

***Staphylococcus aureus* Ve Koagülaz Negatif
Stafilokokların Ayrımında Yeni Bir Kimyasal Ayracın
Etkinliğinin Araştırılması**

Proje No: 211T113

Prof.Dr.Çağrı ERĐİN
Prof.Dr.Yaşar GÖK
Prof.Dr.İlknur KALELİ

EKİM 2012
DENİZLİ

Önsöz

Staphylococcus aureus çoğul antibiyotik direnci ile hayatı tehdit eden enfeksiyonlar oluşturabilen önemli hastane enfeksiyon etkenidir. Mikrobiyolojik tanısında *Micrococcaceae* familyasında bulunan diğer stafilokoklardan ve normal flora elemanlarından ayrımı zorunludur. Bu durum özellikle hastadan yapılan izolasyonlarda tedavi protokollerinin uygulanmasına ve hastane enfeksiyonlarının kontrolüne imkan sağlamaktadır. Tanısal mikrobiyoloji alanında *S.aureus*'u diğer stafilokoklardan ayıran en sık kullanılan pratik yöntem koagülaz testidir. Bu nedenle *S.aureus* dışındaki stafilokoklar "koagülaz negatif stafilokok" olarak adlandırılmaktadır. Stafilokokların değerlendirmesinde ilk basamak olan koagülaz testi görsel bir değerlendirmedir ve otomatize tanımlama sistemlerine uygun değildir.

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında, Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Anorganik Kimya biriminde sentez edilen farklı bileşikler tanısal mikrobiyoloji alanında sürekli araştırmaya alınmaktadır. Bu araştırmaların ön sonucunda ilk defa sentez edilerek, kimya literatüründe yayınlanan 1,2-dinitro-4,5-bis(2-kloretoksi)benzenin *S.aureus*'u koagülaz negatif stafilokoklardan hem görsel hem de spektrofotometrik değerlendirme ile ayırabildiği görülmüştür.

Sunulan araştırma; 1,2-dinitro-4,5-bis(2-kloretoksi)benzenin farklı *S.aureus* ve koagülaz negatif stafilokokların in-vitro ortamda ayırım amacıyla kullanılabilirliğini sorgulamaktadır. Bu araştırma TÜBİTAK tarafından 211T113 no.lu proje olarak desteklenmiştir.

İçindekiler	Sayfa
Tablolar dizini	4
Şekiller dizini	4
Özet	5
Abstract	5
1. Giriş	6
2. Genel Bilgiler	6
3. Gereç ve Yöntem	8
3.1 Pam-6 sentezi ve saflaştırılması	8
3.2 Çalışma kökenleri	8
3.3 Pam-6 deneyleri	10
3.3.1 Disk testleri	10
3.3.2 Tüp testleri	10
3.3.3 Spektrofotometrik testler	11
4. Bulgular	14
4.1 Disk testleri sonuçları	14
4.2 Tüp testleri sonuçları	15
4.2 Spektrofotometrik testlerin sonuçları	15
5. Tartışma ve Sonuç	19
6. Kaynaklar	21
7. Ekler dizini	23
8. Proje Özet Bilgi Formu	24

Tablolar Dizini:	Sayfa
Tablo 1: Disk testinde Pam-6 bileşigi ile araştışıcıların kökenleri gruplayabilme oranları	14
Tablo 2: Araştışıcıların Pam-6 bileşigi disk testi ile KNS ayırım yapabilme oranları	14
Tablo 3: Tüp testinde Pam-6 bileşigi ile araştışıcıların kökenleri gruplayabilme oranları	15
Tablo 4: Araştışıcıların Pam-6 bileşigi tüp testi ile KNS ayırım yapabilme oranları	15
Tablo 5: Pam-6 testinin KNS ve <i>S.aureus</i> kökenlerini ayırma etkinliği ($p<0.001$).	16
Tablo 6: <i>S.aureus</i> kökenlerinin farklı KNS gruplarından Pam-6 ile ayırımının değerlendirilmesi	18
Tablo 7: Standart KNS kökenlerinin <i>S.aureus</i> ATCC 25923 kökenine göre oran değerleri	18
Şekiller dizini:	
Şekil 1: 1,2-dinitro-4,5-bis(2-kloretoxi)benzen yapısı	8
Şekil 2: Klinik koagülaz negatif stafilokokların tanımlanmasında kullanılan algoritma	9
Şekil 3: Disk difüzyon testi ile (a) "pozitif" ve (b) "negatif" reaksiyon	10
Şekil 4: Tüp testi ile (a) "pozitif" ve (b) "negatif" reaksiyon	11
Şekil 5: Farklı hacimlerde Pam-6 reaksiyonu (İlk tüp 200 µL, ikinci tüp 100 µL, üçüncü tüp 50 µL)	11
Şekil 6: <i>S.aureus</i> ve KNS kökenlerinde süre ile absorbans değerlerinde değişimin incelenmesi	
(a) Verilerin zamana bağlı dağılımı;	12
(b) Verilerin 2. dereceden türev grafiği	12
Şekil 7: Pam-6 maddesinin 630 nm referans filtreye göre spektrofotometrik analizi	13
Şekil 8: KNS ve <i>S.aureus</i> kökenlerinin Pam-6 test sonuçlarında ROC eğrisi. ("cut-off" $=0.72$)	16
Şekil 9: KNS ve <i>S.aureus</i> bakterilerinin spektrofotometrik değerlendirmede ayırımı	16
Şekil 10: Farklı KNS kökenlerinin Pam-6 ile reaksiyonu sonucunda elde edilen spektrofotometrik oran değerleri	17

Özet

Staphylococcus aureus hayatı tehdit eden infeksiyonlara neden olabilen bakterilerdir. *S.aureus*'un daha düşük enfeksiyon potansiyeli taşıyan koagülaz negatif Stafilokok (KNS)'lardan hızlı ve doğru ayrımı gereklidir. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında koagülaz testi geleneksel yöntemlerle manuel olarak çalışılmaktadır. Stafilokokların tanımlanmasında koagülaz testinin yerini alabilecek, otomatize sistemlere uygun farklı kimyasallar, klinik mikrobiyoloji laboratuvarının daha efektif sonuç vermesini sağlayabilecektir.

Sunulan araştırmada, Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Anorganik Kimya biriminde sentezlenen 1,2-dinitro-4,5-bis(2-kloretoksi)benzen bileşiğinin *S.aureus* ve KNS kökenleri ile meydana getirdiği renk değişimi, hızlı ayırmada kullanılabileceği hipotezi ile ölçülerek araştırılmıştır.

Sonuç olarak, 1,2-dinitro-4,5-bis(2-kloretoksi)benzen bileşiği *S.aureus* kökenlerini KNS kökenlerden ayırmada kullanılabilmeyle birlikte, reaksiyonun beklenen sonuçları ayırmada zayıftır. Pam-6 disk difüzyon, tüp reaksiyonu ve spektrofotometrik değerlendirme, otomatize sistemlerde koagülaz testi yanında, sık görülen *S.epidermidis*, *S.haemolyticus* ve *S.warneri* gibi kan akımı enfeksiyonu etkenlerinin tanımlanmasında yardımcı hızlı test olarak kullanılabilir. Bu sonucun geçerli olabilmesi için, klinik mikrobiyoloji laboratuvarları arasında korelasyon araştırmaları planlamalıdır.

Anahtar kelimeler: *Staphylococcus aureus*, koagülaz negatif stafilokok, 1,2-dinitro-4,5-bis(2-kloretoksi)benzen, spektrofotometrik ölçüm

Abstract

Staphylococcus aureus is a bacterium that may causes life-threatening infection. Fast and accurate definition are required for identification between *S.aureus* and coagulase negative staphylococci (CNS). In clinical microbiology laboratories, coagulase procedure is tested by conventionally manual. For effective clinical microbiology laboratories' identification of staphylococcal definition, different chemicals that usable in automated identification systems, should be tested for using instead of coagulase test.

In this study, colorimetric reactions of 1,2-dinitro-4,5-bis(2-kloretoksi)benzen, that is synthesized in Pamukkale University, Faculty of Science, Department of Chemistry, inorganic branch, structure with *S.aureus* and CNS have been evaluated for fast and accurate differantiation in staphylococci.

As result, although 1,2-dinitro-4,5-bis(2-kloretoksi)benzen is spectrophotometrically effective for differentiation between *S.aureus* and CNS, reaction is weak for discrimination of expected results. Disc diffusion, tube reaction and spectrophotometric evaluation of 1,2-dinitro-4,5-bis(2-kloretoksi)benzen may be additional test for fast evaluation of common agents of bloodstream infections such as *S.epidermidis*, *S.haemolyticus* ve *S.warneri*. For accuracy of these result, inter-clinical microbiology laboratories correlations further research should be planned.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative staphylococcus, 1,2-dinitro-4,5-bis(2-kloretoksi)benzen, spectrophotometrically evaluation

1. Giriş

Staphylococcus aureus ve koagülaz negatif stafilkoklar (KNS) hem hastane hem de toplum kökenli enfeksiyonlara neden olan, ilaç direnci taşıyan ve tıbben önemli enfeksiyonlara yol açan bakterilerdir (STYERS, 2006). Tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarında *S.aureus*'un tanısının hızlı konması ve antibiyotik direncinin belirlenmesi, hastaya uygulanacak tedaviyi ve hastane enfeksiyonları sürveyans programlarının verimli çalışması bakımından önemlidir. Günümüzde bakterinin tanımlanmasına yönelik olarak fizyolojik (biyokimyasal reaksiyonlar, üreme ısısı ve ortamı, vb.), moleküler (PCR, vb.) ve kimyasal analiz (FTIR-spektroskopi, MALDI-TOF, vb) yöntemleri ile tanı hızlandırılmaya ve kesin olarak tanımlanmaya çalışılmaktadır. Günümüzde henüz yeni olan yöntemlerin laboratuvarlara maliyetlerinin yüksek olması, bazı yöntemlerdeki teknik ve analitik kısıtlamalar konu üzerinde deneyimli eleman gerektirmektedir. *S.aureus*'un diğer KNS bakterilerden tanısal ayrımının hem hasta sağlığına hem de ekonomik kayıpların (tedavi maliyeti, vb.) önlenmesine yönelik doğru ve hızlı yöntemler halen araştırılmakta, rutin laboratuvarlarda kullanılabilecek teknikler geliştirilmeye çalışılmaktadır.

Sunulan raporda; laboratuvar ortamında sentez edilen kromojen makrosiklik bir yapının, in-vitro olarak *S.aureus* ve KNS bakterilerin ayrımında kullanılabilirliğini değerlendirmektedir.

2. Genel Bilgiler

S.aureus ve KNS bakterilerine bağlı enfeksiyonlar antibiyotik direnci taşıyabilmeleri, hayatı tehdit eden enfeksiyonlara yol açan virülans faktörlerinin bulunması, hastanede kalış süresini uzatarak maliyeti arttırmaları vb. nedenlerle güncelliğini sürekli devam ettiren bakterilerdir (STYERS, 2006). ABD'de toplum kökenli enfeksiyonlarda ilk sırada, hastane kaynaklı enfeksiyonlarda ikinci sırada iken, ülkemizde farklı merkezlerde yapılan çalışmalarda, ilk sıralardaki enfeksiyon etkenleri arasında yer almaktadırlar (DEMİRDAL T, 2007; DOĞRU, 2010; ÇELEBİ, 2007; ERDEM, 2009; ERDİNÇ, 2006).

Micrococcaceae familyasında yer alan *S.aureus* ve KNS'ların tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarında tanılarının hızlı ve doğru olarak yapılabilmesi; hastaya tedavi yaklaşımı, kanıta dayalı enfeksiyon kontrol programı uygulamaları ve antibiyotik dirençli kökenlerin takibi için gereklidir. Dünya'da özellikle metisilin dirençli *S.aureus* (MRSA) enfeksiyonlarında hızlı ve doğru tanı, tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarının önemli bir görevidir (HALPIN, 2011; SHEPHERD, 2009). *S.aureus*, MRSA ve KNS'ların tanımlanabilmesi ve birbirlerinden ayrımı için rutin kullanıma yönelik manuel ve otomatize yöntemler bulunmaktadır. Bu yöntemler, tek bir yöntemin farklı uygulamalarının kombinasyonu (farklı moleküler uygulamaların birlikte kullanımı vb), farklı yöntemlerin birlikte kullanımı ile oluşan hibrit yöntemler olabileceği gibi tamamen yeni ve güncel yöntemlere (nanoteknoloji, floresans bağlanmış mikroçip vb) dayalı da olabilmektedir (SHEPHERD, 2009; WHITE, 2009; ROSENFELD, 1986; TABAQCHALI, 1987; BEAUME, 2011; LOONEN, 2011; HENSLEY, 2009; BARROS, 2007; ELSHOLZ, 2006; TRATTNER, 2004; DONAY, 2004; CAIÉRÃO, 2006). Aynı zamanda halen ticari olarak kullanılmakta olan otomatize tanımlama sistemlerinin tanımlama algoritmalarının geliştirilmesi de otomatize sistemlerde tanımlamaların doğruluğunu arttırmak bir kullanılabilen diğer bir yöntemdir (KANEMİTSU, 2005; CHATZİGEORGİOU, 2010). Bu

ayırımları başarılı bir şekilde yapabilen teknik ve uygulamaların oluşturulması ile birlikte maliyet, özel ekipman ve personel ihtiyacı gibi parametreler, bu yeni önerilen yöntemlerin tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarında yaygınlaşmasına engel oluşturabilmektedir.

Zaman ve personel kazancına bağlı olarak laboratuvarların otomatik sistemleri kullanma istekleri, kullanılmakta olan sistemlerin sorgulanmasını gündeme getirmiştir. Özellikle *S.aureus* ve KNS'in tanımlanmasına yönelik BioMérieux (Marcy-l'Etoile, Fransa) firmasına ait Vitek 2 ve API ID32 STAPH, Trek diagnostics (Cleveland, Ohio, ABD) firmasına ait Sensititre GPID, Becton Dickinson Diagnostic Systems (Sparks, Maryland, ABD) firmasına ait Phoenix ve Crystal sistemleri ile Dade Behring (West Sacramento, California, ABD) firmasına ait MicroScan tanımlama sistemleri yaygın olarak kullanılan otomatize sistemlerdir. Bu sistemlerin hepsinin farklı algoritması bulunmaktadır. Bu nedenle rutin araştırmalar ile elde edilen sonuçlar sorgulanmakta, sistemlerin sonuçları hakkında karşılaştırmalı değerlendirmeler yapılmaktadır. Kolorimetrik reaksiyon, fluorojenik ışımaya, düşük inokulum yoğunluğu vb gibi farklılıklar üretici firmalar tarafından farklı algoritmalarla yazılımlarla değerlendirilmektedir. Bu sistemler ile son yıllarda yapılan araştırmalarda KNS'lerin tanımlanması arasında uyum olduğu bildirilmekle birlikte genetik tanımlama ile uygun olmayan sonuçların da bulunabildiğini belirtmektedir (CHATZIGEORGIOU, 2010; LAYER, 2006; KIM, 2008; GARZA-GONZÁLEZ, 2010; DELMAS, 2008). Bu sistemlerin ayrımcılık gücü farklı genotipik karakterlere sahip olan aynı tür kökenlerde aynı reaksiyona neden olan parametrelerden kaynaklanmaktadır. Bu sistemlerde başarılı tanı için bakteriler arasında ayırım gücü yüksek testler bulunmalıdır.

Micrococcaceae üyelerinin tanımlamalarının yapıldığı laboratuvarlarda sorunlar çoğunlukla KNS'lerin enfeksiyon etkeni olabilen türlerinin doğru tanımlanmamasından kaynaklanmaktadır. Son yıllarda hasta profilindeki değişiklikler, özellikle bağışıklığı baskılanmış hasta sayısındaki artış ve protez kullanımının yaygınlaşması, *S.epidermidis*, *S.haemolyticus*, *S.lugdunensis* *S.hominis* ve *S.cohnii* gibi KNS türlerinin enfeksiyonlarının yaygınlaşmasına neden olmaktadır (CHATZIGEORGIOU, 2010; LAYER, 2006; KIM, 2008; GARZA-GONZÁLEZ, 2010; DELMAS, 2008). Bu türlerin bağışıklığı baskılanmış konakda hayatı tehdit eden enfeksiyonlar oluşturması yanında antibiyotik direnci taşıması ve yaygınlaşması da diğer önemli sorunlardır. Bu nedenle KNS türlerinin doğru, ucuz ve hızlı tanımlanması önemlidir.

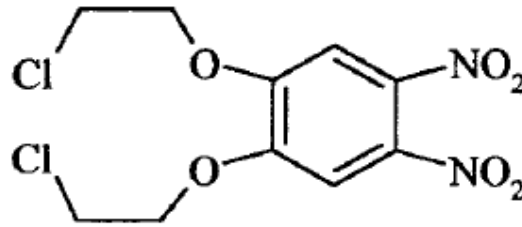
Ülkemizde klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında *S.aureus*'ların KNS kökenlerinden ayırımında kullanılan koagülaz testinde genellikle sorun olmamaktadır. Ancak KNS türlerinin tanımlanması yapılamamaktadır. Bu yöntemin değerlendirilmesi deneyim sahibi laboratuvar çalışanları için kolaydır. Plazmanın ticari olarak temin edilmediği küçük çaplı laboratuvarlarda enfektif plazma ile çalışma zorunluluğu çalışan sağlığı açısından risktir. Bu nedenle alternatif yöntemler, sıvı veya disk şeklinde, laboratuvar depolama şartlarında stabilitesini koruyan ürünlerin geliştirilmesi tanımlamayı kolaylaştırmaktadır.

3. Gereç ve Yöntem

3.1 Pam-6 sentezi ve saflaştırılması: Sunulan araştırmanın proje değerlendirme safhasında araştırmaya alınan bileşik Tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarındaki kodlanmış ismi ile Pam-6 olarak tanımlanmıştır. Pam-6 maddesi; bir polifenolün reaktif merkezlerinin korunması ve halojenlenmesinin ardından elokrifilik sübstitüsyon reaksiyonları ile yeni sübstitüe grupların eklenmesi ile sentez edilmiştir. Sentezlenen bileşik kristallendirilerek saflaştırılmış, elementel analiz ve FT-IR spektroskopisi ile yapının doğrulanması sağlanmıştır.

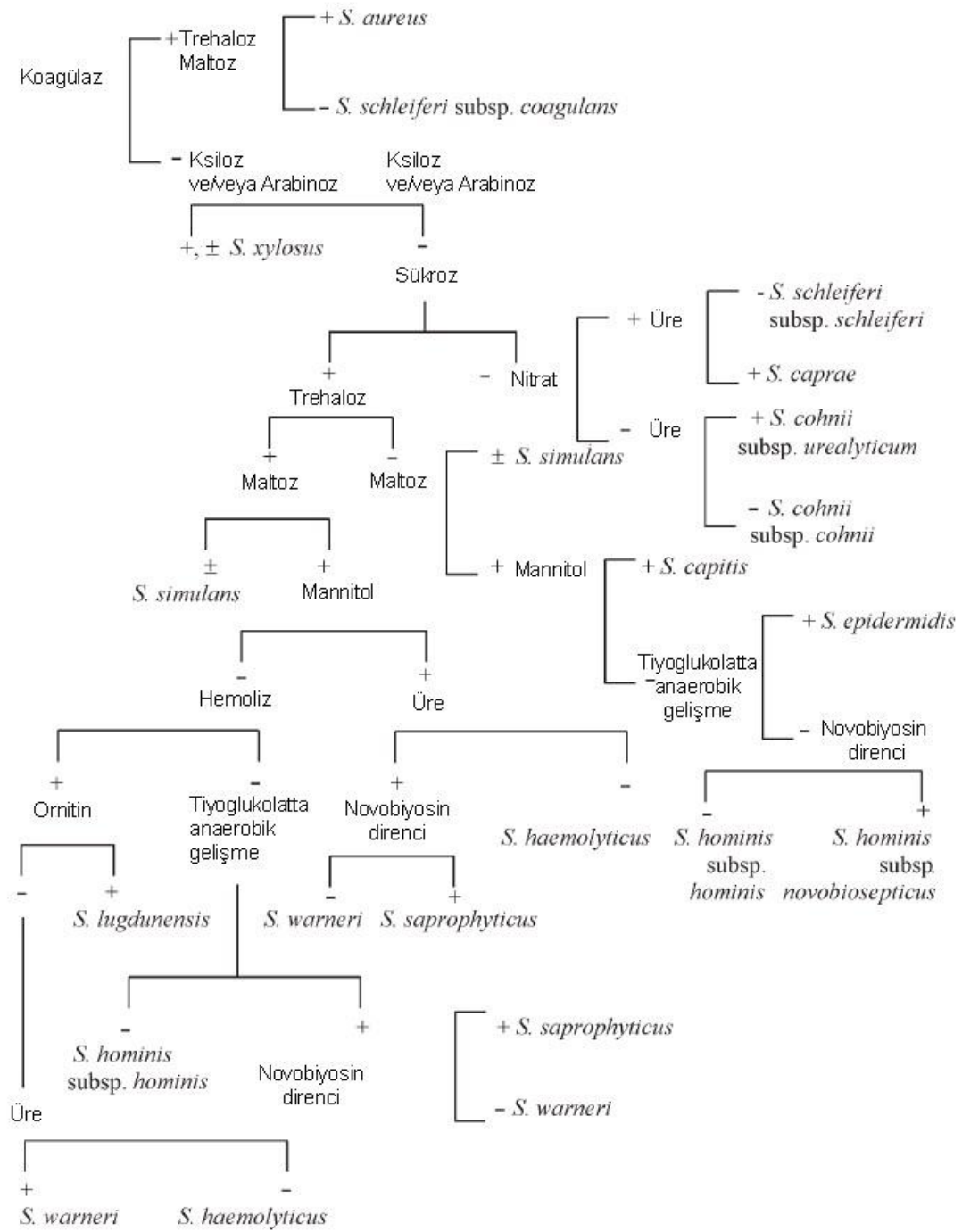
Araştırmada Pam-6 olarak kodlanan madde; Şekil 1'de yapısı gösterilen 1,2-dinitro-4,5-bis(2-kloretoksi)benzen'dir (KANTEKİN, 2002).

Şekil 1: 1,2-dinitro-4,5-bis(2-kloretoksi)benzen yapısı



3.2 Çalışma kökenleri: Araştırmaya 10 standart *Staphylococcus* sp. (*S.aureus* ATCC 25923, *S.epidermidis* ATCC 12228, *S.chromogenes* ATCC 43764, *S.saprophyticus* ATCC 13528, *S.haemolyticus* ATCC 29970, *S.hominis* ATCC 27844, *S.hyicus* ATCC 11249, *S.simulans* ATCC 27848, *S.xylosus* ATCC 29971 ve *S.warneri* ATCC 27836) köken, patojen ve/veya flora üyesi 242 *S.aureus* ve 642 KNS kökeni (272 *S.epidermidis*, 115 *S.haemolyticus*, 109 *S.hominis*, 59 *S.warneri*, 31 *S.capitis*, 17 *S.saprophyticus*, 10 *S.caprae*, 8 *S.schleiferi*, 8 *S.simulans*, 5 *S.xylosus*, 4 *S.lugdunensis*, 3 *S.cohnii* ve 1 *S.sciuri*) alındı. Kökenler arasındaki farklılıkları sağlayabilmek amacıyla farklı hastalardan ve/veya aynı hastanın farklı bölgelerinden izole edilen kökenler seçildi. KNS tanımlaması için Kloos ve Schleifer tarafından tanımlanana ve şematik (Şekil 2) hale getirilen yöntem kullanıldı (KLOOS, 1975; CUNHA, 2004). Nadir görülen kökenlerin tanımlanmasında daha çok sayıda biyokimyasal parametrenin test edilebildiği otomatize tanımlamam sistemlerinden yararlandı. Tüm kökenler tanımlamayı takiben Pam-6 ile test sürecine kadar -20°C'da %10 gliserollü beyin-kalp infüzyon buyyonu içinde stoklandı.

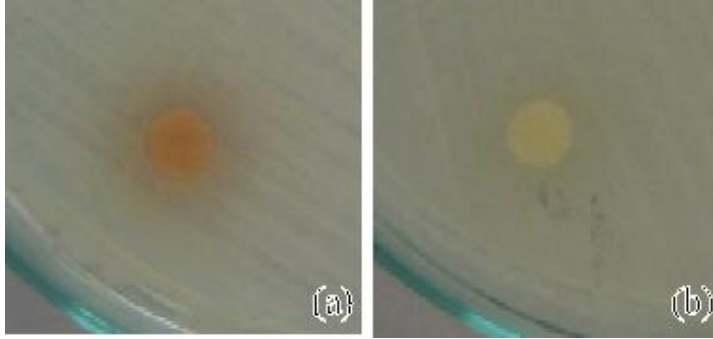
Şekil 2: Klinik koagülaz negatif stafilkokların tanımlanmasında kullanılan algoritma (KLOOS, 1975; CUNHA, 2004)



3.3 Pam-6 deneyleri

3.3.1 Disk testleri: Araştırmaya alınan kökenlerden randomizasyonla seçilen 192 KNS ve 52 *S.aureus* kökeni (Toplam 244 köken) stok besiyerinden Mueller-Hinton besiyerine pasaj yapıldı. Ekimler bir gece boyunca 37°C'da etüvde canlandırıldı. Her köken dimetilsülfoksit içinde %1 oranında Pam-6 bileşiği emdirilmiş, 6 mm çapındaki diskler ile CLSI M2-A10 yöntemine göre test edildi. Nemli ortamda 18 saatlik enkübasyon sonunda oluşan renk, disk yüzeyinin önünden ve arkasından olmak üzere makro objektif ile fotoğraflandı. Eş zamanlı olarak *S.aureus* 25925 kökeni pozitif kontrol ve proje aşamasından önce tanımlanmış olan *S.epidemicus* kökeni negatif köken olarak kullanıldı. Elde edilen verilerin kişiler arasında farklılık yaratmasını sağlamak amacı ile kökenler yeniden numaralandırılarak kodlandı. Resimler bilgisayar programları ile birleştirilerek tek bir *.pdf dosya haline getirildi. Bu dosya internet üzerinden projede görev yapan araştırmacılara gönderildi. Koyu turuncu/Kırmızı renk oluşması "pozitif", sarı renk oluşması ve/veya renk oluşmaması "negatif" olarak kabul edildi. (Şekil 3). Araştırmacılara gönderilen dosyanın içeriği sunulan raporda Ek-1 olarak verilmiştir. Her araştırmacı bağımsız olarak değerlendirdiği sonuçları geri gönderdi. Bütün veriler birleştirilerek disk testi yönteminde, KNS ve *S.aureus* kökenlerinin ayırımı amacıyla yönelik olarak Pam-6 bileşiğinin yeterliliği saptandı.

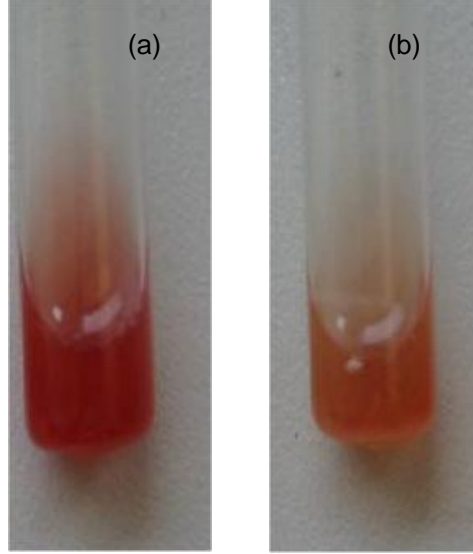
Şekil 3: Disk difüzyon testi ile (a) "pozitif" ve (b) "negatif" reaksiyon



3.3.2 Tüp testleri: Araştırmaya alınan kökenlerden randomizasyonla seçilen 159 KNS ve 46 *S.aureus* kökeni (Toplam 205 köken) stok besiyerinden Mueller-Hinton besiyerine pasaj yapıldı. Ekimler bir gece boyunca 37°C'da etüvde canlandırıldı. Her köken 2 ml. beyin-kalp infüzyon buyyonu (BHI) içinde 4 saat 37°C'da enkübasyona bırakıldı. Süre sonunda üzerlerine 100 µL Pam-6 ve 100 µL NaOH ilave edilen kökenler santrifüje alındı. Santrifüj sonrasında tüpler makro objektif ile fotoğraflandı. Eş zamanlı olarak *S.aureus* 25925 kökeni pozitif kontrol ve proje aşamasından önce tanımlanmış olan *S.epidemicus* kökeni negatif köken olarak kullanıldı. Elde edilen verilerin kişiler arasında farklılık yaratmasını sağlamak amacı ile kökenler yeniden numaralandırılarak kodlandı. Resimler bilgisayar programları ile birleştirilerek tek bir *.pdf dosya haline getirildi. Bu dosya internet üzerinden projede görev yapan araştırmacılara gönderildi. Koyu turuncu/Kırmızı renk oluşması "pozitif", sarı renk oluşması ve/veya renk oluşmaması "negatif" olarak kabul edildi (Şekil 4). Araştırmacılara gönderilen dosyanın içeriği sunulan raporda Ek-2 olarak verilmiştir. Her araştırmacı bağımsız olarak

değerlendirdiği sonuçları geri gönderdi. Bütün veriler birleştirilerek tüp testi ile KNS ve *S.aureus* kökenlerinin ayırımında Pam-6 bileşiğinin yeterliliği saptandı.

Şekil 4: Tüp testi ile (a) "pozitif" ve (b) "negatif" reaksiyon



3.3.3 Spektrofotometrik testler: Araştırmaya 642 KNS, 242 *S.aureus* ve 10 standart *Staphylococcus* kökeni alındı. Araştırmaya alınacak köken stok besiyerinden Mueller-Hinton besiyerine pasajlandı. Ekimler bir gece boyunca 37°C'da etüvde canlandırıldı.

Her köken 2 ml. beyin-kalp infüzyon buyyonu (BHI) içinde 37°C'da enkübasyona bırakıldı. Sunulan proje öncesinde yapılan önçalışmaya göre Pam-6 çözeltisi ve NaOH miktarı 100'er µL olarak saptandı (Şekil 5).

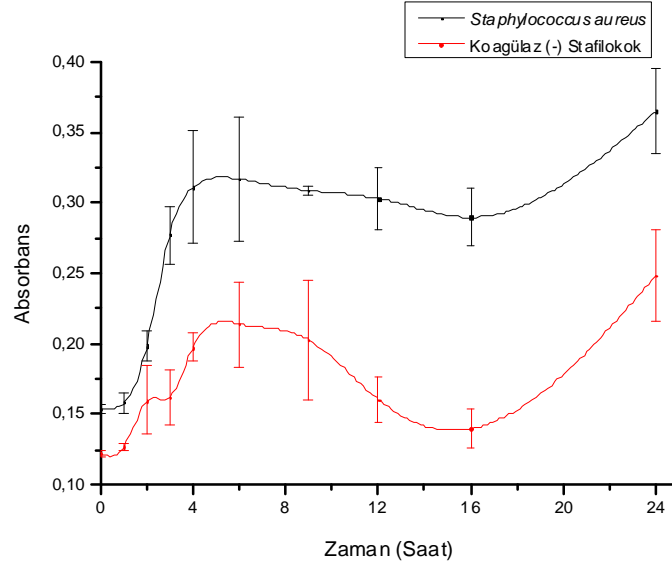
Şekil 5: Farklı hacimlerde Pam-6 reaksiyonu (İlk tüp 200 µL, ikinci tüp 100 µL, üçüncü tüp 50 µL)



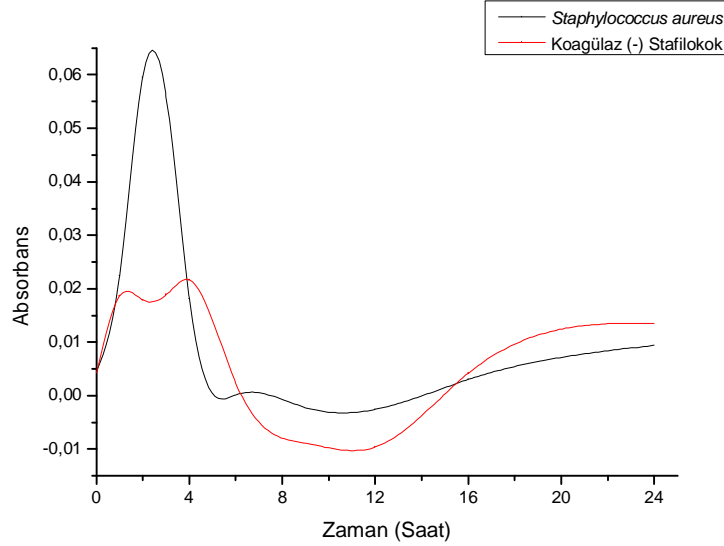
Sunulan proje öncesinde yapılan önçalışmaya göre Pam-6 çözeltilisinin bakteri kökenleri maksimum reaksiyonu veren zaman aralığını bulabilmek amacı ile inkübasyon süresi incelenmiştir. Şekil 6; enkübasyon süresi ile absorbans değerlerinin değişimini göstermektedir.

Şekil 6: *S.aureus* ve KNS kökenlerinde süre ile absorbans değerlerinde değişimin incelenmesi

(a) Verilerin zamana bağlı dağılımı



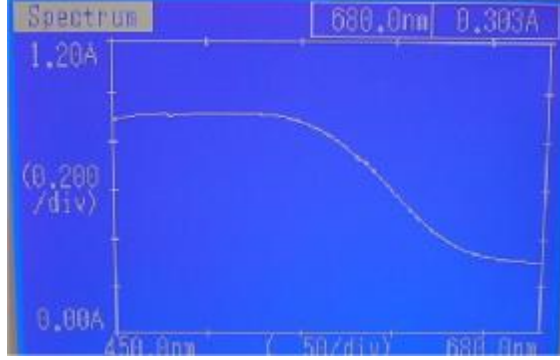
(b) Verilerin 2. dereceden türev grafiği



Enkübasyon süresi (6-18 saat) sonunda üzerlerine 100 μ L Pam-6 ve 100 μ L NaOH ilave edilen kökenler santrifüje edildi. Her tüpün süpernatant bölgesinden 250 μ L, steril, U taban mikrotitrasyon plaklarına (Sarstedt, ABD) üçer kuyucuk olarak aktarıldı.

Sunulan proje öncesinde yapılan önçalışmaya göre Pam-6 çözeltisi 630 nm referans filtreye karşı spektral analize alındı. 500 nm. dalga boyundan düşük filtrelerin değerlendirilmede kullanılabileceğine karar verildi (Şekil 7).

Şekil 7: Pam-6 maddesinin 630 nm referans filtreye göre spektrofotometrik analizi



Mikrotitrasyon plakları ELISA okuyucu (Bio-Tek, ELx808, ABD) ile 490 nm'de (referans 630 nm) değerlendirildi. Her mikrotitrasyon plağı için üç kuyucu pozitif kontrol kökeni için ayrıldı. Her mikrotitrasyon plağında veri değerlendirmesinde ilgili plakta kullanılan standart *S.aureus* kökenine ait veriler kullanıldı. Veri oranı;

$$\text{Kökene ait oran} = \frac{\text{Üç kuyucuk köken ortalaması}}{\text{Üç kuyucuk pozitif kontrol (S.aureus ATCC 25925) ortalaması}}$$

işlemine göre hesaplandı. Veriler bilgisayarda istatistik programına aktarılarak değerlendirildi. Elde edilen verilere ROC analizi yapılarak "cut-off" değerleri saptandı. Bu değer üzerindeki oranlar (+), altındaki oranlar ise (-) kabul edildi.

Elde edilen verilerin değerlendirilmesinde non-parametrik veriler için χ^2 , Kolmogorov-Smirnov testleri ve ROC değerlendirmesi kullanıldı.

4. Bulgular

4.1 Disk testleri sonuçları: Araştırmaya alınan 192 KNS ve 52 *S.aureus* kökenine (Toplam 244 köken) ait verilerin araştırmacı sonuçları Ek-4'de 0="negatif köken"; 1="pozitif köken" ve 2="karar verilemedi" değerlendirmesi ile sunulmaktadır. Tablo 1 bu verilere göre araştırmacıların test sonuçlarının karşılaştırmaktadır.

Tablo 1: Disk testinde Pam-6 bileşiği ile araştırmacıların kökenleri gruplayabilme oranları

	Doğru sonuç		Yanlış sonuç		Kararsız		p değeri		Test yeterliliği**
	N	%	n	%	n	%			
Araştırmacı-1	133	54.5	76	31.1	35	14.3	<0.001	<0.001*	- / -
Araştırmacı-2	76	31.1	113	46.3	55	22.5	0.007	0.020*	- / -
Araştırmacı-3	143	58.6	68	27.9	33	13.5	<0.001	<0.001*	- / -
Araştırmacı-4	87	35.7	149	61.1	8	3.3	0.001	***	- / ***
Araştırmacı-5	161	65.9	57	23.4	26	10.7	0.003	0.001*	- / -
Araştırmacı-6	114	46.7	129	52.9	1	0.4	0.557	0.343*	+ / +

*:kararsız sonuçlar çıkarıldığında

** : p / p* değerleri

***: "0" gözlemsel veri nedeniyle test edilemedi

Tablo 1'de gösterildiği şekilde elde edilen verilere göre, disk yöntemi ile yapılan Pam-6 ayırım testleri yeterli sonucu vermemektedir. Veri değerlendiren altı araştırmacıdan sadece biri kökenleri doğru olarak ayırabilmiştir.

Araştırmacıların disk testi ile KNS için doğru sonuca ulaşma (kesin negatif karar verebilme) oranları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2: Araştırmacıların Pam-6 bileşiği disk testi ile KNS ayırım yapabilme oranları

	<i>S.epidermidis</i> (n=98)	<i>S.haemolyticus</i> (n=30)	<i>S.hominis</i> (n=21)	<i>S.warneri</i> (n=15)	<i>S.capitis</i> (n=15)	Diğer KNS (n=13)
Araştırmacı-1	54.1	40.0	33.3	40.0	46.7	37.5
Araştırmacı-2	21.4	6.7	14.3	20.0	33.3	0.0
Araştırmacı-3	55.1	40.0	42.9	60.0	73.3	31.3
Araştırmacı-4	22.4	10.0	9.5	20.0	33.3	0.0
Araştırmacı-5	71.4	73.3	71.4	80.0	80.0	75.0
Araştırmacı-6	49.9	30.0	23.8	40.0	53.3	43.8
Ortalama	45.7	33.8	32.5	43.3	53.3	31.2

4.2 Tüp testleri sonuçları: Araştırmaya alınan 159 KNS ve 46 *S.aureus* kökenine (Toplam 205 köken) ait verilerin araştırıcı sonuçları Ek-5'de 0="negatif köken"; 1="pozitif köken" ve 2="karar verilemedi" değerlendirmesi ile sunulmaktadır. Tablo 3 bu verilere göre araştırıcıların test sonuçlarının karşılaştırmaktadır.

Tablo 3: Tüp testinde Pam-6 bileşiği ile araştırıcıların kökenleri gruplayabilme oranları

	Doğru sonuç		Yanlış sonuç		Kararsız		p değeri		Test yeterliliği**
	n	%	n	%	n	%			
Araştırmacı-1	146	71.2	45	22.0	14	6.8	0.031	0.010*	- / -
Araştırmacı-2	99	48.3	83	40.5	23	11.2	0.021	0.006*	- / -
Araştırmacı-3	94	45.9	78	38.0	33	16.1	0.293	0.820*	+ / +
Araştırmacı-4	53	25.9	113	55.1	39	19.0	0.001	***	- / ***
Araştırmacı-5	110	53.7	16	7.8	79	38.5	0.001	<0.001*	- / -
Araştırmacı-6	81	39.5	123	60.0	1	0.5	0.021	0.037*	- / -

*:kararsız sonuçlar çıkarıldığında

** : p / p* değerleri

***: "0" gözlemsel veri nedeniyle test edilemedi

Araştırmacıların tüp testi ile KNS için doğru sonuca ulaşma (kesin negatif karar verebilme) oranları Tablo 4'de gösterilmiştir.

Tablo 4: Araştırmacıların Pam-6 bileşiği tüp testi ile KNS ayırım yapabilme oranları

	<i>S.epidermidis</i> (n=78)	<i>S.haemolyticus</i> (n=26)	<i>S.hominis</i> (n=19)	<i>S.capitis</i> (n=15)	<i>S.warneri</i> (n=12)	Diğer KNS (n=9)
Araştırmacı-1	85.9	80.8	100.0	86.7	83.3	77.8
Araştırmacı-2	48.7	19.2	68.4	46.7	41.7	33.3
Araştırmacı-3	46.2	57.7	47.4	46.7	58.3	44.4
Araştırmacı-4	3.8	0.0	5.3	0.0	8.3	33.3
Araştırmacı-5	62.8	26.9	84.2	66.7	50.0	55.6
Araştırmacı-6	25.6	7.7	36.8	20.0	41.7	44.4
Ortalama	45.5	32.1	57.0	44.5	47.2	48.1

4.3 Spektrofotometrik testlerin sonuçları: Araştırmaya alınan 462 KNS ve 242 *S.aureus* kökeninin Pam-6 ile reaksiyonlarına ait veriler Ek 5'de verilmiştir.

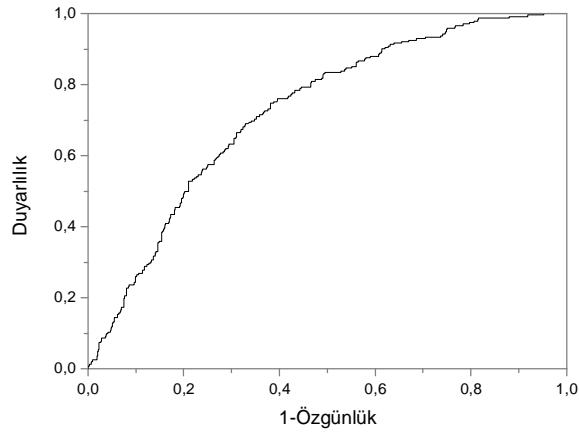
Elde edilen verilere göre ROC eğrisi Şekil 8'de gösterilmektedir. Sonuç olarak otomatize sistemlerin kabul edeceği şekilde; 0.72 ve altı değerler "negatif", 0.73 ve üstü değerler "pozitif" olarak

kabul edilmiştir. Pam 6 ile test edilmesi sonucunda Pam 6 testinin KNS kökenlerini ayırt edebilme kapasitesi olduğu görülmüştür ($p<0.001$; Tablo 5).

Tablo5: Pam-6 testinin KNS ve *S.aureus* kökenlerini ayırma etkinliği ($p<0.001$).

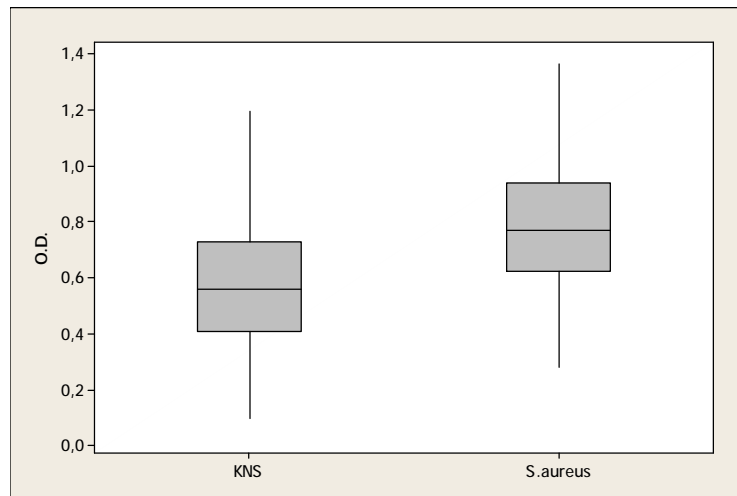
	Gerçek <i>S.aureus</i>	Gerçek KNS
Pam-6 sonucuna göre <i>S.aureus</i>	137	159
Pam-6 sonucuna göre KNS	105	483

Şekil 8: KNS ve *S.aureus* kökenlerinin Pam-6 test sonuçlarında ROC eğrisi. ("cut-off" $=0.72$)



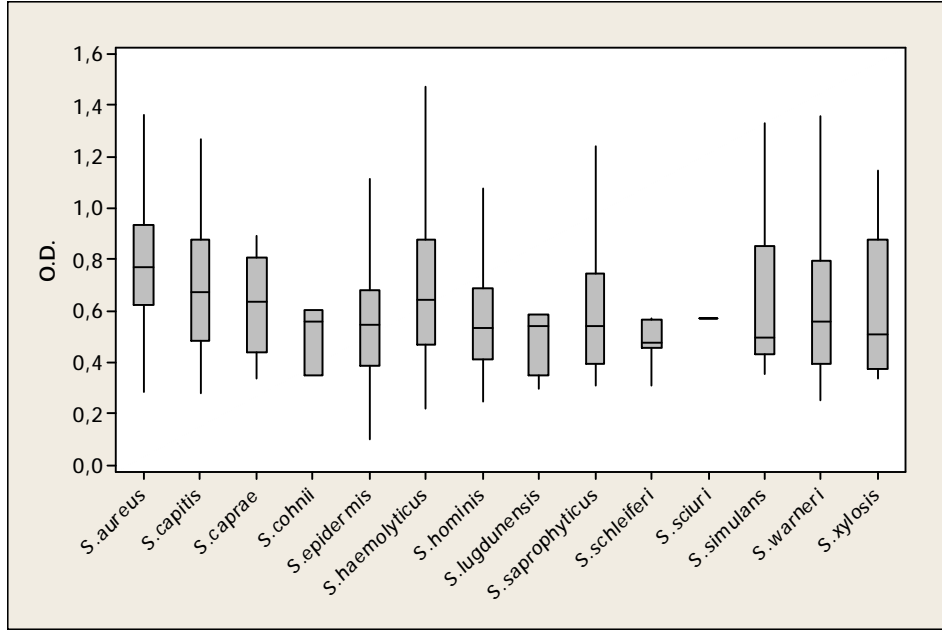
Doğrudan spektrofotometrik okumada, tüm KNS ve *S.aureus* kökenleri uç değerler hariç kolaylıkla ayrılabilir (Şekil 9; $p<0.01$).

Şekil 9: KNS ve *S.aureus* bakterilerinin spektrofotometrik değerlendirmede ayrımı



Şekil 9'de görüldüğü üzere; hem *S.aureus* hem de KNS kökenlerinde standart sapma değerleri yüksektir. Şekil 10 KNS kökenlerinin spektrofotometrik değerlendirme ile *S.aureus*'a göre durumunu göstermektedir.

Şekil 10: Farklı KNS kökenlerinin Pam-6 ile reaksiyonu sonucunda elde edilen spektrofotometrik oran değerleri



Şekil-9'de görülen değerlerin gruplar arası değerlendirme istatistik analiz sonuçları aşağıdadır. *S.capitis*, *S.caprae*, *S.cohnii*, *S.lugdunensis*, *S.saprophyticus*, *S.schleiferi*, *S.simulans* ve *S.xylosois* kökenleri *S.aureus* kökenlerine yakın değerler verirken, *S.epidermidis*, *S.haemolyticus*, *S.hominis* ve *S.warneri* kökenleri istatistiksel olarak *S.aureus* kökenlerinden farklılık göstermektedir (Tablo 6).

Tablo 6: *S.aureus* kökenlerinin farklı KNS gruplarından Pam-6 ile ayırımının değerlendirilmesi

Köken tür adı	n	Ortanca oran ± Standart hata	Ortalama oran ± Standart sapma	<i>S.aureus</i> 'tan ayırımında fark (p değeri)
<i>S.aureus</i>	242	0.77 ± 0.01	0.79 ± 0.25	-
<i>S.capitis</i>	31	0.67 ± 0.05	0.70 ± 0.30	0.342
<i>S.caprae</i>	10	0.63 ± 0.06	0.62 ± 0.19	0.954
<i>S.cohnii</i>	3	0.55 ± 0.07	0.50 ± 0.13	0.298
<i>S.epidermidis</i>	272	0.54 ± 0.01	0.56 ± 0.23	<0.001
<i>S.haemolyticus</i>	115	0.64 ± 0.02	0.67 ± 0.28	0.006
<i>S.hominis</i>	109	0.53 ± 0.02	0.57 ± 0.21	<0.001
<i>S.lugdunensis</i>	4	0.54 ± 0.06	0.49 ± 0.13	0.160
<i>S.saprophyticus</i>	17	0.53 ± 0.06	0.62 ± 0.27	0.191
<i>S.schleiferi</i>	8	0.48 ± 0.09	0.56 ± 0.25	0.098
<i>S.sciuri</i>	1	0.57	0.57	-
<i>S.simulans</i>	8	0.49 ± 0.11	0.64 ± 0.33	0.421
<i>S.warneri</i>	59	0.56 ± 0.03	0.60 ± 0.24	0.001
<i>S.xylosum</i>	5	0.50 ± 0.14	0.60 ± 0.32	0.527

Araştırmaya alınan standart kökenlerin *S.aureus*'a oran değerleri Tablo 7'de verilmektedir.

Tablo 7: Standart KNS kökenlerinin *S.aureus* ATCC 25923 kökenine göre oran değerleri

Köken	Oran değeri
<i>S.epidermidis</i> ATCC 12228	0.37
<i>S.chromogenes</i> ATCC 43764	0.52
<i>S.saprophyticus</i> ATCC 13528	0.62
<i>S.haemolyticus</i> ATCC 29970	0.69
<i>S.hominis</i> ATCC 27844	0.88
<i>S.hycius</i> ATCC 11249	0.69
<i>S.simulans</i> ATCC 27848	0.89
<i>S.xylosum</i> ATCC 29971	0.50
<i>S.warneri</i> ATCC 27836	0.40

5. Tartışma ve sonuç

Tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarında KNS ve *S.aureus*'un ayırımında çoğunlukla konvansiyonel yöntemler kullanılmaktadır. Otomatize tanımlama sistemlerinde bu iki ana grubu ayıran koagülaz testinin henüz tam olarak yerine geçebilen bir parametre bulunmamaktadır. İşyükünün yoğun olduğu laboratuvarlarda otomatize sistemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Otomatize sistemlerin ise hızlı ve doğru tanıda bulunması istenmektedir. Bu ise doğru algoritmanın oluşturulması yanında türe-özgül testlerin tanımlamada bulunması ile olasıdır. Günümüzde birçok otomatize sistem *S.aureus* ve KNS'ların ayırım paneli için önce manuel koagülaz testi yapılmasını, sonra otomatize sisteme tanımlama için verilmesini önşart olarak bulundurmaktadır (KANEMİTSU, 2005; CHATZİGEORGİOU, 2010). Otomatize sistemler hızlı ve doğru sonuçlar vermekle birlikte, genellikle maliyet yüksektir. Bu nedenle iş yoğunluğunun yüksek olmadığı laboratuvarlarda manuel yöntemler öncelikli olarak tercih edilmektedir. Bu durumda *S.aureus* ve KNS kökenleri koagülaz testi ile ayrılmaktadır. Klinik örneklerden izole edilen Gram pozitif *Micrococcaceae* üyelerinin tanımlama ve antibiyogram işlemleri genellikle gece boyu enkübasyona ihtiyaç duyar. Laboratuvar stabilitesi bulunan, disk difüzyon gibi kolay uygulanabilen ve göz ile kolay değerlendirilebilen testler, tanısal tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarında kolaylıkla kullanılabilir. Sentezinin kolay olduğu, stabil ve kolay değerlendirilebilen kimyasal malzemeler çoğunlukla yeni testlerde hedef bileşikleri oluşturmaktadır.

Bu araştırma ile incelemeye alınan Pam-6 (1,2-dinitro-4,5-bis(2-kloreoksi)benzen) maddesinin ön tanımlamalarda *S.aureus*'u KNS kökenlerinden ayırabileceği düşünülmüştür (Şekil 3, 4). Ancak projenin tamamlanması sonucunda disk difüzyon testi ve tüp testinde araştırmacılar arasında uyum olmaması, araştırmacıların KNS ve *S.aureus* kökenlerini doğru olarak ayıramamaları görsel olarak yapılan bu testlerin kullanılabilir olamayacağını göstermiştir (Tablo 1, 3).

Otomatize sistemlere yönelik olarak yapılan spektrofotometrik incelemede Tablo 5 ve Şekil 9'de görüldüğü üzere ayırım yapılabilir. Ancak Pam-6 ile yapılan test sonuçlarının kökenlere ait verilerinin yüksek standart sapmalara sahip olmaları, farklı KNS kökenlerinin ayrı ayrı değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir (Tablo6, Şekil 9).

Spektrofotometrik olarak *S.aureus* kökenlerindeki yüksek standart sapma, buna bağlı olarak ROC "cut-off" değerini düşürmektedir. Bu nedenle "negatif" sonuçları değerlendirmek daha kolay olmakla birlikte "pozitif" sonuçları saptamak daha zorlaşmaktadır. Tek başına *S.aureus* kökenlerindeki bu farklılıklar bile, Tablo-4 ve Şekil-9'deki olumlu verilere rağmen, Pam-6 aktif maddesinin *S.aureus*'ların saptanmasında kullanılamayacağını göstermektedir. Bunu destekler şekilde standart *Staphylococcus* kökenleri ile yapılan değerlendirmelerde de KNS kökenlerinin standart *S.aureus* kökeninin meydana getirmiş olduğu reaksiyona oranları 0.37-089 arasında değişmiştir (Tablo 7). ROC eğrisinden elde edilen "cut-off" değerinin 0.72 olması bu aralığa gelmiştir. Bu durum KNS kökenlerinde "yanlış pozitif" spektrofotometrik değerlendirme olabileceğini desteklemektedir.

Araştırmadan elde edilen olumlu bir sonuç da vardır. Önemli bir sorun klinik hasta örneklerinden izole edilen KNS'lerin tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarında hızlı ve güvenilir ayırımındadır. *S.epidermidis* ve *S.haemolyticus* son yıllarda klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında daha sık etken olarak izole edilmektedir (CHATZİGEORGİOU, 2010). KNS bakteriler uzman hekimler tarafından çoğunlukla floradan kontaminasyon ve/veya kolonizasyon olarak değerlendirilme eğiliminde olan

bakterilerdir. Bu aşamada KNS grupları içinde, sık rastlanan türlerin saptanabilmesi, nadir görülen diğer türlerin dışlanabilmesi, klinik örneğe doğru olarak hızlı yaklaşım konusunda önemlidir. Pam-6 ile KNS grupları içinde *S.aureus*'dan ayrılabilen kökenler arasında *S.epidermidis* ve *S.haemolyticus* da bulunmaktadır. (Şekil 10; Tablo 6). Bu iki bakteri ile birlikte *S.warneri*'nin de ayrılabilmesi bu bakterilerin ön plana çıktıkları kan akımı enfeksiyonları etkenlerinin ön tanımlama sürecinde Pam-6 testi ile değerlendirilebileceğini düşündürmektedir. Bu durumda ciltten veya diğer ortamlardan oluşabilecek kontaminasyon ekarte edilebilecektir. Sunulan araştırmada 642 KNS kökeninin 446'sı (%69.4) özellikle kan akımı enfeksiyon etkeni KNS olarak kabul edilen *S.epidermidis*, *S.haemolyticus* ve *S.warneri*'dir (Tablo 6). Kan akımı enfeksiyonu etkeni olarak izole edilen hemolitik, katalaz (+), Gram (+), kok morfolojisindeki etkenin hızlı olarak lamda koagülaz(-) sonuç vermesi durumunda Pam-6 testi ile incelemeye alınması tüpte koagülaz testine göre zaman kazandırabilir. Sunulan araştırmada araştırmacıların yarıya yakını bu kökenleri tüp testi ve/veya disk testi ile KNS olarak sınıflandırabilmişlerdir (Tablo 2, 4). Bu verilere göre spektrofotometrik değerlendirmede bu oranların yükselmesi hipotetik olarak ileri sürülebilir. Ancak bu sonucun klinik kökenlerin rutin çalışıldığı tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarlarında farklı araştırmacılar tarafından test edilmesine ihtiyaç bulunmaktadır. Projenin bitişini takiben klinik araştırma bölümü planlanmıştır. Bu verilerin de sağlanmasından sonra bilimsel yayın aşamasına geçilecektir.

Pam-6 maddesinin kesin olarak rutin ve otomatize testlerde kullanımının saptanamaması nedeni ile telif başvurusunda bulunması yapılmayacaktır. Hakemli bilimsel ve uluslar arası ulaşılabilir yayın ile veriler ve aktif madde içeriği paylaşılacaktır. Araştırmaya araştırmacı olarak katkıda bulunan Dr.Özgün Kiriş Satılmış, Dr.Yüksel Akkaya, Dr.Orçun Zorbozan ve Dr.Osman Acar hazırlanacak bilimsel raporda yer alacaklardır.

Sonuç olarak;

- ü Pam-6 maddesi KNS'dan *S.aureus*'un ayrımında tüp veya disk difüzyon testinde görsel olarak kullanılabilir bir madde değildir. Ancak kan akımı enfeksiyon etkeni olarak izole edilebilecek *S.epidermidis*, *S.haemolyticus* ve *S.warneri* kökenleri için rutin tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarında uygulanabilirliği ilave araştırma olarak planlanmıştır.
- ü Pam-6 maddesi KNS'dan *S.aureus*'un ayrımında spektrofotometrik olarak kullanılabilir. Ancak tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarında enfeksiyon etkeni olarak nadir rastlanan kökenler *S.aureus*'dan ayrılamamaktadır. Bu nedenle rutin kullanıma uygun bir madde olarak kabul edilmemelidir.
- ü Kan akımı enfeksiyon etkeni olarak izole edilebilecek, sık görülen etkenlerden *S.epidermidis*, *S.haemolyticus* ve *S.warneri* kökenleri için Pam-6 maddesinin spektrofotometrik olarak değerlendirmeye alınması, tüpde koagülaz testine göre zaman kazandırıcı olabilir. Ancak bu işlemin cihaz gerektirmesi yaygın kullanımına engeldir.
- ü Pam-6 maddesinin DMSO içinde çözünmesi, reaksiyon esnasında oluşan çökeleğin uzaklaştırılması için santrifüj ihtiyacının bulunması, günümüzde kullanılan otomatize

sistemlere uygun olmadığını düşündürmektedir. Pam-6 maddesinin suda çözünür hale getirilmesi ve saptanan aktivitesini koruması durumunda; Pam-6 maddesi otomatize sistemlerde “doğrulayıcı parametre” olarak kullanılabilir.

6. Kaynaklar

- [1] BARROS E.M., Iório N.L., Bastos Mdo C., dos Santos K.R., Giambiagi-deMarval M., Species-level identification of clinical staphylococcal isolates based on polymerase chain reaction--restriction fragment length polymorphism analysis of a partial groEL gene sequence. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 59: 251-7, (2007).
- [2] BEAUME M., Hernandez D., Docquier M., Delucinge-Vivier C., Descombes P., François P., Orientation and expression of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* small RNAs by direct multiplexed measurements using the nCounter of NanoString technology. *J Microbiol Methods*, 84: 327-34, (2011).
- [3] CAIÈRÃO J., Superti S., Dias C.A., d'Azevedo P.A., Automated systems in the identification and determination of methicillin resistance among coagulase negative staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 277-80, (2006).
- [4] CELEBI S., Hacimustafaoglu M., Ozdemir O., Ozakin C., Nosocomial Gram-positive bacterial infections in children: results of a 7 year study. *Pediatr Int*, 49: 875-82, (2007).
- [5] CHATZIGEORGIOU K.S., Siafakas N., Petinaki E., Argyropoulou A., Tarpatzi A., Bobola M., Paniara O., Velegraki A., Zerva L., Identification of staphylococci by Phoenix: validation of a new protocol and comparison with Vitek 2. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 68: 375-81, (2010).
- [6] CUNHA Mde L., Sinzato Y.K., Silveira L.V., Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 99: 855-60, (2004).
- [7] DELMAS J., Chacornac J.P., Robin F., Giammarinaro P., Talon R., Bonnet R., Evaluation of the Vitek 2 system with a variety of *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol*, 46: 311-3, (2008).
- [8] DEMIRDAL T., Demirturk N., Cetinkaya Z., Tufan G., Evaluation of bacteremias in a Turkish university hospital: 3-year outcomes. *Adv Ther*, 24: 841-51, (2007).
- [9] DOGRU A., Sargin F., Celik M., Sagiroglu A.E., Goksel M.M., Sayhan H., The rate of device-associated nosocomial infections in a medical surgical intensive care unit of a training and research hospital in Turkey: one-year outcomes. *Jpn J Infect Dis*, 63: 95-8, (2010).
- [10] DONAY J.L., Mathieu D., Fernandes P., Prégermain C., Bruel P., Wargnier A., Casin I., Weill F.X., Lagrange P.H., Herrmann J.L., Evaluation of the automated phoenix system for potential routine use in the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol*, 42: 1542-6, (2004).
- [11] ELSHOLZ B., Wörl R., Blohm L., Albers J., Feucht H., Grunwald T., Jürgen B., Schweder T., Hintsche R., Automated detection and quantitation of bacterial RNA by using electrical microarrays. *Anal Chem* 78: 4794-802, (2006).

- [12]ERDEM I., Ozgultekin A., Sengoz Inan A., Ozturk Engin D., Senbayrak Akcay S., Turan G., Dincer E., Oguzoglu N., Goktas P., Bloodstream infections in a medical-surgical intensive care unit: incidence, aetiology, antimicrobial resistance patterns of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Infect*, 15: 943-6, (2009).
- [13]ERDINC F.S., Yetkin M.A., Ataman Hatipoglu C., Yucel M., Karakoc A.E., Cevik M.A., Tulek N., Five-year surveillance of nosocomial infections in Ankara Training and Research Hospital. *J Hosp Infect*, 64: 391-6, (2006).
- [14]GARZA-GONZÁLEZ E., Morfin-Otero R., Macedo P., Gonzalez G.M., Llaca-Díaz J.M., Perez-Gómez R., Rodriguez-Noriega E., Evaluation of Sensititre plates for identification of clinically relevant coagulase-negative staphylococci. *J Clin Microbiol*, 48: 963-5, (2010).
- [15]HALPIN H., Shortell S.M., Milstein A., Vanneman M., Hospital adoption of automated surveillance technology and the implementation of infection prevention and control programs. *Am J Infect Control*, 39: 270-6, (2011).
- [16]HENSLEY D.M., Tapia R., Encina Y., An evaluation of the advandx *Staphylococcus aureus*/CNS PNA FISH assay. *Clin Lab Sci*, 22: 30-3, (2009).
- [17]KANEMITSU K., Kunishima H., Hatta M., Inden K., Saga T., Ouchi H., Ishizawa K., Harigae H., Takemura H., Kaku M., Evaluation of a fully automated system (RAISUS) for rapid identification and antimicrobial susceptibility testing of *Staphylococci*. *J Clin Microbiol*, 43: 5808-10, (2005).
- [18]KANTEKİN H, Ocak Ü, Gök Y, Alp H., Synthesis and characterization of new (E,E)-dioxime and its homo and heterotrimeric complexes containing dioxo dithia diaza macrobicyclic moiety. *Polyhedron*, 21: 1865-70, (2002).
- [19]KIM M., Heo S.R., Choi S.H., Kwon H., Park J.S., Seong M.W., Lee D.H., Park K.U., Song J., Kim E.C., Comparison of the MicroScan, VITEK 2, and Crystal GP with 16S rRNA sequencing and MicroSeq 500 v2.0 analysis for coagulase-negative *Staphylococci*. *BMC Microbiol*, 23; 8: 233 (2008).
- [20]KLOOS W.E., Schleifer K.H., Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *J Clin Microbiol*, 1: 82-8, (1975).
- [21]LAYER F., Ghebremedhin B., Moder K.A., König W., König B., Comparative study using various methods for identification of *Staphylococcus* species in clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 44: 2824-30, (2006).
- [22]LOONEN A.J., Jansz A.R., Kreeftenberg H., Bruggeman C.A., Wolffs P.F., van den Brule A.J., Acceleration of the direct identification of *Staphylococcus aureus* versus coagulase-negative staphylococci from blood culture material: a comparison of six bacterial DNA extraction methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 30: 337-42, (2011).
- [23]ROSENFELD J.M., Hammerberg O., Orvidas M.C., Simplified methods for preparation of microbial fatty acids for analysis by gas chromatography with electron-capture detection. *J Chromatogr*, 378: 9-16, (1986).

- [24] SHEPHERD D., Friedlin J., Grannis S., Hui S., Kho A., A comparison of automated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* identification with current infection control practice AMIA Annu Symp Proc, 2009: 594-8, (2009).
- [25] STYERS D., Sheehan D.J., Hogan P., Sahm D.F., Laboratory-based surveillance of current antimicrobial resistance patterns and trends among *Staphylococcus aureus*: 2005 status in the United States. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 5: 2, (2006).
- [26] TABAQCHALI S., Silman R., Holland D., Automation in clinical microbiology: a new approach to identifying micro-organisms by automated pattern matching of proteins labelled with 35S-methionine. J Clin Pathol, 40:1070-87, (1987).
- [27] TRATTNER S., Greenspan H., Tepper G., Abboud S., Automatic identification of bacterial types using statistical imaging methods. IEEE Trans Med Imaging, 23: 807-20, (2004).
- [28] WHITE E.J., Fridrikh S.V., Chennagiri N., Cameron D.B., Gauvin G.P., Gilmanshin R., *Staphylococcus aureus* strain typing by single-molecule DNA mapping in fluidic microchips with fluorescent tags. Clin Chem, 55: 2121-9, (2009).

Şekiller dizini:

- Ek 1: Araştırmacılara gönderilen disk testleri dosyası
- Ek 2: Araştırmacılara gönderilen tüp testleri dosyası
- Ek 3: Araştırmacıların disk testi değerlendirme sonuçları
- Ek 4: Araştırmacıların tüp testi değerlendirme sonuçları
- Ek 5: Pam 6 testi için kökenlerin spektrofotometrik değerlendirme sonuçları

Proje No: 211T113
Proje Başlığı: <i>Staphylococcus aureus</i> Ve Koagülaz Negatif Stafilokokların Ayrımında Yeni Bir Kimyasal Ayracın Etkinliğinin Araştırılması
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Çağrı Ergin, Yaşar Gök, İlknur Kaleli
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: 1. Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı 2. Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Denizli
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: -
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 15/02/2012 – 15/10/2012
Öz (en çok 70 kelime) <i>Staphylococcus aureus</i> 'un daha düşük enfeksiyon potansiyeli taşıyan koagülaz negatif Stafilokok (KNS)'lardan hızlı ve doğru ayrımı gereklidir. Manuel olarak çalışılan koagülaz parametresinin yerini alabilecek testler laboratuvarların daha efektif sonuç vermesini sağlayabilecektir. Sunulan araştırmada 1,2-dinitro-4,5-bis(2-kloretoksi)benzen bileşiğinin <i>S.aureus</i> ve KNS kökenleri ile oluşturduğu renk değişimi araştırılmıştır. Sonuç olarak, test bileşiği <i>S.aureus</i> kökenlerini ayırmada kullanılabilir ancak güvenilirliği düşüktür. Bununla birlikte, kan akımı enfeksiyonlarında sık görülen <i>Staphylococcus</i> kökenlerinin ön ayrımında yardımcı hızlı test olarak kullanılabilir.
Anahtar Kelimeler: <i>Staphylococcus aureus</i> , koagülaz negatif stafilokok, 1,2-dinitro-4,5-bis(2-kloretoksi)benzen
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? Evet <input type="checkbox"/> Gerekli Değil <input checked="" type="checkbox"/>
Projeden Yapılan Yayınlar: Henüz bilimsel yayın yapılmamıştır.