

Kan Kültürlerinde Üreyen Gram-Pozitif Kokların Tanımlanması ve *mecA* ve *van* Genlerinin Saptanmasında Hızlı Genotip Testinin Değerlendirilmesi*

Evaluation of Rapid Genotype Assay for the Identification of Gram-Positive Cocci from Blood Cultures and Detection of *mecA* and *van* Genes

Barış GÜLHAN¹, Selahattin ATMACA², Tuncer ÖZEKİNCİ², Adnan SUAY²

¹ Tatvan Devlet Hastanesi, Bitlis.

¹ Tatvan State Hospital, Bitlis, Turkey.

² Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Diyarbakır.

² Dicle University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Diyarbakir, Turkey.

* Bu çalışma Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (DÜBAP) tarafından desteklenmiştir.

Geliş Tarihi (Received): 21.04.2011 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 11.07.2011

ÖZET

Sepsisli hastaların kan kültürlerinde üreyen bakteriyel patojenlerin hızlı ve doğru olarak tanımlanması, uygun tedaviye erken dönemde başlanması ve dolayısıyla morbidite ve mortalitenin azalması açısından büyük önem taşımaktadır. Günümüzde kullanılan otomatize kan kültür sistemleri, bakterilerin tespit edilme zamanını kısaltmış olsa da, optimum tedaviye yönlenmek için daha hızlı tanımlama sistemlerine gereksinim duyulmaktadır. Son yıllarda geliştirilen "genotip teknolojisi", biyotinlenmiş primerlerle DNA'nın multipleks amplifikasyonunu takiben membrana bağlı probolar kullanılarak hibridizasyona dayalı, sepsisin hızlı tanısı için kullanılan genetik bir testtir. Bu çalışmada, kan kültürlerinde üreyen gram-pozitif kokların tanımlanması ve *mecA* ve *van* gen varlığının hızlı tespitinde "Genotype® BC grampositive" testinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. DNA•STRIP® teknolojisine dayalı olan bu test, 17 gram-pozitif bakteri türünü tanımlayabilmekte ve eş zamanlı olarak metisilin ve vankomisin direncinde etkin olan genleri de (*mecA* ve *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3*) aynı aşamada belirleyebilmektedir. Çalışmaya, BACTEC™ Plus/F (Becton Dickinson, ABD) aerobik ve pediatrik kan kültür şişelerinde üreme saptanan 55 kan kültürü dahil edilmiştir. Gram-pozitif kok morfolojisi görülen şişelerde üreyen bakterilerin tanımlanmasında "Genotype® BC grampositive" (Hain Life Science, Almanya) test kiti kul-

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Barış Gülhan, Tatvan Devlet Hastanesi, Ek-2 Hizmet Binası, 13200 Tatvan, Bitlis, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 434 8261231/171, **E-posta (E-mail):** barisgulhan@gmail.com

lanılmıştır. İzolatlar aynı zamanda Phoenix PMIC/ID Panel (Becton Dickinson, ABD) ile de tanımlanmış ve antibiyotik duyarlılıkları belirlenmiştir. Çalışmamızda, Phoenix ile 55 kan kültürü izolatının 17'si *Staphylococcus epidermidis* [tümü metisiline dirençli (MR)], dokuzu *S.aureus* (biri MR), 18'i *S.hominis* (10'u MR), dördü *E.faecalis*, üçü *E.faecium* (biri vankomisine dirençli), ikisi *S.saprophyticus* (biri MR), biri *S.warneri* ve biri *S.haemolyticus* olarak tanımlanmıştır. Genotype® BC testi ile elde edilen sonuçlara göre, 46 (%83.6) örneğin Phoenix sistemi ile tam uyumlu olarak tanımlandığı izlenmiştir. Phoenix ile *S.saprophyticus* olarak tanımlanan iki örnekte Genotype® BC testi sadece *mecA* genini saptamış, kit panelinde yer almadığından bu suş tür düzeyinde tanımlanamamıştır. Buna karşın Genotype® BC, Phoenix ile metisilin direncinin tespit edilemediği beş örnekte *mecA* genini tespit etmiş; beş örnekte ise otomatize sistemle saptanamayan karışık üremeleri saptayabilmiştir. Ayrıca *vanA* geni taşıyan bir *E.faecium* izolatı Genotype® BC ile doğru bir şekilde ayırt edilebilmiştir. Sonuç olarak "Genotype® BC gram-pozitif" kan kültür testinin, pozitif kan kültür şişelerinden direkt olarak önemli gram-pozitif sepsis patojenlerini ve *mecA* ve *van* genlerini hızlı ve güvenilir bir şekilde saptayabildiği; polimikrobiyal enfeksiyonların belirlenmesinde üstünlük gösterdiği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda sepsis düşünlülen hastalarda DNA strip teknolojisine dayalı bu hızlı testin rutin olarak kullanılmasının klinik tanıya katkı sağlayacağı düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Kan kültürü; gram-pozitif kok; tanımlama; hızlı genetik test; sepsis; *mecA*; *van* genleri.

ABSTRACT

Rapid and accurate identification of bacterial pathogens grown in blood cultures of patients with sepsis is crucial for prompt initiation of appropriate therapy in order to decrease related morbidity and mortality rates. Although current automated blood culture systems led to a significant improvement in bacterial detection time, more rapid identification systems are still needed to optimise the establishment of treatment. Novel genotype technology which is developed for the rapid diagnosis of sepsis, is a molecular genetic assay based on DNA multiplex amplification with biotinylated primers followed by hybridization to membrane bound probes. The aim of this study was to evaluate the performance of "Genotype® BC gram-positive" test for the identification of gram-positive cocci grown in blood cultures and rapid detection of *mecA* and *van* genes. This test uses DNA•STRIP® technology which includes a panel of probes for identification of 17 gram-positive bacterial species and is able to determine the methicillin and vancomycin resistance mediating genes (*mecA* and *vanA*, *vanB*, *vanC1*, *vanC2/C3*) simultaneously, in a single test run. A total of 55 positive blood cultures from BACTEC™ Plus/F (Becton Dickinson, USA) aerobic and pediatric blood culture vials were included in the study. The isolates which exhibit gram-positive coccus morphology by Gram staining were identified by Genotype® BC gram-positive test (Hain Life Science, Germany). All of the samples were also identified with the use of Phoenix PMIC/ID Panel (Becton Dickinson, USA) and antibiotic susceptibilities were determined. Of the 55 blood culture isolates, 17 were identified as *Staphylococcus epidermidis* [all were methicillin-resistant (MR)], 9 were *S.aureus* (one was MR), 18 were *S.hominis* (10 were MR), 4 were *E.faecalis*, 3 were *E. faecium* (one was vancomycin-resistant), 2 were *S.saprophyticus* (one was MR), 1 was *S.warneri* and 1 was *S.haemolyticus*, by Phoenix automated system. "Genotype® BC gram-positive" test results revealed consistency with Phoenix system regarding bacterial identification in 46 (83.6%) of the samples. The two bacteria identified as *S.saprophyticus* by the Phoenix system could not be identified by the Genotype® BC test since this species were not included in the identification panel of the system, however, *mecA* gene were detected in these two samples by Genotype® BC test. Genotype® BC test detected *mecA* gene in five samples which were not detected as methicillin resistant by the Phoenix system. Besides polymicrobial growth was determined in five samples by Genotype® BC test, but not by the automated system. One *E.faecium* isolate with *vanA* gene was correctly identified by Genotype® BC test. In conclusion, Genotype® BC gram-positive test is a fast and reliable test for the identification of the most important gram-positive pathogens and *mecA* and *van* genes di-

rectly from positive blood culture bottles. This test was also found superior than the automated Phoenix system regarding the detection of polymicrobial growth. These data indicated that, routine use of DNA strip technology-based assay would be useful for clinical diagnosis in patients with sepsis.

Key words: Blood culture; gram-positive cocci; identification; rapid genetic assay; sepsis; *mecA*; *van* genes.

GİRİŞ

Yüksek mortalite oranlarının (%30-70) izlendiği sepsisli hastalarda, kan kültürlerinden izole edilen bakteriyel patojenlerin hızlı ve doğru olarak tanımlanması, uygun tedaviye erken dönemde başlanması açısından büyük önem taşımaktadır¹. Bunun sonucu olarak da morbidite ve mortalitenin azalması, hastanede kalış süresinin kısalması, hastane maliyetlerinin düşmesi ve gereksiz antibiyotik kullanımının önlenmesi sağlanmaktadır²⁻⁵.

Günümüzde birçok klinik mikrobiyoloji laboratuvarında standart yöntem olarak kullanılan otomatize kan kültür sistemleri, bakterilerin tanımlama sürecini önemli oranda kısaltmıştır^{2,6}. Sürekli takip ve okuma yapan bu sistemler, mikroorganizmanın CO₂ üretimini algılamakta ve pozitif sinyal oluşturarak ileri yöntemlerin (pasaj, tanımlama, antibiyogram) uygulanmasına olanak sağlamaktadır. Ancak yine de sonuçların raporlanması, pozitif sinyal alındıktan sonra en az iki günde gerçekleşmektedir. Dolayısıyla optimum tedaviye erken dönemde başlanabilmesi için daha hızlı tanımlama sistemleri gerekmektedir. Bu amaçla yeni geliştirilen bir teknik, pozitif Bactec aerobik ve pediatrik kan kültür şişelerinden izole edilen etkeni hızlı olarak tanımlamaktadır. DNA•STRIP® teknolojisine dayalı olan bu test (Genotype® BC gram-positive), 17 gram-pozitif bakteri türünü (*Staphylococcus aureus*, *S.epidermidis*, *S.haemolyticus*, *S.hominis*, *S.simulans*, *S.warneri*; *Streptococcus agalactiae*, *S.pneumoniae*, *S.pyogenes*, *S.mitis/oralis*, *S.bovis*, *S.anginosus/constellatus/intermedius/mutans/sanguis*, *S.dysgalactiae* ssp. *equisimilis*; *Enterococcus faecalis*, *E.faecium*, *E.gallinarum*, *E.casseliflavus*) saptayabilmektedir. Bu yöntemde aynı zamanda, metisilin direncine aracılık eden *mecA* geni ile vankomisin direncine yol açan *vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2/C3* genlerini de saptayan problemlerin olduğu bir panel yer almaktadır. Genotip teknolojisi, biyotinlenmiş primerlerle DNA'nın multipleks amplifikasyonunu takiben, membrana bağlı problemler kullanılarak hibridizasyon mekanizmasına dayanmaktadır.

Bu çalışmada "Genotype® BC gram-positive" test kitleri kullanılarak kan kültürlerinde üreyen gram-pozitif kokların tanımlanması ve *mecA* ve *van* gen varlığının hızlı tespiti amaçlanmış, elde edilen sonuçlar Phoenix sistemi ile elde edilen tanımlama ve antibiyogram sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, BACTEC™ Plus/F (Becton Dickinson Company, ABD) aerobik ve pediatrik kan kültür şişelerinde üreme saptanan 55 kan kültürü dahil edildi. Gram-pozitif kok morfolojisi görülen şişelerde, üreyen bakterilerin tanımlanmasında "Genotype® BC gram-positive" (Hain Life Science, Almanya) testi kullanıldı. Aynı zamanda örneklerin

pasajları yapılarak, Phoenix PMIC/ID Panel (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, ABD) ile de tanımlama ve antibiyogram yapıldı⁷. Hastalardan alınan iki kan kültüründen sadece birinde üreme olan tüpler, kontaminasyon olarak değerlendirilerek çalışmaya alınmadı.

Genotype® BC test prosedürü, üretici firma tarafından tanımlandığı şekilde üç fazda uygulandı. İlk olarak pozitif kan kültüründen DNA izolasyonu, özel kağıtların kullanıldığı (GENO•CARD®) bir teknoloji ile yapıldı. Kan kültür şişelerinden alınan 15 µl materyal, GENO•CARD®'ların belirlenmiş kısımlarına pipetlendi ve 37-40°C'de kurutuldu. Özel bir delgeç yardımıyla kurumuş olan GENO•CARD®'lardan elde edilen dört disk, amplifikasyon karışımının içine konuldu. Kontaminasyon kontrolü için disk eklenmeden önceki karışım da testlerde kullanıldı. Ardından biyotinlenmiş primerler kullanılarak multipleks amplifikasyon yapıldı. Son olarak, Auto-Lipa cihazında (Tecan ProfiBlot T48, Avusturya) strip bazlı ters hibridizasyon ile sonuçlar değerlendirildi.

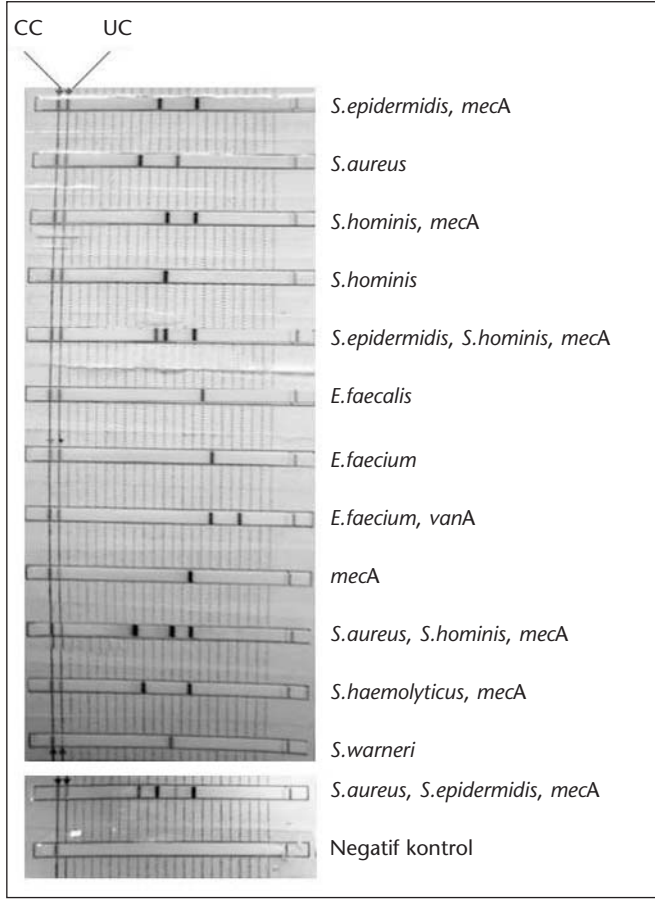
Çalışmada kullanılan stripler, kalite kontrol amaçlı iki ayrı zon içermektedir. Üniversal kontrol (UC) zonu, bütün bakteri türlerinde yaygın olarak bulunan yüksek düzeyde korunmuş DNA bölgelerini tespit etmekte olup, bakteriyel DNA varlığında, DNA izolasyonu ve amplifikasyonunun doğru olarak yapıldığını göstermektedir. Konjugat kontrol (CC) zonu ise, konjugatın stripe bağlandığını ve sonrasındaki doğru kromojenik reaksiyonun olduğunu ifade etmektedir (Resim 1).

BULGULAR

Çalışmamızda, Phoenix PMIC/ID Panel ile 55 kan kültürü izolatının 17'si *S.epidermidis* (tümü metisiline dirençli; MR), dokuzu *S.aureus* (biri MR), 18'i *S.hominis* (10'u MR), dördü *E.faecalis*, üçü *E.faecium* (biri vankomisine dirençli), ikisi *S.saprophyticus* (biri MR), biri *S.warneri* ve birisi *S.haemolyticus* olarak tanımlanmıştır. "Genotype® BC grampozitif ve" testi sonuçları değerlendirildiğinde, 46 (%83.6) örneğin Phoenix sistemi ile tam uyumlu olarak tanımlandığı izlenmiştir. Her iki yöntemle de elde edilen sonuçlar karşılaştırmalı olarak Tablo 1'de verilmiştir.

Phoenix ile MR *S.hominis* olarak tanımlanan üç örnekte, Genotype® BC ile *mecA* geni varlığı ve *S.hominis*'e ek olarak *S.epidermidis* tespit edilmiştir. Bir örnekte Phoenix ile metisiline duyarlı (MS) *S.hominis* sonucu alınmışken, Genotype® BC ile ek olarak *mecA* gen varlığı saptanmıştır. Phoenix ile *S.saprophyticus* olarak tanımlanan iki örnekte, Genotype® BC testi panelinde bu tür bulunmadığından tanımlama yapılamamış; ayrıca bu suşlardan biri Phoenix ile MS olarak saptanmasına rağmen Genotype® BC testinde *mecA* geni tespit edilmiştir. Benzer şekilde, Phoenix ile MS *S.haemolyticus* olarak tanımlanan bir suş da, Genotype® BC testinde tür tanımına ek olarak *mecA* pozitif sonuç vermiştir. Phoenix yönteminin MR *S.epidermidis* olarak tanımladığı örneklerden ikisinde Genotype® BC testi ile *S.epidermidis*'in yanı sıra ikinci bir tür daha tanımlanmıştır (*S.epidermidis*-*S.aureus*; *S.epidermidis*-*S.hominis*) (Tablo 1).

Çalışılan bazı örneklerle ait Genotype® BC testi sonuçları ise Resim 1'de görülmektedir.



Resim 1. Bazı örneklerle ait Genotype® BC testi sonuçları (CC: Konjugat kontrol, UC: Üniversal kontrol).

TARTIŞMA

Çeşitli çalışmalarda, moleküler yöntemler kullanılarak kan kültürlerinden mikroorganizmaların hızlı tanımlanması ve direnç genlerinin tespitinin klinik etkileri araştırılmış ve bu amaçla kullanılan yöntemlerin sonuçlara etkileri bildirilmiştir^{2,3,6,8-10}. Carver ve arkadaşları⁸, bakteriyemili hastalarda *mecA* geninin saptanması sonucunda antimikrobiyal tedaviye erken başlandığı için mortalitenin düştüğünü; Kerremans ve arkadaşları⁹ da, bakterilerin hızla tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesiyle antibiyotik kullanım oranının azaldığını bildirmişlerdir. Forrest ve arkadaşları¹⁰ ise, hastane kökenli enterokokal bakteriyemili hastaların erken teşhisi ve antimikrobiyal tedaviye erken başlanmasıyla, hastanede kalış süresinin 4-6 gün kısaldığını; kontaminant olan patojenlerin erken saptanmasının ise gereksiz ampirik vankomisin kullanımını önlediğini ifade etmişlerdir. Tüm bu veriler, hızlı bakteriyel tanımlamanın önemini vurgu-

Tablo 1. Kan Kültürlerinden İzole Edilen Gram-Pozitif Kokların Tanımlanmasında “Genotype® BC Gram-Pozitif” Testi ve Phoenix PMIC/ID Panel Sonuçlarının Karşılaştırılması (n= 55)

Örnek sayısı	Phoenix	Genotype® BC	
		Tanımlama	<i>mecA</i> / <i>van</i> genleri
15	MR <i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i>	<i>mecA</i>
1	MR <i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i> , <i>S.hominis</i>	<i>mecA</i>
1	MR <i>S.epidermidis</i>	<i>S.epidermidis</i> , <i>S.aureus</i>	<i>mecA</i>
8	MS <i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	-
1	MR <i>S.aureus</i>	<i>S.aureus</i>	<i>mecA</i>
7	MR <i>S.hominis</i>	<i>S.hominis</i>	<i>mecA</i>
7	MS <i>S.hominis</i>	<i>S.hominis</i>	-
1	MS <i>S.hominis</i>	<i>S.hominis</i>	<i>mecA</i>
3	MR <i>S.hominis</i>	<i>S.hominis</i> , <i>S.epidermidis</i>	<i>mecA</i>
4	<i>E.faecalis</i>	<i>E.faecalis</i>	-
2	<i>E.faecium</i>	<i>E.faecium</i>	-
1	VR <i>E.faecium</i>	<i>E.faecium</i>	<i>vanA</i>
1	MS <i>S.warneri</i>	<i>S.warneri</i>	-
1	MS <i>S.haemolyticus</i>	<i>S.haemolyticus</i>	<i>mecA</i>
1	MS <i>S.saprophyticus</i>	NT	<i>mecA</i>
1	MR <i>S.saprophyticus</i>	NT	<i>mecA</i>

Phoenix: Phoenix PMIC/ID Panel; Genotype®BC: Genotype®BC gram-pozitif testi; MR: Metisiline dirençli; MS: Metisiline duyarlı; VR: Vankomisine dirençli; NT: Test panelinde olmadığından tanımlama yapılamadı (tam uyumlu sonuçlar koyu renk ile belirtilmiştir).

lamaktadır. Bu amaçla son zamanlarda geliştirilen ve DNA•STRIP® teknolojisine dayanan “Genotype® BC grampositive” testi 17 farklı gram-pozitif bakteri türünü kısa zamanda tanımlayabilmekte ve ayrıca eş zamanlı olarak metisilin (*mecA*) ve vankomisin (*vanA*, *vanB*, *vanC1* ve *vanC2/C3*) direnç genlerini de saptayabilmektedir. Bu yöntemin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulanması oldukça pratik ve kolay olup, test için ortalama 15 µl olmak üzere çok düşük miktarda başlangıç materyali gerekmektedir. Testin değerlendirilmesi, stripler üzerindeki reaksiyon zonlarının okunmasıyla yapılmakta ve sonuçların alınması Gram boyamadan sonra 4.5 saatlik bir sürede gerçekleştirilmektedir.

Literatür incelendiğinde “Genotype® BC gram-positive” testinin kullanıldığı iki çalışmaya ulaşılabilmektedir^{2,6}. Eigner ve arkadaşları², “Genotype® BC gram-positive (Hain Life Science, Almanya)” testinin analitik duyarlılığını belirlemek için, referans suşları kan kültür şişelerine inoküle etmişler ve bu yöntemle yaklaşık olarak 10⁴ koloni oluşturan birim (cfu)/ml’nin tespit edilebildiğini bildirmişlerdir. Kullanılan referans suşlar değerlendirildiğinde, saptama sınırı *E.coli* ATCC 25922 için 1.2 x 10⁴ cfu/ml, *S.aureus*

ATCC 25923 için 1.4×10^4 cfu/ml, *S.pneumoniae* ATCC 33400 için 4.6×10^4 cfu/ml ve *S.epidermidis* ATCC 35547 için 3.2×10^4 cfu/ml olarak belirlenmiştir. Çalışmada 53 *S.aureus*, 50 *S.epidermidis*, 25 diğer koagülaz-negatif stafilocoklar, 12 *S.pneumoniae*, yedi *E.faecalis* ve beş *E.faecium* olmak üzere 152 gram-pozitif kok izole edilmiş; konvansiyonel yöntemlerle karşılaştırıldığında Genotype® BC testinin bunlardan 148'ini doğru olarak tanımladığı görülmüştür². Biri *Streptococcus bovis*, biri *S.aureus* ve ikisi *S.epidermidis* olmak üzere dört suş ise tespit edilememiştir. Mikroskopik analizden sonra sonucun elde edilmesi dört saat sürmüştür. Sonuç olarak araştırmacılar, bu testin hızlı ve güvenilir sonuçlar verdiğini rapor etmişler; ayrıca diğer testlere göre kolay manipülasyon ve otomatizasyona uyurlanabilirlik gibi avantajlarının olduğunu vurgulamışlardır². Prère ve arkadaşlarının⁶ çalışmasında ise, BacT/ALERT şişelerinde pozitif sonuç veren ve Gram boyama sonucu gram-pozitif kokların görüldüğü 25 kan kültürü, "Genotype® BC gram-positive (Hain Life Science, Almanya)" kiti ile değerlendirilmiş ve sonuçlar 4.5 saat gibi kısa bir süre içinde elde edilmiştir. Çalışmada *S.hominis*, *S.epidermidis* + *E.faecalis*, *S.dysgalactiae*, *S.bovis*, *E.gallinarum*, *E.casseliflavus*, *E.faecium*, *S.epidermidis* ve *S.aureus* [*mecA*(+)] türleri saptanmıştır. Test panelinde olmadığı için bir adet *Staphylococcus capitis* suşu tespit edilememiş; bunun dışında Genotype® BC ile elde edilen sonuçlar, biyokimyasal testlerle ve antibiyotik duyarlılık testleriyle elde edilen sonuçlarla uyumlu bulunmuştur.

Kan kültürlerinde, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi moleküler yöntemlerle tanıya gidilirken karşılaşılan en önemli sorun, örnekteki inhibitörlerdir^{11,12}. Al-Soud ve arkadaşları^{13,14} iki ayrı çalışmada, insan plazmasında IgG ve laktoferrin gibi majör PCR inhibitörlerinden bahsetmişlerdir. Ancak Prère ve arkadaşları⁶, kandaki inhibitör maddelerden ya da kan kültür şişelerinin içeriğindeki kömür tozlarından kaynaklanan bir inhibisyon gözlememişler ve GENO•CARD® DNA izolasyon sistemiyle potansiyel inhibitörlerin elimine edildiğini iddia etmişlerdir. Nitekim araştırmacılar, BacT/ALERT şişelerinin organik kömür içermesi nedeniyle Gram boyamada problem yaşandığını, bakterilerin kömür tozlarının altında kaldığını belirtmektedirler⁶. Dolayısıyla bu teknoloji, gram-pozitif bakterilerin yüksek kalitede bakteriyel lizisine izin vermektedir. Genotype® BC testinde, standart termal döngü cihazı dışında boya, elektroforez ve görüntüleme sistemi gibi herhangi bir özel ekipmana gereksinim duyulmaması da, Prère ve arkadaşları⁶ tarafından bu testin üstünlükleri arasında sayılmıştır.

Bizim çalışmamızda, "Genotype® BC gram-positive" testi ile alınan sonuçlar, Phoenix PMIC/ID Panel ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında, %83.6 (46/55) oranında tamamen aynı oldukları izlenmiştir (Tablo I). Ayrıca *vanA* geni taşıyan bir *E.faecium* izolatu bu testle doğru bir şekilde ayırt edilebilmiştir. Üç örnekte Phoenix ile MR *S.hominis* sonucu alınmış, ancak Genotype® BC testi ile *mecA* geni ve *S.hominis*'e ek olarak *S.epidermidis* tanımlaması yapılmıştır. Yine Phoenix ile MR *S.epidermidis* olarak tanımlanan iki örnekten birinde *mecA* ve *S.epidermidis*'e ek olarak *S.hominis*, diğerinde ise ek olarak *S.aureus* saptanmıştır. Oysa kanlı agar besiyerindeki üremeler değerlendirilirken iki stafilocok türünü ayırt etmek mümkün olmamış, Gram boyama da bu konuda yetersiz kalmıştır. Dolayısıyla bu testin polimikrobiyal (mixed) enfeksiyonları tespit etmede otomatize sis-

teme göre üstün olduğu görülmüştür. Çalışmamızda, Phoenix ile *S.saprophyticus* tanımlamasının yapıldığı iki örnekte Genotype® BC testi sadece *mecA* genini saptamış, kit panelinde yer almadığından bu suş tür düzeyinde tanımlanamamıştır. Buna karşın Genotype® BC, Phoenix ile metisilin direncinin tespit edilemediği beş örnekte *mecA* genini tespit etmiştir. Çelişkili sonuç alınan bu örnekler, oksasilin disk difüzyon testi ile tekrar çalışılmış ve Phoenix otomatize sistemi ile aynı sonuç elde edilmiştir. Bu durum, metisilin direncinin tespitinde *mecA* geninin altın standart olduğu göz önüne alındığında, otomatize sistemin bu konuda bazen yetersiz kaldığı yönünde bir izlenim oluşturmıştır. Bir diğer olasılık olarak da, bu sonucun, çalışılan izolatların özelliklerinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Zira bazı suşlar *mecA* genini taşımalarına rağmen metisiline duyarlı olarak görülebilmektedir¹⁵. Yine pentaglisin köprülerinin oluşumundan sorumlu fem mutasyonlarında, *mecA* varlığına karşın beta-laktam minimum inhibitör konsantrasyonu düzeylerinin yükselmediği göz önüne alınırsa, bu suşlarda *fem* genindeki bir mutasyonun olması da ihtimal dahilindedir¹⁶.

Yapılan çalışmalarda, kan kültürlerinden direkt tanı amacıyla birçok farklı moleküler yöntem kullanılmaktadır^{1,10,11,17-24}. Bu yöntemlerin maliyeti yüksek olmakla birlikte, sonuçların hızlı bir şekilde elde edilmesi sonucu doğru ve erken tedaviye olanak vermesi nedeniyle, morbidite ve mortalite oranlarında azalma ve hastanede yatış süresinde kısalmayı sağlayarak hastane maliyetlerini azalttığı ifade edilmekte ve hızlı testlerin fazladan bir ekonomik yük getirmediği vurgulanmaktadır²⁻⁵. Dolayısıyla, özellikle sepsis gibi hayatı tehdit eden durumlarda, bir testin tanımlama ve antibiyotik duyarlılık sonuçlarını aynı gün içinde ve doğru olarak vermesiyle sağlanan zaman kazancı son derece önemlidir. Bu özellikler dikkate alındığında Genotype® BC testinin oldukça umut vadettiği görülmektedir. Bu test ayrıca, diğer moleküler yöntemlere göre uygulama açısından birçok üstünlüğe sahiptir. Bunlar arasında; termal döngü cihazı dışında başka özel bir donanım gerektirmemesi, DNA izolasyonunun özel kartlar üzerinde kolayca ve kısa sürede (15 dakika) yapılması, PCR yönteminin doğrudan bu kartlar kullanılarak uygulanması, PCR inhibitörlerinin ek işlemlere gerek kalmaksızın GENO•CARD® teknolojisi ile elimine edilmesi, stripe dayalı ters hibridizasyon aşamasındaki kolaylıklar (manuel ya da Auto-Lipa cihazı ile yapılabilmesi, agaroz jel elektroforezine gerek olmaması), test striplerinin iki ayrı internal kontrol zonu içermesi gibi avantajlar sayılabilir. Mikrobiyolojik üstünlükleri ise, 17 gram-pozitif bakteri türünü tek bir test ile aynı anda tanımlayabilmesi ve özellikle hastane patojenleri için önem taşıyan metisilin ve vankomisin direncine yol açan genleri saptayabilmesidir.

Sonuç olarak çalışmamızda, "Genotype® BC gram-positive" testinin önemli gram-pozitif sepsis patojenlerini, *mecA* ve *van* genlerini, direkt olarak pozitif kan kültürlerinden hızlı ve güvenilir bir şekilde saptadığı belirlenmiş; gram-pozitif koklara bağlı sepsisin hızlı tanısı ve tedavinin yönlendirilmesi açısından DNA strip teknolojisine dayalı bu testin rutin tanıda pratik olarak kullanılabileceği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Kempf VA, Trebesius K, Autenrieth IB. Fluorescent in situ hybridization allows rapid identification of micro-organisms in blood cultures. J Clin Microbiol 2000; 38(2): 830-8.
2. 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): 5256-62.
3. 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): 976-81.
4. 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): 1757-62.
5. Trenholme GM, Kaplan RL, Karakusis PH, et al. Clinical impact of rapid identification and susceptibility testing of bacterial blood culture isolates. J Clin Microbiol 1989; 27(6): 1342-5.
6. Prère MF, Baron O, Fayet O. Rapid identification of bacteria, *mecA* and *van* genes from blood cultures. Pat-hol Biol (Paris) 2007; 55(8-9): 375-7.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard, Document M7-A6. 2003, 6th ed. NCCLS/CLSI, Wayne, PA.
8. 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): 2381-3.
9. Kerremans JJ, Verboom P, Stijnen T, et al. Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing reduce antibiotic use and accelerate pathogen-directed antibiotic use. J Antimicrob Chemother 2008; 61(2): 428-35.
10. Forrest GN, Roghmann MC, Toombs LS, et al. Peptide nucleic acid fluorescent in situ hybridization for hospital-acquired enterococcal bacteremia: delivering earlier effective antimicrobial therapy. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(10): 3558-63.
11. 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): 2786-90.
12. 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): 2810-6.
13. Al-Soud WA, Radström P. Purification and characterization of PCR inhibitory components in blood cells. J Clin Microbiol 2001; 39(2): 485-93.
14. 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): 345-50.
15. Ünal S. *Staphylococcus aureus*: direnç mekanizmaları, s: 23-38. Ulusoy S, Usluer G, Ünal S (ed), Önemli ve Sorunlu Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. 2004. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara.
16. Rice LB, Bonomo RA. Mechanisms of resistance to antimicrobial agents, pp: 1114-45. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds), Manual of Clinical Microbiology. 2007, 9th ed. ASM Press, Washington DC.
17. Anthony RM, Brown TJ, French GL. Rapid diagnosis of bacteremia by universal amplification of 23S ribosomal DNA followed by hybridization to an oligonucleotide array. J Clin Microbiol 2000; 38(2): 781-8.
18. Marlowe EM, Hogan JJ, Hindler JF, Andruszkiewicz I, Gordon P, Bruckner DA. Application of an rRNA probe matrix for rapid identification of bacteria and fungi from routine blood cultures. J Clin Microbiol 2003; 41(11): 5127-33.
19. Lindholm L, Sarkkinen H. Direct identification of gram-positive cocci from routine blood cultures by using AccuProbe tests. J Clin Microbiol 2004; 42(12): 5609-13.
20. Wellinghausen N, Wirths B, Essig A, Wassill L. Evaluation of the Hyplex BloodScreen multiplex PCR-enzyme-linked immunosorbent assay system for direct identification of gram-positive cocci and gram-negative bacilli from positive blood cultures. J Clin Microbiol 2004; 42(7): 3147-52.

21. Pingle MR, Granger K, Feinberg P, et al. Multiplexed identification of blood-borne bacterial pathogens by use of a novel 16S rRNA gene PCR-ligase detection reaction-capillary electrophoresis assay. J Clin Microbiol 2007; 45(6): 1927-35.
22. Sakai H, Procop GW, Kobayashi N, et al. Simultaneous detection of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in positive blood cultures by real-time PCR with two fluorescence resonance energy transfer probe sets. J Clin Microbiol 2004; 42(12): 5739-44.
23. Shrestha NK, Tuohy MJ, Padmanabhan RA, Hall GS, Procop GW. Evaluation of the LightCycler *Staphylococcus* M GRADE kits on positive blood cultures that contained gram-positive cocci in clusters. J Clin Microbiol 2005; 43(12): 6144-6.
24. Ruimy R, Dos-Santos M, Raskine L, et al. Accuracy and potential usefulness of triplex real-time PCR for improving antibiotic treatment of patients with blood cultures showing clustered gram-positive cocci on direct smears. J Clin Microbiol 2008; 46(6): 2045-51.