

Kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu etkeni koagülaz negatif stafilokok kökenlerinin antibiyotik direnç profili ve virülans genleri

Antibiotic resistance profile and virulence genes of coagulase negative staphylococcus isolates causing catheter-associated bloodstream infection

Nur Gamze BOSTAN¹ (ID), Bayrı ERAÇ² (ID)

ÖZET

Amaç: Deri ve mukozal yüzeylerde mikrobiyota üyeleri arasında yer alan Koagülaz Negatif Stafilokok (KNS) türleri, özellikle kateter gibi tıbbi araçlarla ilişkili enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Antibiyotik direncinin önemli bir toplumsal sağlık sorunu olduğu günümüzde, KNS türlerinin etken olduğu kan dolaşımı enfeksiyonlarının tedavisinde akılcı antibiyotik kullanımı büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada, kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu etkeni KNS kökenlerinde, antibiyotik direnç profilinin ve virülansla ilişkili başlıca genlerin araştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmamızda, 2016-2017 yılları arasında Manisa Celal Bayar Üniversitesi Hastanesi'nde yatan hastalardan izole edilen 43 KNS suşunun, ampicilin, klindamisin, mupirosin, linezolid, tigesiklin, tetrasiklin, sefotaksim, gentamisin, vankomisin, siprofloksasin, eritromisin ve fusidik asit antibiyotiklerine karşı duyarlılıkları, klonal yakınlıkları ve bazı virülans faktörlerinin varlığı araştırılmıştır. Bu suşlarda sefoksitin (metisilin) duyarlılığı disk difüzyon, diğer

ABSTRACT

Objective: Although Coagulase Negative Staphylococci (CoNS) species are among the microbiota members of the skin and mucosal surfaces, they cause infections especially related to medical devices such as catheters. Nowadays, antibiotic resistance is an important public health problem and rational use of antibiotics is of great importance in the treatment of bloodstream infections caused by CoNS species. The aim of this study was to investigate the antibiotic resistance profile and some virulence genes of CoNS isolates that cause catheter related bacteremia.

Methods: In our study, 43 CoNS strains isolated from patients hospitalized in Manisa Celal Bayar University Hospital between 2016-2017, were evaluated for their susceptibility to ampicillin, clindamycin, mupirocin, linezolid, tigecycline, tetracycline, cefotaxime, gentamicin, vancomycin, ciprofloxacin, erythromycin and fusidic acid. The presence of clonal relationships and some virulence factors were also investigated. Susceptibility of cefoxitin (methicillin) was determined

¹İstanbul Gelişim Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Meslek Yüksek Okulu, Avcılar, İstanbul
²Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji AD, İzmir



İletişim / Corresponding Author : Bayrı ERAÇ

Ege Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji AD, Bornova, İzmir - Türkiye

E-posta / E-mail : eracb@yahoo.com

Geliş Tarihi / Received : 03.04.2021

Kabul Tarihi / Accepted : 30.06.2021

DOI ID : 10.5505/TurkHijyen.2022.65391

Bostan NG, Eraç B. Kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu etkeni koagülaz negatif stafilokok kökenlerinin antibiyotik direnç profili ve virülans genleri. Turk Hij Den Biyol Derg, 2022; 79(3): 419 - 432

antibiyotiklerinin duyarlılıkları ise mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Aminoglikozid direnci için *aacA-aphD* ve *aphA3*, metisilin direnci için *mecA* ve *mecC*, tetrasiklin direnci için *tetK* ve *tetM*, makrolid-linkozamid-streptogramin (MLS) tip B direnci için *ermA*, *ermB*, *ermC* ve *msrA* genleri ile virülans genleri olan *icaA*, IS256, *nucA* ve *sasX* polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile araştırılmıştır. Tür düzeyinde klonal yakınlıklar, Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC)-PZR ile incelenmiştir.

Bulgular: İncelenen tüm KNS türleri dikkate alındığında, en yüksek direncin %93 ile ampisiline, en düşük direncin ise %2 ile linezolidle karşı olduğu saptandı. Hiç bir KNS türünde tigesiklin ve vankomisine direnç gözlenmedi. Çalışılan tüm KNS türlerinin, kendi içlerinde genellikle farklı klonlara dahil oldukları saptandı. İncelenen suşlarda *mecA*, *aacA-aphD*, *aphA3*, *ermB*, *ermC*, *msrA* antibiyotik direnç genlerinin ve bunlara ek olarak *icaA*, IS256 ve *sasX* virülans genlerinin varlığı tespit edildi.

Sonuç: Çalışmamızın sonuçları, incelenen bakteriyemi etkeni KNS'lerin, yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere karşı direnç kazanmış olduklarını ve çeşitli virülans genlerini barındıran bu suşların dikkatle izlenmesi gerektiğini ortaya koymuştur.

Anahtar Kelimeler: Koagülaz negatif stafilocok, antibiyotik direnci, virülans faktörleri

by disk diffusion and susceptibilities of other antibiotics were determined by microdilution method. *AacA-aphD* and *aphA3* for aminoglycoside resistance, *mecA* and *mecC* for methicillin resistance, *tetK* and *tetM* for tetracycline resistance, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA* for macrolide-lincosamide-streptogramin (MLS) type B resistance, *icaA*, IS256, *nucA* and *sasX* virulence genes were investigated by polymerase chain reaction (PCR). Clonal relationships at species level were examined by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC)-PCR.

Results: Considering all species of CoNS examined, the highest and the lowest resistance rates were observed for ampicilin (93 %) and linezolid (2 %), respectively. There wasn't any resistant CoNS isolate to tigecycline and vancomycin. We found that all the examined CoNS species were generally clustered in different clones. We detected *mecA*, *aacA-aphD*, *aphA3*, *ermB*, *ermC* and *msrA* antibiotic resistance genes as well as *icaA*, IS256 and *sasX* virulence genes in the studied strains.

Conclusion: The results of our study revealed that the examined CoNS isolates causing bacteremia had acquired resistance to commonly used antibiotics and that these strains harboring various virulence genes. Therefore, those isolates and their infections should be carefully monitored.

Key Words: Coagulase negative staphylococci, antibiotic resistance, virulence factors

GİRİŞ

Koagülaz negatif stafilocoklar (KNS'ler), deri mikrobiyotasının kalıcı üyeleridir ve çoğunlukla koltuk altı, ayak tabanı, karın bölgesi gibi nemli bölgelerde kolonize olmaktadır. İnsanda en sık izole edilen türler, başta *Staphylococcus epidermidis* olmak üzere, *Staphylococcus saprophyticus*,

Staphylococcus haemolyticus, *Staphylococcus capitis* ve *Staphylococcus hominis*'tir.

Önceleri, patojen olarak kabul edilmeyen KNS'ler, günümüzde başta bakteriyemi olmak üzere birçok nozokomiyal enfeksiyondan sorumludurlar. Daha çok immun sistem yetersizlikleriyle ilişkili durumlarda, apse, pnömoni, artrit, menenjit, sepsis, konjunktivit, sistit gibi enfeksiyonlara yol açarlar (1). KNS'lerin

patojenitesi asıl olarak biyofilm oluşturmalarına dayanır. Biyofilm içindeki hücrelerin metabolik faaliyetleri azaldığından ve katmanlardan oluşan biyofilme antibiyotiklerin penetrasyonu çok kısıtlı olduğundan, enfeksiyonun tedavisi zorlaşır (2). Hastanelerde kateter takılan hastalar için büyük risk oluştururlar. Çoğunlukla damar yoluna giren cisimlerin üstünde üreyip bu yolla kan dolaşımına katılırlar ve iç organlarda enfeksiyona neden olurlar (1). İmmünsüpresyonu olan ve kateter takılan hastalarda kan dolaşımı enfeksiyonlarının nedeni çoğunlukla KNS'dir (3). KNS enfeksiyonların çoğalmasında, immünsuprese hasta sayısının artması, kateter gibi medikal aletlerin ve seçici antibiyotiklerin yoğun olarak kullanılması gibi faktörlerin etkili olduğu bildirilmektedir (4).

Antibiyotik direnci, günümüzün en önemli sağlık problemlerinden biridir. Birçok mikroorganizmada olduğu gibi KNS'lerde de antibiyotik direnci çok önemli bir sorundur. *S. epidermidis* başta olmak üzere hastane kökenli KNS suşlarında, metisilinini yanı sıra aminoglikozidlere, makrolidlere ve daha az oranda tetrasiklin, kloramfenikol, klindamisin ve linezolid karşı direnç görülmektedir (1,5). Bu veriler ışığında, özellikle medikal aletlerde biyofilm oluşturarak, sıklıkla ciddi enfeksiyonlara yol açabilen KNS'lerin antibiyotik direnç profillerini ve virülans faktörlerini araştırmak enfeksiyonların kontrolü açısından gereklidir. Aminoglikozid direncine yol açan *aacA-aphD* ve *aphA3*, metisilin ve hemen hemen tüm beta-laktam antibiyotiklere dirençte rol oynayan *mecA* ve *mecC*, tetrasiklin direncine neden olan *tetK* ve *tetM*, makrolid-linkozamid-streptogramin (MLS) tip B direnci sağlayan *ermA*, *ermB*, *ermC* ve *msrA* genleri ile biyofilm ilişkili virülans genleri olan *icaA*, IS256, *nucA* ve *sasX*, KNS'lerin patogeneğinde önemli bir yere sahiptir. Çalışmamızda, bir üniversite hastanesinde izole edilen kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu etkeni KNS kökenlerinin, çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarının ve virülansla ilişkili başlıca genlerin araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteriler

Bu çalışmada, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Hastanesinde kateterlerden ve hastaların kanlarından eş zamanlı alınan kültürlerde (semikantitatif kültürde >15 koloni oluşturan birim (kob) veya kantitatif kültürde >10³ kob) aynı tür ve aynı antibiyotik duyarlılık paternine sahip olduğu görülen ve böylece kateter ilişkili enfeksiyon etkeni olduğu tespit edilen 16 *S. epidermidis*, 12 *S. hominis*, 5 *S. haemolyticus*, 5 *S. cohnii*, 3 *S. lentus* ve 2 *S. capitis* olmak üzere toplam 43 KNS suşu incelendi. Cam boncuklar bulunan gliserollü sıvı besiyerindeki KNS suşları, çalışmada kullanılabildiği kadar -80 °C'de saklandı. Kökenleri canlandırmak için Brain Heart Infusion Agar (BHIA)'a ekimleri yapıp 35 °C'de 24 saat inkübe edildi.

Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MIK) değerleri 'The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing' (EUCAST) kriterlerine göre mikrodilüsyon testi ile belirlendi. Kontrol suşu olarak ise *S. aureus* ATCC 29213 kullanıldı. Ampisilin, sefotaksim ve eritromisin için 256-0.25 µg/ml arası, gentamisin, klindamisin ve siprofloksasin için 128-0.125 µg/ml arası, vankomisin, fusidik asit, tetrasiklin, tigesiklin, mupirosin ve linezolid için ise 64-0.032 µg/ml arası dilüsyonlarda çalışıldı. Üremenin olmadığı en düşük antibiyotik konsantrasyonu MIK değeri olarak kabul edildi. Bu prosedür, tüm suşlarda her antibiyotik için üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi ve sonuçların ortalamaları alındı.

KNS kökenlerinde metisilin direncini belirlemek için sefoksitin disk difüzyon testi uygulandı (6-8). EUCAST standartlarına göre, 22 mm'den küçük zon çapı olanlar dirençli, 22 mm ve daha büyük zon çapı olanlar duyarlı olarak yorumlandı.

Antibiyotik Direnç ve Virülans Genlerinin PZR ile Araştırılması

Moleküler araştırmalar için suşlardan genomik DNA izolasyonu yapıldı. Öncelikle suşların, KNS türleri olduğunu doğrulama ve metisilin direnci araştırması

için, stafilokokal 16S *rRNA*, *nucA* ve *mecA* genlerini kapsayan üçlü PZR yapıldı. PZR karışımı son hacim 50 µl olacak şekilde; 1 X PCR Buffer, 2 mM MgCl₂, 0.6 mM 16S *rRNA* primerleri, 0.4 mM *mecA* ve *nuc* primerleri (Tablo 1), 25 mM dNTP karışımı, 2 U Taq DNA polimeraz ve 5 µl hedef DNA örneği kullanıldı.

Amplifikasyon koşulları ise; 94 °C'de 10 dakika

ilk denatürasyon basamağı sonrasında 23 siklus olacak şekilde 94 °C'de 1 dakika (denatürasyon), 47 °C'de 1 dakika (bağlanma), 72 °C'de 2 dakika (uzama) basamakları ve son olarak 72 °C'de 5 dakika olarak ayarlandı. *Nuc* geni kontrolü olarak *S. aureus* ATCC 29213 suşu kullanıldı.

Tablo 1. Kullanılan primer dizileri ve PZR ürün büyüklükleri

Hedef gen	Primer	PZR Ürün Büyüklüğü	Kaynak
16S <i>rRNA</i>	(F)5'-GTTATTAGGGAAGACATATGTG-3' (R)5'-CCACCTTCTCCGGTTTGTACC-3'	750 bç	(9)
<i>aacA-aphD</i>	(F)5'-CCAAGAGCAATAAGGGCATAACC-3' (R)5'-CACACTATCATAACCACTACCG-3'	222 bç	(10)
<i>aphA3</i>	(F)5'-CTGATCGAAAAATACCGCTGC-3' (R)5'-TCATACTTCCGAGCAAAGG-3'	269 bç	(10)
<i>mecA</i>	(F)5'-AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC-3' (R)5'-AGTTCTGCAGTACCGGATTGC-3'	533 bç	(11)
<i>mecC</i>	(F)5'-GAAAAAAGGCTTAGAACGCCTC-3' (R)5'-GAAGATCTTTCCGTTTTCAGC-3'	631 bç	(12)
<i>tetK</i>	(F)5'-TCGATAGGAACAGCAGTA-3' (R)5'-CAGCAGATCCTACTCCT-3'	169 bç	(13)
<i>tetM</i>	(F)5'-GTGGACAAAGGTACAACGAG-3' (R)5'-CGGTAAAGTTCGTACACAC-3'	406 bç	(13)
<i>ermA</i>	(F)5'-TAT CTT ATC GTT GAG AAG GGA TT-3' (R)5'-CTA CAC TTG GCT TAG GAT GAA A-3'	421 bç	(14)
<i>ermB</i>	(F)5'-CCGTTTACGAAATTGGAACAGGTAAAGGGC-3' (R)5'-GAATCGAGACTTGAGTGTC-3'	359 bç	(15)
<i>ermC</i>	(F) 5'-CTT GTT GAT CAC GAT AAT TTC C-3' (R)5'-ATC TTT TAG CAA ACC CGT ATT C-3'	572 bç	(14)
<i>msrA</i>	(F)5'-GGCACAATAAGAGTGTAAAGG-3' (R)5'-AAGTTATATCATGAATAGATTGCCTGT-3'	940 bç	(15)
<i>icaA</i>	(F)5'-GACCTCGAAGTCAATAGAGGT-3' (R)5'-CCCAGTATAACGTTGGATACC-3'	814 bç	(16)
<i>IS256</i>	(F)5'-TGAAAAGCGAAGAGATTCAAAGC-3' (R)5'-ATGTAGGTCCATAAGAACGGC-3'	1103 bç	(17)
<i>nucA</i>	(F)5'-GCGATTGATGGTGATACGGT-3' xxc (R)5'-AGCCAAGCCTTGACGAACAAAGC-3'	347 bç	(18)
<i>sasX</i>	(F)5'-AGAATTAGAAGTACGTCTAAATGC-3' (R)5'-GCTGATTATGTAATGACTCAAATG-3'	522 bç	(19)
<i>ERIC</i>	(F)5'-ATGTAAGTCCTGGGGATTCA-3' (R)5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3'	100-1100 bç	(20)

Bç : Baz çifti

KNS suşlarında, antibiyotik direnç genleri (*AacA-aphD*, *aphA3*, *mecA*, *mecC*, *tetK*, *tetM*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA*) ve özellikle biyofilm oluşumunda rol oynayan virulans (*icaA*, *sasX* ile *IS256*) genlerinin varlığı, özgün primerler kullanılarak araştırıldı (Tablo 1). PZR karışımı bütün genler için total hacmi 50 µl olacak şekilde; 1X PZR Buffer, 2mM MgCl₂, forward ve reverse primerlerden 50 pikomol, 25mM dNTP, 2U Taq DNA Polimeraz ve 5 µl kalıp DNA olarak hazırlandı. Primerlerin özelliklerine göre bağlanma dereceleri 47-55 °C arasında ayarlandı.

İzolatların Klonal İlişkilerinin Araştırılması

KNS izolatların klonal ilişkileri Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC)- PZR yöntemi ile incelendi. *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. cohnii*, *S. hominis*, *S. lentus* ve *S. haemolyticus* türlerine ait suşların klonal ilişkileri kendi içlerinde araştırıldı. Total hacim 50µl olacak şekilde, 5µl kalıp DNA, 1 X PZR Buffer, 2 mM MgCl₂, 25 mM dNTP, 100 pM her bir primer, 3 U Taq Polimeraz kullanıldı. Amplifikasyon koşulları; 95 °C'de 7 dakika, 30 siklus olmak üzere 90 °C'de 30 saniye denatürasyon, 58 °C'de 1 dakika bağlanma, 65 °C'de 8 dakika uzama basamakları ve son olarak 68 °C'de 16 dakika olmak üzere ayarlandı.

Tüm bantları tamamen aynı olan izolatlar aynı suş (klon), bir veya iki bant farklılığı olan izolatlar benzer (klonal ilişkili), iki banttan fazla farklılık gösteren izolatlar ise farklı suşlar olarak kabul edildi. $SJ = nAB / (nAB + a + b)$ formülüne göre hesaplanan Jaccard katsayısı esas alınarak, KNS izolatlarına kendi türleri arasında "MEGA version 7" programı ile filogenetik analizler yapıldı. (nAB = A ve B izolatlarında ortak olan bant sayısı, a = A izolatında olup B'de olmayan bant sayısı, b = B izolatında olup A'da olmayan bant sayısı).

DNA Dizi Analizi

Tüm PZR ürünleri için çift yönlü DNA dizi analizi gerçekleştirildi (Triogen, İstanbul, Türkiye). Elde edilen dizi analizi sonuçları hem nükleotid hem de aminoasit düzeyinde, National Center for Biotechnology Information (NCBI)'ın web tabanlı servisleri kullanılarak referans dizilerle karşılaştırıldı.

(16S *rRNA*, *mecA*, *aacA-aphD*, *aphA3*, *ermB*, *ermC*, *msrA*, *icaA*, *IS256* ve *sasX* için sırasıyla; KY623260, MH106551, KY788648, KY788642, MG778119, MG787087, KJ710361, DQ846812, MF185208 ve MH551474).

BULGULAR

İncelenen KNS suşlarında en fazla direnç gelişimi 40/43 (% 93) ile ampisiline; en düşük direnç oranı ise 1/43 (% 2) ile linezolidle karşı saptandı. Kırk üç KNS suşunun hiç birinde tigesiklin ve vankomisine direnç gözlemlenmedi. İncelenen bakteriyemi etkeni KNS suşlarının bazı antibiyotiklere direnç oranları Tablo 2'de görülmektedir.

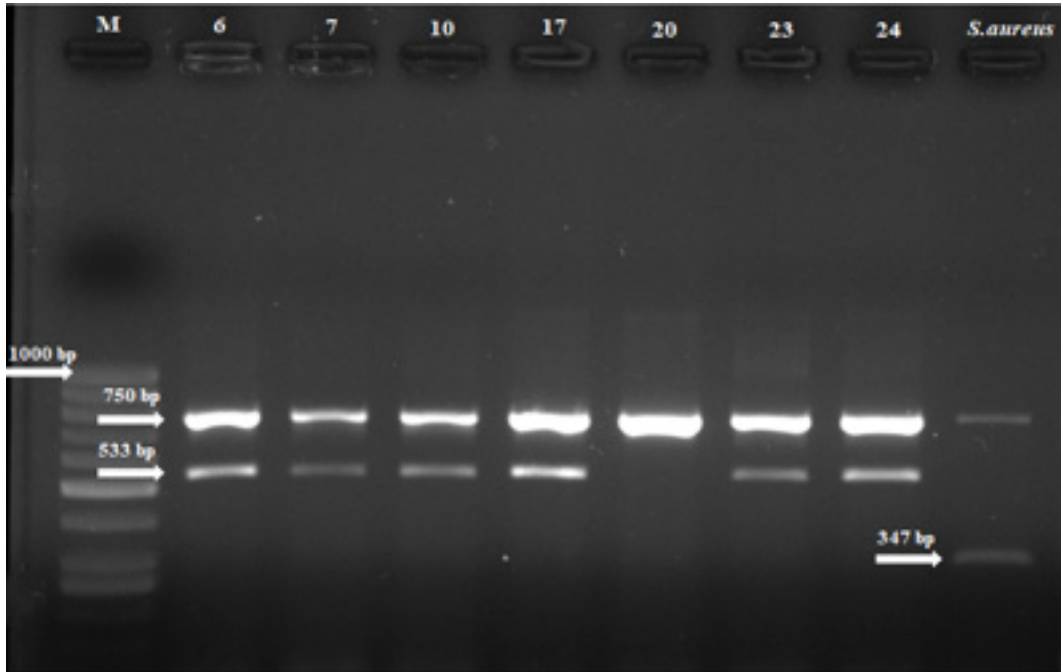
Metisilin direnci, EUCAST standartlarına göre sefoksitin disk difüzyon yöntemiyle araştırıldı. İki *S. cohnii*, iki *S. capitis*, 11 *S. epidermidis*, 11 *S. hominis*, bir *S. lentus* ve iki *S. haemolyticus* olmak üzere toplam 29 (%67) köken metisiline dirençli bulundu. Geri kalan 14 suş ise metisiline duyarlıydı.

KNS kökenlerinin moleküler identifikasyonu ve *mecA* varlığı araştırması için yapılan üçlü (16S *rRNA*, *mecA*, *nucA*) PZR sonucu, suşların tümünde 16S *rRNA* geni varlığı kanıtlanırken, 29 suшта *mecA* geninin varlığı saptandı. *MecA* tespit edilen suşların hepsi sefoksitin disk difüzyon çalışmasında dirençli olarak bulunan suşlardı. İncelenen 43 suşun hiçbirinde *Nuc* genine rastlanmadı (Şekil 1).

Yapılan ERIC-PZR sonuçlarına göre *S. epidermidis* suşlarında 1700-150 baz çifti (bç), *S. capitis* suşlarında 450-110 bç, *S. cohnii* suşlarında 1000-150 bç, *S. lentus* suşlarında 90-150 bç, *S. hominis* suşlarında 120-350 bç ve *S. haemolyticus* suşlarında 1000-250 bç arasında olmak 3 ile 16 arasında değişen bant sayıları görüldü. *S. capitis* suşlarından ikisi (26 ve 42) aynı klona dahildi. Beş *S. cohnii* suşundan iki tanesinin (10 ve 11) aynı klon, ikisinin (12 ve 15) klonal ilişkili ve bir suşun (9) bunlardan farklı olduğu saptandı. *S. haemolyticus* suşlarından ikiyeşer suşun (7 ile 35 ve 8 ile 13) aynı klon, geri kalan bir suşun (33) bunlardan farklı olduğu gözlemlendi. *S. lentus* suşlarının

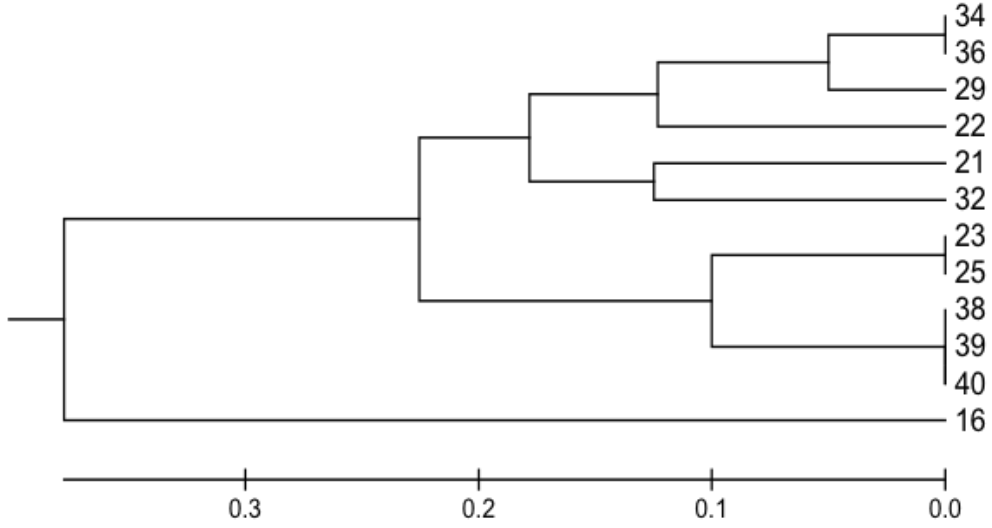
Tablo 2. Kateter ilişkili bakteriyemi etkeni KNS suşlarının antibiyotiklere direnç oranları

Antibiyotikler	<i>S. cohnii</i> n:5 (%)	<i>S. epidermidis</i> n:16(%)	<i>S. hominis</i> n:12(%)	<i>S. lentus</i> n:3(%)	<i>S. haemolyticus</i> n:5(%)	<i>S. capitis</i> n:2(%)	Toplam n:43(%)
Ampisilin	4 (80)	15 (93)	12 (100)	2 (66)	5 (100)	2 (100)	40 (93)
Sefotaksim	4 (80)	13 (81)	6 (50)	1 (33)	2 (40)	2 (100)	28 (65)
Eritromisin	5 (100)	13 (81)	12 (100)	2 (66)	5 (100)	2 (100)	39 (91)
Gentamisin	3 (60)	7 (43)	8 (66)	3 (100)	5 (100)	2 (100)	28 (65)
Linezolid	0	1 (6)	0	0	0	0	1 (2)
Siprofloksasin	5 (100)	9 (56)	8 (66)	3 (100)	5 (100)	2 (100)	32 (74)
Fusidik Asit	1 (20)	6 (37)	7 (58)	1 (33)	2 (40)	0	17 (39)
Tetrasiklin	0	4 (25)	3 (25)	0	2 (40)	0	9 (21)
Tigesiklin	0	0	0	0	0	0	0
Vankomisin	0	0	0	0	0	0	0
Mupirosin	1 (20)	1 (6)	1 (8)	0	0	0	3 (7)
Klindamisin	4 (80)	13 (81)	9 (75)	2 (66)	5 (100)	2 (100)	35 (81)

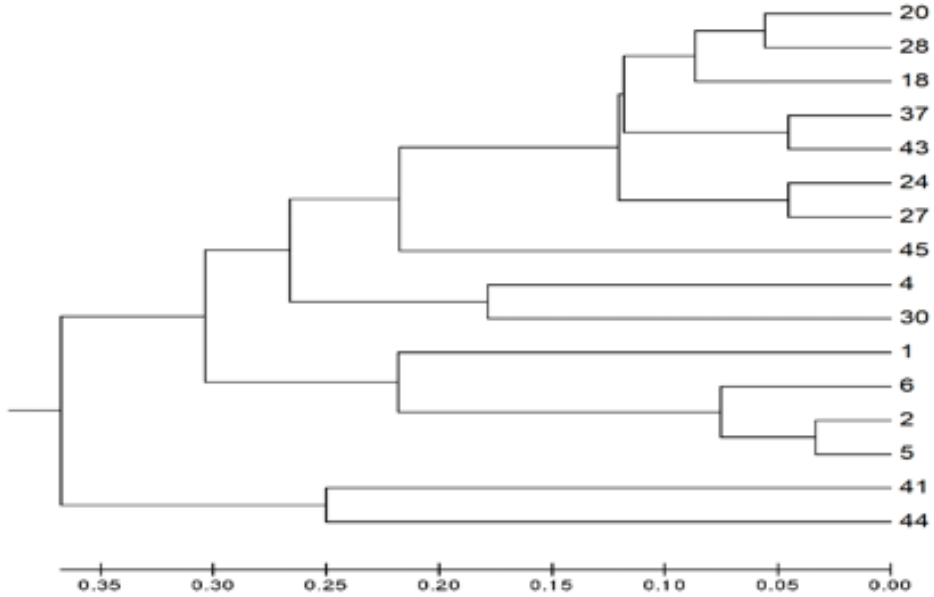
Şekil 1. Bir grup kateter ilişkili bakteriyemi etkeni KNS kökeninde, moleküler identifikasyon ve *mecA* varlığı araştırması için yapılan üçlü (16S rRNA-750bp, *mecA*-533 bp, *nucA*-347 bp) PZR elektroforez görüntüsü

üçünün de farklı klonlara ait olduğu saptandı. *S. hominis* suşlarında, ikisinde ikişer ve birinde üç suşun bulunduğu 3 farklı klon olduğu (34 ile 36, 23 ile 25 ve 38,39 ile 40), 16 nolu köken dışında geri kalan dört suşun da (21, 22, 29, 32) birbirleriyle klonal ilişkili

olduğu sonucuna varıldı (Şekil 2). *S. epidermidis* suşlarının hiçbiri aynı klona dahil değildi. Sekiz suşun (2,5 ve 6; 18,20 ve 27; 28 ile 43) klonal ilişkili olduğu, geri kalan sekiz suşun farklı klonlara dahil olduğu gözlemlendi (Şekil 3).



Şekil 2. *Staphylococcus hominis* suşlarının klonal ilişkisini gösteren dendrogram



Şekil 3. *Staphylococcus epidermidis* suşlarının klonal ilişkisini gösteren dendrogram

Antibiyotik direnç genlerinin PZR ile araştırılması sonucu, suşların hiç birinde *mecC*, *ermA*, *tetK* ve *tetM* genlerine rastlanmadı. Bir *S. epidermidis* suşunda araştırılan üç virülans geni de saptandı. İncelenen tüm KNS suşlarında PZR ile saptanan antibiyotik direnç ve virülans genleri Tablo 3'de

sunulmaktadır. Elde edilen tüm PZR ürünlerine ait dizi analizi sonuçları, hem nükleotid hem de aminoasit düzeyinde, NCBI'nın web tabanlı servislerinde referans dizilerle karşılaştırılarak, ilgili genlere ait oldukları doğrulandı.

Tablo 3. Kateter ilişkili bakteriyemi etkeni KNS suşlarında saptanan antibiyotik direnç ve virülans genleri

Tür	n	<i>mecA</i>	<i>aacA</i>	<i>aphA3</i>	<i>ermB</i>	<i>ermC</i>	<i>msrA</i>	<i>IS256</i>	<i>icaA</i>	<i>sasX</i>
<i>S. epidermidis</i>	16	11	9	1	13	9	8	2	1	3
<i>S. hominis</i>	12	11	5	1	7	12	4	6	1	1
<i>S. lentus</i>	3	1	3	0	1	2	0	1	0	0
<i>S. cohnii</i>	5	2	3	0	5	5	2	1	0	4
<i>S. capitis</i>	2	2	2	0	2	2	0	0	0	2
<i>S. haemolyticus</i>	5	2	5	0	2	2	3	3	0	0
Toplam	43	29	27	2	30	32	17	13	2	10

TARTIŞMA

Koagülaz Negatif Stafilocokların insan mikrobiyotasının üyesi olmaları ve fırsatçı enfeksiyon oluşturabilmeleri, enfeksiyon etkeni olarak tanı konulmasında önemli bir zorluk oluşturmaktadır. Ayrıca rutin tedavide kullanılan antibiyotiklere direnç geliştirebilmeleri de global bir sorun haline gelmiştir. Uygun olmayan bir antibiyotik tedavisinde bu enfeksiyonlar hızla kronik enfeksiyonlara dönüşebilmekte ve hayatı tehdit edebilen noktalara gelebilmektedir. Bu bakımdan hastadan izole edilen suşun antibiyotik duyarlılık profilini bilmek büyük önem taşımaktadır. Ayrıca, biyofilm oluşturabilmeleri dolayısıyla, kateter gibi medikal gereçler üzerinde kalıcı olarak bulunabilmeleri, neden oldukları enfeksiyonların tedavisini zorlaştıran bir diğer unsurdur.

Çalışmamızda beta laktam grubunu temsilen ampisilin, sefotaksim ve sefoksitin antibiyotikleri kullanılmıştır. Ampisiline %93, sefotaksime %65, metisiline (sefoksitin) %67 oranında direnç saptanmıştır. Türkiye'de KNS'ler üzerinde 2006 ve 2017 yılları arasında yapılan bazı çalışmalarda metisilin direnç oranları %12-80 arasında değişmekte olup, zaman içinde arttığı görülmektedir (8,21-23). 1987 ile 2017 yılları arasında yurt içi ve yurt dışında gerçekleştirilmiş *S. epidermidis* ve KNS suşları ile yapılan bazı araştırmalarda ampisilin direnç oranları %10,8 ile 100 arasında değişmektedir (24-26). Sefotaksim için ise, 1980'li yıllardan günümüze kadar yapılan bazı çalışmalarda direnç oranları %9 ile 84,2 arasında bulunmakla beraber, yıllara göre önemli bir değişim görülmemektedir (27,28). Bizim bulgularımız da, yurt içi ve dışında gerçekleştirilen bu çalışmalar ile uyum göstermektedir.

Koagülaz Negatif Stafilokoklarda beta laktam antibiyotiklere direncin yaygınlaşması ve çoklu direnç gösteren suşların ortaya çıkmasıyla glikopeptidlerin kullanımı gündeme gelmiştir. Ancak, vankomisin MİK değerlerindeki artış tedavi başarısını tehdit etmektedir. Khorshed ve arkadaşlarının 150 KNS izolatında yaptığı çalışmada sadece bir suş vankomisin dirençli bulunmuştur (24). 2008'de Hope ve arkadaşlarının çalışmasında bir KNS izolatının vankomisine orta duyarlı olduğu saptanmıştır (29). İki binli yıllarda yurt içi ve yurtdışında KNS izolatlarında yapılan birçok çalışmada vankomisin direncine rastlanmamıştır (21,25,30,31). Çalışmamızda da 43 KNS izolatından hiçbirinde vankomisin direnci gözlemlenmemiştir.

Linezolid, vankomisine direnç gösteren stafilokokların enfeksiyonlarında kullanılabilir bir alternatif olarak görülmektedir. 2009 yılına kadar linezolid dirençli KNS bildirilmemiştir. Linezolid duyarlılığı 26 Avrupa ülkesinde 18.527 stafilokok izolatında çalışılmış ve %0,1 oranda direnç gözlemlenmiştir (32). Türkiye'de 2010, 2013 ve 2014 yıllarında KNS suşları üzerinde yapılan araştırmalarda linezolid direnci tespit edilmemiştir (25,29,33). 2017'de yapılan bir araştırmada ise 125 KNS izolatından üçü (2 adet metisilin dirençli *S. epidermidis*, 1 adet metisilin dirençli *S. hominis*) linezolid dirençli bulunmuştur (30). Çalışmamızda da metisilin dirençli bir *S. epidermidis* suşunda linezolid direnci saptanmıştır.

Stafilokoklarda saptanan makrolid, linkozamid ve streptogramin (MLSB) direnci, bu suşların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılmakta olan klindamisin ve eritromisin etkinliğini azaltmaktadır. Yapılan bazı çalışmalar göz önüne alındığında, 2011 yılında KNS'lerin eritromisin direnç oranları %5,6-12,6 arasında iken son yıllarda bu oranlar %75-80 arasında bulunmuştur (24,26,30,31,34). Klindamisin için 2012-2017 yılları arasında KNS suşları üzerinde yapılan çalışmalarda direnç oranları %45-60 arasında stabil kalmış olduğu görülmektedir (24,30,31,34). Çalışmamızda elde edilen %91'lik eritromisin ve

%81'lik klindamisin direnç oranları, birçok çalışmada belirtilen oranların üzerindedir.

Son yıllarda yapılan bazı çalışmalarda, KNS izolatlarında tetrasiklin direncinin %6,8 ile 69 arasında değiştiği görülmektedir (26,30,31,34). Çalışmamızda, tetrasikline %21 gibi düşük sayılabilecek bir oranda direnç saptanması, tigesikline ise hiç direnç gözlemlenmemiş olması olumlu bir sonuçtur. Bir *S. epidermidis* suşunda tigesiklin MİK'i sınır değer olan 0.5 µg/ml olarak bulunmuştur. Tigesikline MİK'i sınırda olan bu suş, vankomisin ve mupirosin hariç diğer antibiyotiklerin hepsine direnç göstermiştir.

Türkiye'de yaklaşık son 20 yıllık süreçte KNS suşlarındaki gentamisin direnç oranları %0,4 ile 83 arasında değişiklik göstermektedir (24,26,30,31). Çalışmamızda incelenen 43 KNS kökeninde gentamisin direnç oranı %65 olarak saptanmış ve önceki yıllarda yapılan araştırma sonuçlarıyla benzerlik görülmüştür.

KNS suşları ile yapılan bazı çalışmalarda siprofloksasin direnç oranları, en az %2,2 en fazla %50 olarak rapor edilmiştir (26,30,35). Çalışmamızda siprofloksasin direnç oranının %74 gibi diğer çalışmalara göre daha yüksek bir değerde olması, kinolonların KNS enfeksiyonlarında daha dikkatli kullanılması gerektiğini göstermektedir.

Bir grup çalışmada KNS'lerde fusidik asit direnç oranlarının %13-57 arasında olduğu görülmektedir (30,33,36). Çalışmamızda saptanan %39'luk fusidik asit direnç oranı, bu çalışmalar ile uyumluluk göstermektedir.

Bathoorn ve arkadaşlarının 2006-2011 yılları arasında gerçekleştirdikleri çalışmada 595 KNS izolatı incelenmiş, 2006 yılında %8 olan mupirosin direncinin artarak 2011 yılında %22'ye ulaştığı saptanmıştır (37). Çalışmamızda mupirosine %7 gibi düşük bir oranda direnç tespit edilmiştir. Türkiye'de 1999-2008 yılları arasında yapılan çalışmalarda ise %3,6-41 oranları arasında mupirosin direnci saptanmıştır (36,38). Mupirosin direnç verilerimiz de Türkiye ve yurt dışı çalışmalarıyla paralellik göstermektedir.

Çalışmamızda klonal ilişkileri araştırılan bakteriyemi etkeni KNS suşlarının genellikle

farklı klonlara ait oldukları, tek bir klonun yayılım göstermediği görülmektedir. Türkiye’de gerçekleştirilen bir çalışmada da benzer şekilde, çoğunlukla klonal olarak ilişkisiz KNS suşları saptanmıştır (39).

MecA geni, penisilin bağlayan protein 2a (PBP2a)’yı kodlamakta ve bu proteinin üretimi sonucu hemen hemen tüm beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç gelişmektedir. İspanya’da yapılan bir çalışmada, stafilocoklarda metisilin direncinin 1986-1994 yılları arasında stabil kaldığı, 2002’de araştırıldığında ise çok hızlı bir şekilde artmış olduğu gösterilmiştir (40). *MecA* geni, heterojen olarak ifade edildiğinden, fenotipik yöntemlerle metisilin direnci kesin olarak ortaya konulamaz. Metilsilin direnci için altın standart, *mecA* genini PZR ile saptamaktır. Metisilin direncini oksasilin ve safoksitin disk difüzyon yöntemleri ile araştırıp *mecA* geni için PCR uygulaması yapılan bir çalışmada, 105 KNS izolatından 83’ü oksasilin, 80’i sefoksitin dirençli bulunurken 83 suшта *mecA* geni bulunmuştur (23). Çiftçi ve arkadaşlarının 193 stafilocok suşu üzerinde yaptığı çalışmada, oksasilin disk difüzyon yöntemi ile 141 izolat metisilin dirençli bulunurken 144 izolatta *mecA* geni varlığı gözlemlenmiştir (34). Duran ve arkadaşlarının 159 KNS suşu üzerindeki disk difüzyon çalışmasında 30 metisilin dirençli suş saptanmış ancak 47 izolatta (%29,6) *mecA* geninin varlığı tespit edilmiştir (31). Çalışmamızda metisilin direncini tayin etme amaçlı yapılan sefoksitin disk difüzyon çalışmasında, dirençli bulunan 29 suşun tümünde PZR çalışması sonucu *mecA* geni varlığı da belirlenmiştir.

AacA-aphD geninin kodladığı bifonksiyonel enzim olan AAC(6’)/APH(2’), streptomisin dışındaki diğer aminoglikozidlere dirence yol açmaktadır. Bu enzimin Avrupa’nın pek çok ülkesinde stafilocoklarda gentamisin direncinden sorumlu olduğu saptanmıştır (20). Çalışmamızda 28 KNS suşu fenotipik olarak gentamisin dirençli bulunmuş, bunların 27 tanesinde *AacA-aphD* geni, 2 tanesinde de *aph(3’)-3a* geni saptanmıştır.

Makrolid linkoazmid streptogramin (MLS) direncinden sorumlu olan genlerden en sık görülenler, *erm* ve *msr* genleridir. *ErmC*’nin koagülaz negatif stafilocoklarda en fazla bulunan eritromisin direnç geni olduğu bilinmektedir. Duran ve arkadaşları, 159 KNS izolatında fenotipik olarak 61’inde eritromisin, 87’sinde klindamisin direnci saptarken yapılan PZR sonucu 18 adet *ermA*, 5 adet *ermB*, 37 adet *ermC* ve 8 adet *msrA* gen bölgelerinin varlığını gözlemlenmiştir (31). Bizim çalışmamızda ise *ermA* genine hiç rastlanmazken, *ermB* geni 30 suшта, *ermC* geni 32 suшта ve *msrA* geni ise 17 suшта saptanmıştır.

Tetrasiklin direncine, *tet* genleri neden olmaktadır. Çalışmamızda araştırılmak üzere *tetK* ve *tetM* genleri seçilmiş olup, KNS izolatlarımızda bu genler bulunamamıştır. Bu sonuç, MİK çalışmamızda tetrasiklin dirençli bulunan on adet suшта farklı *tet* genlerinin bulunduğunu veya diğer direnç mekanizmalarının kullanıldığını düşündürmektedir.

icaA, *IS256* ve *sasX* genleri stafilocoklarda biyofilm ile ilgili genler olup bakterinin virülansı açısından önemlidirler. Bu genleri bulunduran suşlarda antibiyotiklere karşı daha fazla direnç olması beklenmektedir (25). Çalışmamızda 2 suшта *icaA*, 13 suшта *IS256*, 9 suшта *sasX* genlerinin varlığı gözlemlenmiştir. Bir *S. epidermidis* suşunun bu üç gene birden sahip olup, test edilen birçok antibiyotiğe dirençli bulunduğu ve *mecA*, *aacA-aphD*, *ermB*, *ermC* ve *msrA* genlerine de sahip olduğu belirlenmiştir. Bu suшта olduğu gibi, birçok antibiyotik direnç ve virülans genine sahip KNS suşlarının varlığı, tedavisi güç enfeksiyonlara yol açabilmektedir.

Antibiyotik direnci gibi bir problem ile başa çıkabilmek ancak akılcı antibiyotik kullanımı ve enfeksiyon kontrol önlemleri ile mümkündür. Çalışmamızın sonuçları önemli bir hastane enfeksiyonu etkeni olan KNS’lerin antibiyotik direnci ve patogenezi hakkında önemli veriler içermektedir. İncelenen KNS suşlarının yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere karşı direnç kazanmış oldukları ve çeşitli virülans genlerini barındıran bu suşların dikkatle izlenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

TEŞEKKÜR

Çalışmamızda kullanılan suşların temininde yardımcı olan, Manisa Celâl Bayar Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji A.D. öğretim üyesi, sayın Prof. Dr. Semra KURUTEPE'ye çok teşekkür ederiz.

ETİK KURUL ONAYI

* Bu çalışma Etik Kurul İzni gerektirmemektedir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Şakar H, Mumcuoğlu İ, Aksu N, Karahan ZC, Kurşun Ş, Kuştımur S. Koagülaz negatif stafilokoklarda makrolid-linkozamid-streptogramin B grubu antibiyotiklere karşı nadir direnç genlerinin araştırılması. Mikrobiyol Bul. 2012;46(2):170-9.
2. Fox A. Bacteriology. In: Microbiology and Immunology On-line. University of South Carolina School of Medicine, Columbia South Carolina. 2016. Erişim Adresi: <http://www.microbiologybook.org/Turkish-bact/bactchapter13bturk.htm>.
3. Tunçcan Ö, Keten D, Dizbay M, Şenol E. Hematolojik malignansili hastalarda kan dolaşımı infeksiyonu etkeni koagülaz-negatif stafilokok türlerinde teikoplanin ve daptomisin duyarlılıkları. Flora. 2011;16(2):67-70.
4. Adaleti R, Nakipoglu Y, Ceran N, Tasdemir C, Kaya F, Tasdemir S. Prevalence of phenotypic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates to macrolide, lincosamide, streptogramin B, ketolid and linezolid antibiotics in Turkey. Braz J Infect Dis. 2010;14(1):11-14.

5. Yalçın B, Selek MB, Bektöre B, Hoşbul T, Özyurt M. (2014). Investigation of linezolid resistance in *Staphylococcus epidermidis*: First reported linezolid resistant coagulase negative staphylococcus in Turkey. *Turk J Med Sci*. 2014;44:1136-38.
6. Fernandes CJ, O'Sullivan MVN, Cai Y, Kong F, Zeng X, Gilbert GL, Kotsiou G. Agar dilution method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus* spp. *J Clin Microbiol*. 2007;45(12):4018-20.
7. Jain A, Agarwal J, Bansal S. Prevalence of methicilin resistant, coagulase negative staphylococci in neonatal intensive care units: Findings from a tertiary care hospital in India. *J Med Microbiol*. 2004;53(9):941-44.
8. Kaynarca S, Türkyılmaz S. Sığır mastitislerinden izole edilen stafülokoklarda metisilin direnci ve slaym pozitifliği. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*. 2010;16(4):567-72.
9. Jaffe RI, Lane JD, Albury S, Niemeyer DM. Rapid extraction from and direct identification in of clinical samples of meticilin resistant staphylococci using the PCR. *J Clin Microbiol*. 2000;38(9):3407-12.
10. Vanhoof R, Godard C, Content J, Nyssen HJ, Hannecart-pokorni R. Detection by polymerase chain reaction of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates of epidemic phage types. *J Med Microbiol*. 1994;41:282-90.
11. Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. Identification of methicilin resistance strains of Staphylococci by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol*. 1991;29(10):2240-44.
12. Deplano A, Vandendriessche S, Nonhoff C, Denis O. Genetic diversity among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates carrying the mecC gene in Belgium. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(6):1457-60.
13. Ng LK, Martin I, Alfa M, Mulvey M. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Mol Cell Probes*, 2001;15(4):209-15.
14. Martineau F, Picard FJ, Lansac N, Ménard C, Roy PH, Ouellette M. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(2):231-38.
15. Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch F, Etienne J. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins among staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(5):1062-66.
16. Kozitskaya S, Olson ME, Fey PD, Witte W, Ohlsen K, Ziebuhr W. Clonal analysis of *Staphylococcus epidermidis* isolates carrying of lacking biofilm mediating genes by multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol*. 2005;43(9):4751-57.
17. Kozitskaya S, Cho SH, Dietrich K, Marre R, Naber K, Ziebuhr W. The bacterial insertion sequence element IS256 occurs preferentially in nosocomial *Staphylococcus epidermidis* isolates: Association with biofilm formation and resistance to aminoglycosides. *Infect Immun*. 2004;72(2):1210-15.
18. Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. *J Clin Microbiol*. 1992;30(7):1654-60.

19. Soumya KR, Sugathan S, Mathew J, Radhakrishnan EK. Studies on coexistence of mec gene, IS256 and novel sasX gene among human clinical coagulase negative staphylococci. *3 Biotech*. 2016;6(2):233.
20. Bello-López JM, Noguerón-Silva J, Castañeda-Sánchez JI, Rojo-Medina J. Molecular characterization of microbial contaminants isolated from umbilical cord blood units for transplant. *Braz J Infect Dis*. 2015;19(6):571-77.
21. Orak F. Mardin Devlet Hastanesi'nde 2011-2013 yılları arasında metisiline dirençli stafilocoklarda direnç profilleri. *Türk Hij Deney Biyol Derg*. 2015;72(3):191-98.
22. Özel G, Aslan V, Bahar Erdem G, Çağatay M, Şencan İ, Mert A. Stafilocoklarda metisilin duyarlılığının belirlenmesinde oksasilin, sefoksitin, seftizoksim ve moksalaktam disk difüzyon yöntemlerinin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul*. 2011;45(2):258-65.
23. Peksel H. Hastane kökenli koagülaz negatif stafilocok suşlarında oksasilin direncinin müküller ve geleneksel yöntemlerle araştırılması. [Tıpta uzmanlık tezi]. İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi, 2006.
24. Khorshed A, Özbal Y. Kan kültürlerinden izole edilen koagülaz negatif stafilocokların tiplendirilmesi ve antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması. *Sağlık Bilim Derg*. 2012;21(3):153-63.
25. Tetik T, Eryılmaz M, Akın A. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen stafilocok suşlarında slime oluşumu ve antibiyotik direnci arasındaki ilişkinin araştırılması. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*. 2010;39(3):187-94.
26. Yücel, N., Anıl, Y. Çiğ süt ve peynir örneklerinden *Staphylococcus aureus* ve koagülaz negatif stafilocokların identifikasyonu ve antibiyotik duyarlılığı. *Türk Hij Deney Biyol Derg*. 2011;68(2):73-78.
27. Er H, Aşık G, Yoldaş Ö, Demir C, Keşli R. Kan kültürlerinde izole edilerek tanımlanan mikroorganizmaların ve antibiyotik direnç oranlarının belirlenmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*. 2015;45(1):48-54.
28. Smith DJ, Kaplan RL, Landau W, Trenholme GM. Speciation and antibiotic susceptibility patterns of coagulase-negative staphylococci. *Eur J Clin Microbiol*. 1982;1(4):228-32.
29. Hope R, Livermore DM, Brick G, Lillie M, Reynolds R. Non-susceptibility trends among staphylococci from bacteraemias in the UK and Ireland, 2001-2006. *J Antimicrob Chemother*. 2008;6(2):65-74.
30. Dokutan A, Hacıseyitoğlu D, Çağ Y ve ark. Klinik örneklerden izole edilen stafilocoklarda linezolid direnci ve antibiyotik duyarlılıkları. *Ortadoğu Tıp Dergisi*. 2017;9(1):19-23.
31. Duran N, Ozer B, Duran GG, Onlen Y, Demir C. Antibiotic resistance genes and susceptibility patterns in staphylococci. *The Indian Journal of Medical Research*. 2012;135(3):389-96.
32. Taşova Y. Dirençli Gram pozitif bakteri infeksiyonlarında güncel tedavi. *Yoğun Bakım Dergisi*. 2012;10(3):147-64.
33. Tuncer Ertem G, Öztürk B, Ataman Hatipoğlu Ç, İpekkan K, Erdem F, Adiloğlu AK. Stafilocok ve enterokok izolatlarının linezolid, daptomisin, teikoplanin ve fusidik aside in vitro duyarlılığı. *Ortadoğu Tıp Dergisi*. 2017;9(1):19-23.

34. Çiftçi N. Kan kültürlerinden izole edilen koagülaz negatif stafilocokların tür tayini ve antibiyotiklere direnç oranları. ANKEM Dergisi, 2016;30(1):7-11.
35. Ma XX, Wang EH, Liu Y, Luo EJ. Antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci (CoNS): emergence of teicoplanin-non-susceptible CoNS strains with inducible resistance to vancomycin. J Med Microbiol. 2011;60:1661-68.
36. Öngen B, Otağ F, Gürler N, Töreci K. Klinik örneklerden izole edilen stafilocok suşlarında fusidik asit ve diğer antimikrobik maddelere direnç. ANKEM Dergi. 2000;14(1):36-8.
37. Bathoorn E, Hetem DJ, Alphenaar J, Kusters JG, Bonten MJ. Emergence of high-level mupirocin resistance in coagulase-negative staphylococci associated with increased short-term mupirocin use. J Med Microbiol. 2012;50(9):2947-50.
38. Ünlü VG, Ünlü M, Yağmuroğlu A. Klinik örneklerden soyutlanan *Staphylococcus aureus* ve koagülaz negatif stafilocok izolatlarında mupirosin direnci. ANKEM Dergi. 2006;20(4):222-25.
39. Doğurman F, Akça G, Sipahi B, Sultan N. Kan örneklerinden soyutlanan stafilocok suşlarının antibiyotiklere direnç durumları. ANKEM Dergi. 2005;19(1):14-16.
40. Cuevas O, Cercenado E, Vindel A, Guinea J, Sánchez-Conde M, Sánchez-Somolinos M. Evolution of antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. in Spain: five nationwide prevalence studies, 1986 to 2002. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(11):4240-45.