun 6(%75)’sı ve fenotipik olarak birer tane tespit edilen *Enterococcus gallinarum*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus mutans* türleri GenoType BC testi ile yapılan genotip testinde tespit edilmişlerdir⁹⁷. Ayrıca Stafilkoklarda konvansiyonel yöntemler ile tespit edilen toplam 54 metisilin dirençli suşun 52(%92,9) tanesinde mecA genini GenoType BC testi ile saptamışlardır⁹⁷. Yine Enterokok suşlarında konvansiyonel yöntemlerle tespit ettikleri 2 vankomisin/teikoplanin dirençli suşta GenoType BC testi ile yapılan analizde vanB geninin varlığını tespit etmişlerdir⁹⁷. Kan kültüründe pozitif sinyalin tespitinden 4 saat sonra GenoType BC testi ile hızlı ve doğru bir şekilde patojenin varlığını ve varsa

mecA ve van direnç genlerini tespit eden araştırmacılar, bu testi rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılabilecek bir test olarak bildirmişlerdir⁹⁷. Ayrıca testin otomatize hale getirilebileceğini belirtip, bu durumun testi daha cazip hale getirebileceğini belirtmişlerdir⁹⁷.

Gram pozitif üremesi olan kan kültürlerinden PCR gibi moleküler yöntemler ile genotip tayini ve direnç genlerinin tayini yapılırken karşılaşılan en önemli problemlerden biri, örnekte bulunan organik inhibitörler ile kan kültürü şişelerinin yapısında bulunan inorganik inhibitörlerin PCR testlerinin inhibe edilmesidir^{1,7,98,99,100,101,102,103,104}. Bu inhibitör faktörlerin kan kültürü şişesinde mevcut olan kömür tozları, sodyum polianetolesülfonik asit, asidik polisakkariler^{7,99,104}, insan plazmasında bulunan immünoglobulin G¹⁰² hemoglobin ve laktoferrin¹⁰³ olduğu belirtilmiştir. Prère ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada, BacTAlert (bioMérieux Fransa) otomatik kan kültürü şişelerinde mevcut olan kömür tozlarının bakteri üremesini inhibe ettiğini, ayrıca yine bu kömür tozları sebebi ile Gram boyamada bakterilerin görülemeyebileceğini bildirmiştir⁷. Fredricks ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada iki farklı otomatize kan kültürü sisteminden(BD Bactec, BacTAlert,) PCR inhibitörü olan sodyum polianetolesülfonik asiti (SPS) farklı moleküler yöntemlerle uzaklaştırmaya çalışmışlardır. SPS nin uzaklaştırıldığı kan kültürü şişelerinden yapılan genotipik araştırmada PCR inhibisyonunun devam ettiğini, BD Bactec kan kültürü şişelerinde BacTAlert kan kültürü şişelerine oranla inhibisyonun daha az olduğunu bildirmişlerdir⁹⁹. Al-Soud ve arkadaşları yaptıkları çalışmada insan plazmasındaki immünoglobulin G'yi tanısal PCR reaksiyonlarında inhibitör etkeni olarak tanımlamışlardır¹⁰². Yine Al-Soud ve arkadaşları yaptıkları çalışmada insan kan hücrelerinden saflaştırdıkları polipeptitleri N-terminal aminoasit dizilimi ve elektroforez yöntemi ile incelediklerinde hemoglobin ve laktoferrini PCR inhibitörü olarak bildirmişlerdir¹⁰³.

Yaptığımız çalışmada ise 72 kan kültürü örneğinde; bakteri kültüründe 45 tane KNS tespit edilmiştir. Bu suşlardan bir tanesi genotipleme ile *S. aureus* olarak bulunmuştur. Genotipleme ile 48 tane KNS tespit edilmiş olup bakteri kültüründe bunlardan bir tanesi *E. faecalis*, üç tanesi *S. aureus* olarak saptanmıştır.

Bakteri kültüründe 17 tane *S. aureus* bulunmuştur. Genotipleme yöntemi ile bunların iki tanesi KNS, bir tanesi ise KNS + *E. faecalis* olarak tespit edilmiştir. Genotipleme

yöntemi ile toplam 17 tane *S. aureus* saptanmış olup, kültürde bunların ikisi KNS, bir tanesi *E. faecalis* olarak bulunmuştur.

Bakteri kültüründe dokuz Enterokok türü saptanmıştır. Bunlardan biri genotipleme yöntemi ile KNS, bir diğeri *S. aureus* olarak tiplendirilmiştir. Öte yandan genotipleme testinde 10 tane Enterokok bulunmuş olup, kültürde iki tanesi KNS, bir tanesi *S. aureus* olarak saptanmıştır.

Bakteri kültüründe tespit edilen *Streptococcus grup D* suşu, genotipik incelemede *Streptococcus pneumoniae* + *Streptococcus mitis/oralis* olarak tiplendirilmiştir. Ayrıca bakteri kültüründe KNS olarak bulunan bir bakteri, genotipik incelemede KNS + *Streptococcus pneumoniae* + *Streptococcus mitis/oralis* olarak saptanmıştır(Tablo2). Çalışmamızda, sepsis etkenleri arasında önemli yeri olan *Streptococcus pneumoniae* ve *Streptococcus mitis/oralis* türlerini bakteri kültür yöntemleri ile (hem otomatik hem de konvansiyonel) tespit edilemediği fark edilmiştir. Ayrıca Enterokokların tespitinde de kültürün saptayamadığı, genotiplendirme ile saptanan üç suş olduğu fark edilmiştir. Burada örnek sayıları her ne kadar az da olsa, sepsis etkeni olarak pnömokok ve enterokokların tanımlanamadığı görülmüştür. Bu etkenler hastalar için çok önemli mortalite ve morbidite sebebi olabilmektedir. Bu nedenlerle gözden kaçabilen bu bakterilerin doğru tanımlanması ve direnç genlerinin erkenden saptanması, hem hastanın erken tedavisi hem de hastanede yayılımının önüne geçebilecektir. Çalışmamıza benzer olarak, Gülhan ve arkadaşları çalışmalarında, genotipleme ile buldukları sonuçların %83,6 oranında fenotip sonuçları ile uyumlu olduğunu, genotipleme ile mecA, vanA direnç genlerini saptayıp, bu yöntemin Gram pozitif koklara bağlı sepsisin hızlı tanısı ve tedavinin yönlendirilmesi açısından rutin tamda pratik olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir¹.

Bakteri kültüründe KNS bulunan bir örnekte genotipleme ile KNS + *E. faecalis*; *S. aureus* bulunan bir örnek KNS + *E. faecalis*, KNS bulunan bir suş KNS + *Streptococcus pneumoniae* + *Streptococcus mitis/oralis*, *Streptococcus grup D* bulunan bir suş *Streptococcus pneumoniae* + *Streptococcus mitis/oralis* olarak saptanmıştır. Bu bulgular ile genotipleme yönteminin mikس enfeksiyonları saptamada bakteri kültür yöntemlerinden daha hassas olduğu düşünülmüştür. Gülhan ve arkadaşları yaptıkları araştırmada benzer sonuçlar tespit etmiş olup, genotipleme yönteminin mikс enfeksiyonların saptanmasında daha hassas olduğunu belirtmişlerdir¹.

Yaptığımız çalışmada, stafilokoklar için, kültürde metisilin direnci ve genotipleme ile mecA geni varlığı saptanması yöntemleri uyumlu bulunmuştur. Ancak birkaç örnekte uyumsuz sonuçlar saptanmıştır. MecA geni tespiti metisilin direncini belirlemede altın standart olarak kabul edilmektedir^{79,80,81}. Genotipleme yöntemi, kültür yöntemine göre çok daha hızlıdır. Bakteri kültürü-antibiyoqram değerlendirme laboratuvar çalışmasının kişisel deneyim ve dikkati ile yakından ilişkilidir. Bu nedenle hataları minimize etmek için genotipleme ile mecA tespitinin daha sık kullanılabilmesi düşünülmüştür(Tablo4, Resim3). Literatür incelendiğinde ulaşılan 4 çalışmada stafilokoklarda kültürde metisilin direnci ve genotipleme ile mecA geni varlığı saptanması uyumlu bulunup, genotipleme yöntemi ile hızlıca mecA geninin tespit edilebileceğini bildirmişlerdir^{1,3,7,97}.

Çalışmamızda, enterokoklarda glikopeptid direnci ile van genleri incelendiğinde; glikopeptidlere duyarlı olarak saptanan iki *E. faecium* suşunda vanA geni pozitif olarak bulunmuştur. İki *E. faecium* suşunda antibiyotik duyarlılık testinde glikopeptid direnci saptanmış olup vanA geni pozitif tespit edilmiştir(Tablo5). Genotiplemede vanA geninin pozitif saptandığı iki suşta Vitek2 ve diğer konvansiyonel antibiyoqram yöntemlerle glikopeptid direnci tespit edilememiştir. VanA geninin varlığının glikopeptid direncinde altın standart olduğunu düşündüğümüzde genotipleme yönteminin bakteri kültür antibiyoqram yöntemlerine göre daha kolay ve hızlı bir şekilde direnci saptadığı görülmüştür. Böylece, glikopeptid direnci, kan kültürü şişesinden pozitif sinyal alınıp Gram boyama yapıldıktan 4-5 saat sonra tespit edilebildiğinden hastaya uygulanacak geniş spektrumlu ampirik antibiyotik tedavisi çok kısa sürecektir. Bu durumda gereksiz ilaç kullanımı ve buna bağlı oluşabilecek glikopeptid direncinin önüne geçilecektir. Bu durum morbidite/ mortaliteyi azaltabileceği gibi hasta bakım maliyetlerini de düşürecektir. Literatür incelendiğinde ulaşılan 4 çalışmada enterokoklarda genotipik ve fenotipik analizlerde uyum olduğunu saptamışlardır^{1,3,7,97}. Genotipleme yönteminin glikopeptid direncini ve Van genlerinin tespitinde kullanılabilmesi bildirilmiştir^{1,3,7,97}.

Glikopeptidlere duyarlı olarak saptandığı halde genotiplendirme testinde vanA geni pozitif iki *E. faecium* suşu tespit edilmiştir. Bilindiği gibi antibiyotik duyarlılık testi besiyerinin kalınlığı, uygun McFarland ayarının yapılması, değerlendiren kişinin tecrübesi ve dikkati ile yakından ilişkilidir. Bu nedenle önemli bir hata olarak görülen dirençli iken duyarlı sonuç verilmesi, genotiplendirme yöntemi kullanılarak önlenilebileceği görülmüştür.

Son yıllarda stafilokok bakteriyemisinde artış görülmektedir. Bu artışla beraber KNS ve *S. aureus* suşları kan kültürlerinden daha fazla izole edilmektedir. Bununla beraber stafilokoklarda giderek artan oranda görülen metisilin direnci tedavide ciddi sorunlara neden olmaktadır^{105,106}. Al ve arkadaşları yaptıkları çalışmada metisilin direnci tespit ettikleri 134 KNS suşunda, siprofloksasine dirençli olan suş sayısını 71(%53) bulup, metisilin direncine sahip KNS lerde(MRKNS) siprofloksasin direncini anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır¹⁰⁵. Gentamisin direncine sahip suş sayısını 64(%48) olarak saptamış, MRKNS' larda gentamisin direnci anlamlı derecede yüksek olduğunu bildirmişlerdir¹⁰⁵. Yine MRKNS'lerde TMP-SXT dirençli suş sayısını 101(%75) olarak tespit etmiş, MRKNS'lerdeki TMP-SXT direncini anlamlı derecede yüksek olduğunu saptamışlardır¹⁰⁵. Literatür tarandığında incelenen çalışmalarda MRSA ve MRKNS suşlarında çoklu antibiyotik dirençler bildirilmiştir^{107,108,109,110,111,112}. Kurutepe ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, kan kültürlerinden izole ettikleri hastane ve toplum kökenli MRSA suşlarını incelediklerinde; siprofloksasin %27.1 ve %17.5, gentamisin %24.7 ve %9.2, TMP-SXT %18.3 ve %8.7 olarak bildirmişlerdir¹¹¹. Çiftçi ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise, kan kültürü örneklerinden elde ettikleri 236 MRKNS suşundan 98(%42) sinde gentamisin direnci tespit edip anlamlı derecede yüksek olduğunu bildirmişlerdir¹¹². Yine kan kültürü örneklerinden elde ettikleri 236 MRKNS suşundan 47(%20) tanesinde TMP-SXT direnci mevcut olup metisilin direnci ile anlamlı derecede uyumlu olduğunu saptamışlardır¹¹².

Yaptığımız çalışmada; bakteri kültür testi ile KNS' larde antibiyotik (siprofloksasin, TMP-SXT ve gentamisin) direnç oranları incelendiğinde en düşük direnç oranı TMP-SXT' de saptanmıştır. *S. aureus*'da antibiyotik direnç oranları incelendiğinde ise siprofloksasin, TMP-SXT ve gentamisin duyarlılıklarının benzer olduğu görülmüştür. Stafilokoklarda mecA geni pozitif saptanan suşlarla, mecA geni negatif saptanan suşların beta laktam grubu dışındaki antibiyotiklere olan direnç oranları incelendiğine, çalışmaya dahil edilen siprofloksasin, gentamisin ve TMP-SXT antibiyotiklerinin her birine direncin mecA geni pozitif olanlarda mecA geni negatif olanlardan anlamlı şekilde yüksek olduğu görülmüştür(Tablo 6).

Yapılan bu çalışmada, başlangıçta çalışmaya dahil edilen 10 örnek GenoType BC Gram pozitive testi ile genotipik olarak incelendiğinde hiçbir sonuç alınamamıştır. Bakteri DNA varlığını gösteren UC bantı negatif bulunmuştur. Bu örnekler çalışma dışı bırakılmıştır. Bunun nedeninin insan kanında bulunan organik PCR inhibitörleri olan

hemoglobin, laktoferrin ve immünglobulin G ile kan kültürü şişelerinde bulunan inorganik PCR inhibitörü olan SPS'in olduğu düşünölmüştür. Bu nedenle sadece genotip testinin kullanılmasının da uygun bir yöntem olmayacağı düşünölmüştür. Sepsis gibi çok önemli sonuçlara yol açabilen enfeksiyonların tanısında kültür ve moleküler yöntemlerin birlikte kullanılmasının çok faydalı olacağı düşünölmüştür. Prère ve arkadaşları kan kültür şişelerinde bulunan kömür tozunun bakteri üremesini inhibe ettiğini söylemişlerdir⁷. Fredricks ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada, sodyum polianetole sülfonatu(SPS) inhibitör olarak saptadıklarını belirtmişlerdir⁹⁹. AL Soud ve arkadaşları immünoglobulin G ve laktoferini inhibitör olarak belirtmişlerdir^{102.103}.



6.SONUÇLAR

1. Genotipleme yöntemi sepsislere sık neden olan 17 Gram pozitif bakteri türünü,metisilin direncine neden olan mecA ve glikopeptid direncine neden olan van genlerini (vanA, vanB, vanC1, vanC2/C3) kan kültüründe üreme tespit edildikten 4-5 saat sonra tanımlayabilmektedir.
2. Genotipleme yöntemi, sepsislerde bakteri kültür yöntemi ile gözden kaçabilen mikis infeksiyon etkenlerini doğru ve hızlı şekilde tanımlayabilmektedir.
3. Etkenin ve direnç genlerinin hızlı tespit edilmesi, tedavinin erken ve doğru yapılmasını sağlar. Bu nedenle morbidite/mortalite oranları düşer, hasta yatış süresi kısılır. Böylece, tedavi başarısı artıp, maliyetin azalacağı düşünülmektedir.
4. Genotipleme yöntemi ile bakteri kültürü sonuçları çıkıncaya kadar hastalara uygulanan ampirik tedavi süresi kısılacığından, oluşabilecek metisilin ve glikopeptid dirençlerinin önüne de geçilmiş olacaktır.
5. Genotipleme yöntemi uygulaması kolay bir yöntem olup, klinik mikrobiyolojilaboratuvarı iş akış şemalarında otomatize edilip kullanılabilir bir yöntem olduğu düşünülmüştür.
6. MecA pozitif olan hastalarda gentamisin, siprofloksasin, trimetoprim-sulfametoksazol antibiyotiklerinin dirençli olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle ampirik tedavide bu antibiyotiklerin tercih edilmemeleri gerektiği düşünülmüştür.
7. Genotip testlerinin bu avantajlarının yanı sıra kandaki bazı inhibitörlerden etkilenebileceği akılda tutularak mutlaka bakteri kültür yöntemleri ile birlikte kullanılmasının gerektiği düşünülmüştür.

7.KAYNAKLAR

1. Gülhan B, Atmaca S, Özekinci T, Suay A. Evaluation of rapid genotype assay for the identification of Gram-positive cocci from blood cultures and detection of *mecA* and *van* genes. *Mikrobiyol Bul.* 2011; 45(4): 592-601.
2. Kempf VA, Tiberius K, Autenrieth IB. Fluorescent in situ hybridization allows rapid identification of microorganism in blood cultures. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(2): 830-838.
3. Eigner U, Weizenegger M, Fahr AM, Witte W. Evaluation of a rapid direct assay for identification of bacteria and the *mecA* and *van* genes from positive-testing blood cultures. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(10): 5256-5262.
4. DiGiovine B, Chenoweth C, Watts C, Higgins M. The attributable mortality and costs of primary nosocomial bloodstream infections in the intensive care unit. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 160(3): 976-981.
5. Doern GV, Vautour R, Gaudet M, Levy B. Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification. *J Clin Microbiol.* 1994; 32(7): 1757-1762.
6. Trenholme GM, Kaplan RL, Karakusis PH, Stine T, Fuhrer J, Landau W, Levin S. Clinical impact of rapid identification and susceptibility testing of bacterial blood culture isolates. *J Clin Microbiol.* 1989; 27(6): 1342-1345.
7. Prère MF, Baron O, Fayet O. Rapid identification of bacteria, *mecA* and *van* genes from blood cultures. *Pathol Biol (Paris)* 2007; 55(8-9): 375-377.
8. Minasyan H. Resuscitation and Emergency Medicine. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med.* 2019; 27(19): 3-22.
9. WHA adopts resolution on sepsis. Jena, Germany: Global sepsis alliance, 26 May 2017.
10. Lee CR, Lee JH, Park KS, Kim YB, Jeong BC, Lee SH. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Front Microbiol.* 2016; 7: 895.
11. Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: An update. *Drugs.* 2009; 69(12): 1555–1623.
12. Aygün G. Sepsis ve septik şok. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi No: 31. Kasım 2002; s. 131-140.

13. Doğanay M, MeŒe EA. Sepsis. İçinde: İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Willke A, Söyletir G, Doğanay M (Eds). 3. baskı. Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul 2008: s. 877-897.
14. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest. 1992; 101: 1644-1655.
15. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E , Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G; SCCM / ESICM / ACCP / ATS / SIS. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med. 2003; 31(4): 1250-1256.
16. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. N Engl J Med. 2003; 348: 1546-1554.
17. Arslan H, Gürdođan. K. Yoğun bakım ünitelerinde gözlenen hastane enfeksiyonları. Hastan İnfeks Derg. 1999; 3: 165-170.
18. Yosunkaya A, Tuncer S, Reisli R, Uzun S, Ökesli S. Reanimasyon ünitemizde 1999-2000 yılları arasında gözlenen hastane enfeksiyonları. Hastan İnfeks Derg. 2002; 6: 92-97.
19. Çetin ÇB, Turgut H, Kaleli İ, Yalçın AN, Orhan N. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Yoğun Bakım Ünitesinde nozokomiyal enfeksiyonlar. Hastan İnfeks Derg. 2002; 6: 98-101.
20. Weinstein MB, Reller LB, Murphy JR, Lichtenstein KA. The clinical significance of positive blood cultures: A comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adult. I. Laboratory and epidemiologic observation. Rev Infect Dis. 1983; 5: 54-70.
21. Bone RC. The pathogenesis of sepsis. Ann Intern Med. 1991; 115: 457-469.
22. Sümerkan B. *Streptococcus pneumoniae*, Durmaz G. Enterokoklar, Dündar V, Dündar D.Ö. Stafilokok enfeksiyonları. İçinde: İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Willke A, Söyletir G, Doğanay M (Eds). 3. baskı. Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul . 2008; s: 2051-2076.
23. Sancak B. *Staphylococcus aureus* and antibiotic resistance. Mikrobiyol Bul. 2011; 45(3): 565-576.
24. Culos KA, Cannon JP, Grim SA. Alternative agents to vancomycin for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. Am J Ther. 2011; 20(2): 200-212.

25. Ippolito G, Leone S, Lauria FN, Nicastrì E, Wenzel RP. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: The superbug. *Int J Infect Dis*. 2010; 14 Suppl 4: 7-11.
26. Stryjewski ME, Corey GR. New treatments for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Crit Care*. 2009; 15(5): 403-412.
27. Soriano A, Marco F, Martínez JA, et al. Influence of vancomycin minimum inhibitory concentration on the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2008; 46(2): 193-200.
28. Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect*. 2007; 13(3): 222-235.
29. Stefani S, Goglio A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Related infections and antibiotic resistance. *Int J Infect Dis*. 2010; 14 Suppl 4: 19-22.
30. Tsiodras S, Gold HS, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Wennersten C, Venkataraman L, Moellering RC, Ferraro MJ. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 2001; 358(9277): 207-208.
31. Mangili A, Bica I, Snyderman DR, Hamer DH. Daptomycin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis*. 2005; 40(7): 1058-1060.
32. Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol*. 2008; 8(6): 747-763.
33. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome (SCC) Elements (IWG-SCC). www.sccmeg.org
34. Lentino JR, Narita M, Yu VL. New antimicrobial agents as therapy for resistant Gram-positive cocci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008; 27(1): 3-15.
35. Hawkey PM. The growing burden of antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 62 Suppl 1: 1-9.
36. Shorr AF. Epidemiology of staphylococcal resistance. *Clin Infect Dis*. 2007; 45 Suppl 3: 171-176.
37. Rehm SJ, Tice A. *Staphylococcus aureus*: Methicillin-susceptible *S. aureus* to methicillin-resistant *S. aureus* and vancomycin-resistant *S. aureus*. *Clin Infect Dis*. 2010; 51 Suppl 2: 176-182.
38. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother*. 1997; 40(1): 135-136.

39. Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, Cruz C, Lancaster MV, Robinson-Dunn B, Tenover FC, Zervos MJ, Band JD, White E, Jarvis WR. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. N Engl J Med. 1999; 340(7): 493-501.
40. Ploy MC, Grelaud C, Martin C, de Lumley L, Denis F. First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. Lancet. 1998; 351(9110): 1212.
41. Hanaki H, Hososaka Y, Yanagisawa C, Otsuka Y, Nagasawa Z, Nakae T, Sunakawa K. Occurrence of vancomycin-intermediate-resistant *Staphylococcus aureus* in Japan. J Infect Chemother. 2007; 13(2): 118-121.
42. de Lassence A, Hidri N, Timsit JF, Joly-Guillou ML, Thiery G, Boyer A, Lable P, Blivet A, Kalinowski H, Martin Y, Lajonchere JP, Dreyfuss D. Control and outcome of a large outbreak of colonization and infection with glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. Clin Infect Dis. 2006; 42(2): 170-178.
43. Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: Resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. Clin Microbiol Rev. 2010; 23(1): 99-139.
44. van Hal SJ, Paterson DL. Systematic review and meta-analysis of the significance of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(1): 405-410.
45. Bell JM, Walters JD, Turnidge JD, Jones RN. hVISA's are common among vancomycin susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Report from SENTRY Asia-Pacific region. In: Program and Abstracts of the 46th Annual Meeting of the Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC); 2006, San Francisco. Washington DC: American Society for Microbiology; Abstract C2-1160.
46. Sancak B, Ercis S, Menemenlioglu D, Colakoglu S, Hasçelik G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin in a Turkish university hospital. J Antimicrob Chemother. 2005; 56(3): 519-522.
47. Gould IM. Clinical activity of anti-Gram-positive agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother. 2011; 66 Suppl 4: 17-21.
48. McAleese F, Wu SW, Sieradzki K, Dunman P, Murphy E, Projan S, Tomasz A. Overexpression of genes of the cell wall stimulon in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibiting vancomycin-intermediate-*S. aureus*-type resistance to vancomycin. J Bacteriol. 2006; 188(3): 1120-1133.

49. Cui L, Iwamoto A, Lian JQ, Neoh HM, Maruyama T, Horikawa Y, Hiramatsu K.. Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50(2): 428-438.
50. Giske GC, Martinez LM, Canton R, Stefani S, Skov R, Glupczynski Y, Nordmann P, Wootton M, Miragou V, Simonsen GS, Zemlickova H, Cohen –Stuart J, Gniadkowski M. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing .EUCAST Guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance, Version 2.0. Basel, Switzerland EUCAST; 2017.
51. Tenover FC, Weigel LM, Appelbaum PC, McDougal LK, Chaitram J, McAllister S, Clark N, Killgore G, O'Hara CM, Jevitt L, Patel JB, Bozdogan B. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate from a patient in Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48: 275-280.
52. Sader HS, Jones RN, Rossi KL, Rybak MJ. Occurrence of vancomycin tolerant and heterogeneous vancomycin resistant strains (hVISA) among *Staphylococcus aureus* causing bloodstream infections in nine USA hospitals. *Antimicrob Chemother*. 2009; 64: 1024-1028.
53. Holmes NE, Turnidge JD, Munckhof WJ, Robinson JO, Korman TM, O'Sullivan MV, Anderson TL, Roberts SA, Warren SJ, Gao W, Howden BP, Johnson PD. Vancomycin AUC/MIC ratio and 30-day mortality in patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57(4): 1654-1663.
54. Wootton M, Howe RA, Hillman R, Walsh TR, Bennett PM, MacGowan AP. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. *J Antimicrob Chemother*. 2001; 47: 399-403.
55. Satola SW, Farley MM, Anderson KF, Patel JB. Comparison of detection methods for heteroresistant vancomycin - Intermediate *Staphylococcus aureus*, with the population analysis profile method as the reference method. *J Clin Microbiol*. 2011; 49: 177–183.
56. Wootton M, MacGowan AP, Walsh TR, Howe RA. A multicenter study evaluating the current strategies for isolating *Staphylococcus aureus* strains with reduced susceptibility to glycopeptides. *J Clin Microbiol*. 2007; 45: 329-332.
57. Çöleri A, Çökmüş C. Molecular mechanisms of resistance to glycopeptide antibiotics in enterococcus species and modes of gene transfer. *Turk Hij Den Biyol Derg*. 2008; 65(2): 87-96.
58. Arthur M, and Courvalin P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993; 37: 1571-1593.

59. Simjee S. and Gill M.J. Gene transfer, gentamicin resistance and enterococci. *J Hospital Infect.* 1997; 36: 249-259.
60. Ligozzi M, Lo Cascio G, and Fontana R. VanA gene cluster in a vancomycin-resistant clinical isolate of *Bacillus circulans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(8): 2055-2059.
61. Leclercq R, Derlot E, Weber M, Duval J, Courvalin P. Transfrable vancomycin and teicoplanin resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1989; 33: 10-15.
62. Bozdogan B, Leclercq R. Plasmid-mediated coresistance to streptogramins and vancomycin in *Enterococcus faecium* HM103. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43: 2097-2098.
63. Handwerger S, Perlman DC, Altarac D, McAuliffe V. Concomitant high-level vancomycin and penicillin resistance in clinical isolates of enterococci. *Clinical Infect Dis.* 1992; 14: 655-661.
64. Lavery A, Rossney AS, Morrison D, Power A, and Keane CT. Incidence and detection of multi-drug-resistant enterococci in Dublin hospitals. *J. Med. Microbiol.* 1997; 46: 150-156.
65. Gutmann L, Al-Obeid S, Billot-Klein D, Guerrier ML, and Collatz E. Synergy and resistance to synergy between β -lactam antibiotics and glycopeptids against glycopeptide resistant strains of *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents and Chemother.* 1994; 38(4): 824-829.
66. Hanrahan J, Hoyen C, and Rice LB. Geographic distribution of a large mobile element that transfers ampicillin and vancomycin resistance between *Enterococcus faecium* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44: 1349-1351.
67. Tremlett CH, Brown DFJ, and Woodford N. Variation in structure and location of glycopeptide resistance elements among enterococci from a single patient. *J Clin Microbiol.* 1999; 37: 818-820.
68. Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin in United Nations, *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2002; 51(26): 565-567.
69. Vincent S, Knight RG, Green M, Sahm DF, Shlaes DM. Vancomycin susceptibility and identification of motile enterococci. *J Clin Microbiol.* 1991; 29: 2335-2337.
70. Perichon B., Casadewall B., Reynolds P. and Courvalin, P. Glycopeptide resistant *Enterococcus faecium* BM4416 is a VanD-Type strain with an impaired D-Alanine:D-Alanine Ligase. *Antimicrob. Agents Chemo.* 2000; 44: 1346-1348.

71. Söyletir G. Streptokokların genel özellikleri. İçinde: İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Willke A, Söyletir G, Doğanay M (Eds). 3. baskı. Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul . 2008; s: 2051-2076.
72. WHO Seventieth World Health Assembly, 26 May 2017
73. Global Sepsis Alliance. Misdiagnosed Sepsis now a global health priority for World Health Organization, 26 May 2017.
74. Reinhart K, Daniels R, Kisson N, O'Brien J, Machado FR, Jimenez E. GSA executive board and WSD executive board. The burden of sepsis-a call to action in support of World Sepsis Day 2013. *J Crit Care*. 2013; (4): 526-528.
75. Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK, Hartog CS, Tsaganos T, Schlattmann P, Angus DC, Reinhart K. International forum of acute care trialists. assessment of global Incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current estimates and limitations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 ; 193(3): 259-272.
76. Mancini N, Burioni R, Clementi M. Microbiological diagnosis of sepsis: The confounding effects of a Gold Standard. In: Mancini N. (Ed). *Sepsis: Diagnostic methods and protocols*. Springer Science+Business Media. New York. 2015: 1-5.
77. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, Suppes R, Feinstein D, Zaotti S, Taiberg L, Gurka D, Kumar A, Cheang M. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med*. 2006 ; 34(6): 1589-1596.
78. Cicek A, Kuzucu C, Durmaz B. Factors for interpreting blood culture results. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*. 2005; 12(4): 277-280.
79. Mancini N, Carletti S, Ghidoli N, Cichero P, Burioni R, Clementi M. The era of molecular and other non-culture-based methods in diagnosis of sepsis. *Clin Microbiol Rev*. 2010; 23(1): 235-251.
80. Mussap M, Molinari MP, Senno E, Gritti P, Soro B, Mannelli S, Fabris C. New diagnostic tools for neonatal sepsis: The role of a real-time polymerase chain reaction for the early detection and identification of bacterial and fungal species in blood samples. *J Chemother*. 2007; 19 Suppl2: 31-34.
81. Lehmann LE, Hunfeld KP, Emrich T, Haberhausen G, Wissing H, Hoeft A, Stüber F. A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Med Microbiol Immunol*. 2008; 197(3): 313-324.
82. Mylotte JM, Tayara A. Blood cultures: Clinical aspects and controversies. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2000; 19(3): 157-163.
83. Başustaoğlu A(Ed.). *Kan kültürü uygulama kılavuzu*. Ankara. 2013.

84. NHS. UK Standards for Microbiology Investigations Investigation of Blood Cultures (for Organisms other than mycobacterium species) B37. Issue No: 8 2014
85. Bauer M, Reinhart K. Molecular diagnostics of sepsis: Where are we today? Int J Med Microbiol. 2010; 300(6): 411-413.
86. Dinç F. Sepsis tanısında kan kültürü ve multipleks real time PCR'ın tanısal performansı .2013, Uludağ Üniversitesi , Uzmanlık Tezi, 83 Sayfa, Bursa, (Prof. Dr. E. Halis AKALIN).
87. Dursun V. Sepsis ön tanısı olan hastalarda multipleks real-time polimeraz zincir reaksiyonu testinin etkeni saptamadaki yeri. 2014, Dokuz Eylül Üniversitesi, Uzmanlık Tezi, 92 sayfa, İzmir , (Prof. Dr. Ayşe YÜCE).
88. Yertut B. Sepsis tanısında yeni moleküler yöntemlerin kullanılması. 2012, Gaziantep Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 71 sayfa, Gaziantep, (Doç. Dr. Yasemin ZER).
89. Wolcott MJ. Advances in nucleic acid-based detection methods. Clin Microbiol Rev. 1992; 5(4): 370-386.
90. Domingues L(Ed.). PCR Methods and protocols. Springer Science + Business Media LLC. 2017: p.1620.
91. Carver PL, Lin SW, DePestel DD, Newton DW. Impact of mecA gene testing and intervention by infectious disease clinical pharmacists on time to optimal antimicrobial therapy for *Staphylococcus aureus* bacteremia at a university hospital. J Clin Microbiol. 2008; 46(7): 2381-2383.
92. Kerremans JJ, Verboom P, Stijnen T, Hakkaart van Roijen L , Goessens W , Verbrugh HA , Vos MC. Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing reduce antibiotic use and accelerate pathogen-directed antibiotic use. J Antimicrob Chemother. 2008; 61(2): 428-435.
93. Forrest GN, Roghmann MC, Toombs LS, Johnson JK , Haftalar E , Lincalis DP , Venezia RA . Peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization for hospital-acquired enterococcal bacteremia: Delivering earlier effective antimicrobial therapy. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52(10): 3558-3563.
94. Denys GA, Collazo-Velez V, Young S, Daly JA, Couturier MR, Faron ML, Buchan BW, Ledebor N. Multicenter evaluation of the Portrait Staph ID/R blood culture panel for rapid identification of staphylococci and detection of the mecA gene. J Clin Microbiol. 2017; 55(4): 1140-1146.
95. Hazelton BJ, Thomas LC, Unver T, Iredell JR. Rapid identification of Gram-positive pathogens and their resistance genes from positive blood culture broth using a multiplex tandem RT-PCR assay. J Med Microbiol. 2013; 62(2): 223-231.

96. Kilic A, Baysallar M. Identification of staphylococci directly from positive blood culture bottles by MALDI-TOF MS system. *Mikrobiyol Bul.* 2014; 48(3): 377-384.
97. Steindor M, Weizenegger M, Harrison N, Hirschl AM, Schweickert B, Göbel UB, Mackenzie CR. Use of a commercial PCR-based line blot method for identification of bacterial pathogens and the *mecA* and *van* genes from BacTAlert blood culture bottles. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(1): 157-159.
98. Louie L, Goodfellow J, Mathieu P, Glatt A, Louie M, Simor AE. Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci from blood culture bottles by using a multiplex PCR assay. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(8): 2786-2790.
99. Fredricks DN, Relman DA. Improved amplification of microbial DNA from blood cultures by removal of the PCR inhibitor sodium polyanetholesulfonate. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(10): 2810-2816.
100. Wilke A, Sayan M, Meriç M, Mutlu B. Early detection of methicillin resistance by Real-Time PCR in staphylococci isolated from blood cultures. *Mikrobiyol Bul.* 2012; 46(4): 671-675.
101. Sayan M, Meriç M, Celebi S, Willke A. Elimination of PCR inhibitors in routine diagnostic real-time PCR assay and results of internal amplification control. *Mikrobiyol Bul.* 2009; 43(1): 179-181.
102. Al-Soud WA, Jönsson LJ, Radström P. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(1): 345-350.
103. Al-Soud WA, Radström P. Purification and characterization of PCR inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(2): 485-493.
104. Monteiro L, Bonnemaïson D, Vekris A, Petry KG, Bonnet J, Vidal R, Cabrita J, Mégraud F. Complex polysaccharides as PCR inhibitors in feces: *Helicobacter pylori* model. *J. Clin. Microbiol.* 1997; 35: 995-998.
105. Al FD, Akça G, Sipahi B, Sultan N. Evaluation of antimicrobial resistance in staphylococcal species isolated from blood cultures. *ANKEM Derg.* 2005; 19(1): 14-16.
106. Doğanay M: Sepsis. İçinde: İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Willke A, Söyletir G, Doğanay M (Eds), 2. baskı. Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul. 2002; s: 621-636.
107. Decousser JW, Pina P, Picot F, Delalande C, Pangon B, Courvalin P, Allouch P, ColBVH Study Group. Frequency of isolation and antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infections: A French prospective national survey. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 51(5): 1213-1222.

108. Fluit AC, Jones ME, Schmitz FJ, Acar J, Gupta R, Verhoef J. Antimicrobial susceptibility and frequency of occurrence of clinical blood isolates in Europe from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997 and 1998. *Clin Infect Dis.* 2000; 30(3): 454-460.
109. Köksal F, Samastı M. Kan kültürlerinden izole edilen stafilokoklarda antibiyotik direnci. *ANKEM Derg.* 2002; 16(1): 10-13.
110. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Performance standards for antimicrobial susceptibility/testing, fifteenth informational supplement, M100-S1. Wayne 2005.
111. Kurutepe S, Sürücüođlu S, Özbakkalođlu B, Gazi H, Teker A. Antibiotic resistance rate of methicillin-resistant and –susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *Turkish Journal of Infection.* 2007; 21(4): 187-191.
112. Çiftçi N, Dağı HT, Demircan A, Tuncer İ. Identification and antibiotic resistance rates of coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures. *ANKEM Derg.* 2016; 30(1): 7-11.

8.ÖZGEÇMİŞ

Bindokuzyüzyetmişyedi yılında Trabzon ili Of ilçesinde doğdum. İlk okulu Uğurlu İlkokulu'nda, orta okulu Uğurlu Ortaokulu'nda okudum. Lise eğitimimi Trabzon Fatih Lisesi'nde 1994' te tamamladım. 1999 yılında Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümü'den lisans diplomamı aldım. 15.12.2000 yılında Düzce Tıp Fakültesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Biyolog olarak göreve başladım. Halen bu görevde çalışmaktayım. Evliyim , Selin ve Hazal adında iki kızım var.

