



Metisiline Dirençli Stafilocoklarda Azalmış Vankomisin Duyarlılığının Araştırılması

Fatma AVCIOĞLU ¹, C. Elif ÖZTÜRK ², İdris ŞAHİN ², Şükrü ÖKSÜZ ²,
Arif KIZILIRMAK ², Nida AKAR ³

ÖZ

Amaç: Son yıllarda metisilin dirençli stafilocoklarda glikopeptid grubu antibiyotiklere karşı azalmış duyarlılıktan söz edilmektedir. Hastanemiz mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerde vankomisine dirençli (VRS), azalmış duyarlı (VIS) ve heterojen dirençli (hVIS) stafilocok suşlarını araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntemler: Toplam 341 stafilocok suşu incelemeye alındı. *S. aureus* izolatlarında metisilin direncini saptamada, oksasilin agar tarama testi kullanıldı. Koagülaz negatif stafilocok izolatlarında metisilin direncinin saptanmasında oksasilin disk difüzyon testine göre duyarlılığı ve özgülüğü daha yüksek olan sefoksitin disk difüzyon (30 µg) yöntemi kullanıldı. Metisiline karşı dirençli bulunan stafilocoklarda vankomisin direncini saptamada; vankomisin agar tarama, standart E-test, Makro E-test ve popülasyon analiz profili yöntemleri kullanıldı.

Bulgular: *S. aureus* izolatlarının 115'i (%54,2) metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA), koagülaz negatif stafilocok izolatlarının 66'sı (%51,2) metisilin dirençli koagülaz negatif stafilocok (MRKNS) olarak bulundu. 181 metisilin dirençli stafilocok suşunun vankomisin agar tarama yöntemine göre ilk 24 saatte sadece ikisinde kuşku vankomisine duyarlılığı azalmış stafilocok suşu (VIS) üremesi saptandı. Üreme saptanan suşların her ikisi de *S. aureus* idi. Metisilin dirençli *S. aureus* suşları standart E Test ve Makro E Test incelemelerinde vankomisine duyarlı olarak bulundu. PAP yöntemi ile hiçbir suşta vankomisin direnci saptanmadı.

Sonuç: Çalışmamıza göre laboratuvarımızda izole edilen metisilin dirençli stafilocoklarda vankomisine karşı direnç (VRS), azalmış duyarlılık (VIS) ve heterojen direnç (hVIS) saptanmamıştır. Bu seçkin antibiyotiğin özenli kullanılmasının, gerek tedavi öncesi, gerekse tedavi sırasında hastaların mikrobiyolojik yönden yakın izleminin önemli ve gerekli olduğu düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: *Staphylococcus aureus*; direnç; vankomisin.

Investigation of Decreased Vancomycin Susceptibility in Methicillin Resistant Staphylococci

ABSTRACT

Aim: In recent years, decreased susceptibility to glycopeptide group antibiotics has been reported in methicillin resistant staphylococci. We aimed to investigate vancomycin resistant (VRS), vancomycin intermediate (VIS) and heterogeneous resistant (hVIS) staphylococci strains in various clinical specimens sent to our hospital microbiology laboratory.

Material and Methods: A total of 341 staphylococcus strains were examined. Oxacillin agar screening test was used to determine methicillin resistance in *S. aureus* isolates. In the determination of methicillin resistance in coagulase negative staphylococci isolates, disc diffusion (30 µg) method with higher sensitivity and specificity than oxacilin disc diffusion test was used. To determine vancomycin resistance in methicillin-resistant staphylococci; vancomycin agar screening, Standard E-test, Macro E-test and Population analysis profile methods were used.

Results: 115 (54.2%) of *S. aureus* isolates were methicillin resistant *S. aureus* (MRSA), 66 (51.2%) of coagulase negative staphylococci isolates were found to be methicillin resistant coagulase negative staphylococci (MRCNS). Of the 181 methicillin-resistant staphylococcus strains, only two [strains of suspected vancomycin-susceptible staphylococcus strain (VIS)] were detected in the first 24 hours according to vancomycin agar screening method. Both strains were *S. aureus*. Methicillin-resistant *S. aureus* strains were found to be susceptible to vancomycin in standard

1 Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Bolu, Türkiye

2 Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Düzce, Türkiye

3 Hacettepe Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Mikoloji Laboratuvarı, Ankara, Türkiye

Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Fatma AVCIOĞLU, e-mail: fatmaavcioglu@yahoo.com.tr

Geliş Tarihi / Received: 14.06.2019, Kabul Tarihi / Accepted: 31.12.2019

E Test and Macro E Test examinations. No vancomycin resistance was detected by PAP method.

Conclusion: According to our study, vancomycin resistance (VRS), vancomycin intermediate (VIS) and heterogeneous resistance (hVIS) were not detected in methicillin resistant staphylococci isolated in our laboratory. Careful use of this selective antibiotic and microbiological follow-up of the patients before and during treatment were considered important and necessary.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; resistance; vancomycin.

GİRİŞ

Genel olarak mikroorganizmalarda antibiyotiklere karşı hızla gelişen direnç mekanizmalarından dolayı bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde ciddi sorunlar yaşanmakta ve bu da yeni antibiyotiklere duyulan ihtiyacı arttırmaktadır. Gram pozitif koklar, özellikle de metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) türleri hastane kaynaklı enfeksiyonlarda önemli yer tutmaktadır (1,2). Son yıllarda, MRSA enfeksiyonlarının epidemiyolojisinde önemli değişiklikler meydana gelmiştir. Bunlardan birincisi *S. aureus* izolatlarında görülen metisilin direnç oranlarındaki artıştır (2). İkinci önemli değişiklik, bazı merkezlerde MRSA izolatlarında görülen vankomisin duyarlılığındaki azalmadır. Bu izolatların vankomisin MİK değerleri ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ olmak üzere duyarlı sınırlarında olmasına rağmen, vankomisin tedavisi ile başarısız klinik sonuçlar elde edilmektedir. Üçüncüsü, MRSA izolatları arasında vankomisine orta düzeyde duyarlı *S. aureus* (VISA), heterojen VISA (hVISA) ve vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA)'ların ortaya çıkmasıdır. Dördüncü önemli değişiklik ise MRSA sorununun sadece hastanelerde sınırlı kalmayıp toplumda da görülmeye başlamasıdır (3). Bu sebeplerden dolayı çalışmamızda Ocak 2010-Kasım 2013 tarihleri arasında hastanemiz mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen stafilocok suşlarında vankomisin direncini (VIS, hVIS, VRS varlığını) araştırmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Örneklem Grubunun Oluşturulması ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri

2012/257 nolu etik kurul onayı ile gerçekleştirilen bu çalışmada Ocak 2010-Kasım 2013 tarihleri arasında mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden (idrara, balgam, kan, yara sürüntüsü, bronş lavaj sıvısı, katater ucu... vb.) izole edilen toplam 341 stafilocok suşu incelemeye alındı. İzolatların tanımlanmasında konvansiyonel laboratuvar yöntemleri ve otomatize sistemler kullanıldı. Koagülaz negatif stafilocokların (KNS) tiplendirilmesinde VITEK® 2 otomatize sistem (Biomeriux, Fransa) kullanıldı.

Metisilin direncini belirlemede PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile mecA geninin tespiti altın standart olarak kabul edilmektedir. Moleküler tekniklerin pahalı ve zaman alıcı olması sebebiyle rutin olarak kullanma imkânı olmadığından, metisilin direncini gösteren fenotipik yöntemler çalışmamızda kullanılmıştır. *S. aureus* izolatlarında metisilin direncini saptamada, Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), 2010 önerileri doğrultusunda oksasiline agar tarama testi

kullanıldı. Kontrol suşu olarak *S. aureus* ATCC 29213 ve ATCC 25923 kullanıldı (4). KNS'lerde metisilin direncinin saptanmasında oksasiline disk difüzyon testine göre duyarlılığı ve özgüllüğü daha yüksek olan sefoksitin disk difüzyon (30 μg) yöntemi kullanıldı (5). CLSI tarafından belirlenen direnç sınır değerlerine göre inhibisyon zon çapı ≤ 21 mm olan izolatlar dirençli, ≥ 22 mm olan izolatlar ise duyarlı olarak kabul edildi (6-8). Kontrol suşu olarak *S. aureus* ATCC 25923 ve *S. aureus* ATCC 43300 kullanıldı. Çalışma 2015, European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) geçiş yılı, öncesinde yapıldığı için stafilocokların metisilin direncini tespit etmede ve yorumlamada CLSI kriterleri kullanıldı.

Vankomisin direncinin belirlenmesi ve yorumu

Metisiline dirençli bulunan stafilocok suşları 6 $\mu\text{g/ml}$ vankomisin içeren beyin kalp infüzyon agar (BKİA) besiyerine ekildi. Tarama besiyerlerinde 24. saatte üreyen bakteriler, kuşkulu vankomisine duyarlılığı azalmış stafilocok suşu (VIS), 48. saatte üreyen bakteriler ise kuşkulu heterojen vankomisine duyarlılığı azalmış stafilocok suşu (hVIS) olarak kabul edildi. Üreme göstermeyen izolatlar ise vankomisine duyarlı olarak değerlendirildi (9).

Tarama besiyerinde üreyen stafilocok suşlarına bir ileri basamak olarak standart E-test, Makro E-test ve altın standart yöntem olarak kabul edilen popülasyon analiz profili (PAP) yöntemi uygulandı.

Standart E-test yönteminde, vankomisin MİK değerleri *S. aureus* için ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ duyarlı, 4-8 $\mu\text{g/ml}$ orta duyarlı, ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ dirençli; KNS için ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$ duyarlı, 8-16 $\mu\text{g/ml}$ orta duyarlı, ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ dirençli kabul edildi. Kontrol suşu olarak *S. aureus* ATCC 29213 kullanıldı (9). Makro E-test yönteminde, vankomisin MİK değerleri ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ olan izolatlar VIS/hVIS olarak yorumlandı.

PAP-AUC yönteminde, 0,5 McFarland ve bunun 10 kat seri dilüsyonlarından 50'şer μl alınarak (toplam altı kez dilüe edilerek) her bir süspansiyondan, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 $\mu\text{g/ml}$ vankomisin içeren BKİA besiyerlerinden her birine ayrı ayrı ekim yapıldı. 35°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra, koloni sayımları gerçekleştirildi. Plaklarda her bir konsantrasyonda üreyen kolonilerin sayıları y eksenine, antibiyotik konsantrasyonları ise x eksenine yerleştirilerek grafikleri çizildi. Her bir suş için eğri altındaki alan (AUC) Microsoft Excel programıyla hesaplandı. Elde edilen değer, standart hVISA suşu olan Mu3 için hesaplanan AUC değerine bölünerek bir oran elde edildi. Bu oran $\leq 0,90$ ise vankomisine duyarlı stafilocok, 0,90-1,3 ise hVIS, $\geq 1,3$ ise VIS olarak değerlendirildi (9). Kontrol suşu olarak Mu3 (hVISA) ve Mu50 (VISA) kullanıldı.

BULGULAR

Toplam 341 stafilocok etken olarak izole edildi. Bunlardan 212'si (%62,2) *S. aureus*, 129'u (%37,8) KNS idi. KNS suşlarının 41'i (%31,8) *S. hominis*, 38'i (%29,5) *S. epidermidis*, 28'i (%21,7) *S. haemolyticus* ve 22'si (%17) diğer stafilocok türlerindendi. *S. aureus* izolatlarının 115'i (% 54,2) MRSA, 97'si (%45,8) MSSA olarak saptandı. KNS izolatlarının ise 66'sı (%51,2) metisilin dirençli KNS (MRKNS), 63'ü (%48,8) metisilin duyarlı KNS (MSKNS) olarak bulundu. Tüm stafilocokların (*S. aureus* ve KNS) metisilin direnç

oranları Tablo 1’de gösterildi.

Tablo 1. İncelenen tüm stafilocok suşlarında metisilin direnç oranlarının dağılımı

İzolat türü	Sayı	%
MRSA	115	33,7
MRKNS	66	19,4
MSSA	97	28,4
MSKNS	63	18,5
Toplam	341	100,0

MRSA: Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus*, MRKNS: Metisilin dirençli koagülaz negatif stafilocok, MSSA: Metisilin duyarlı *Staphylococcus aureus*, MSKNS: Metisilin duyarlı koagülaz negatif stafilocok

Tüm stafilocokların gönderildiği kliniklere ve örnek türlerine göre dağılımları Tablo 2 ve Tablo 3’te ayrıntılı olarak gösterildi. MRSA ve MRKNS’nin yoğun bakım ünitelerinde; yara, kan ve katater ucu kültür örneklerinde diğer klinikler ve örneklere göre daha fazla ürettiği görüldü. MSSA ve MSKNS örnekleri ise acil serviste; kan ve katater ucu kültür örneklerinde daha fazla belirlendi.

Tablo 2. İzolatların kliniklere göre dağılımı ve yüzdesi

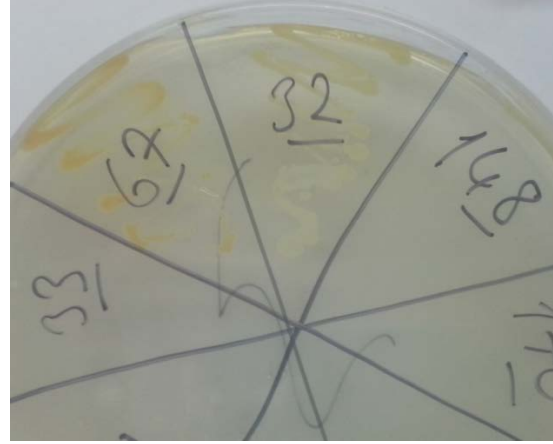
Klinik	Sayı	%
Acil Servis	76	22,3
Beyin ve Sinir Cerrahisi Kliniği	55	16,2
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği	27	7,9
Dermatoloji Kliniği	18	5,3
Dahili Yoğun Bakım Servisi	14	4,1
Enfeksiyon Hastalıkları Kliniği	28	8,2
İç Hastalıkları Kliniği	22	6,5
Koroner Yoğun Bakım Ünitesi	13	3,8
Nöroloji Servisi	7	2,1
Ortopedi Kliniği	24	7,1
Pediyatri Yoğun Bakım Servisi	20	5,9
Reanimasyon Servisi	11	3,2
Üroloji Kliniği	15	4,4
Diğerleri	11	3,3
Toplam	341	100

Tablo 3. İzolatların örnek türlerine göre dağılımı ve yüzdesi

Örnek Türü	Sayı	%
Kan ve Katater	152	44,6
Yara yeri	98	28,7
İdrar	52	15,2
Balgam ve Trakeal aspirat	28	8,2
Doku	7	2,1
Periton sıvısı	4	1,2
Toplam	341	100

Metisilin dirençli stafilocoklarda vankomisin direncini saptamada tarama yöntemi olarak kullanılan vankomisin agar besiyerine ekilen 181 metisilin dirençli stafilocok (*S.*

aureus ve KNS) suşunun ilk 24 saatte sadece ikisinde üreme saptandı. Şekil 1’de üreme görülen koloniler gösterildi. Üreme saptanan suşların her ikisi de *S. aureus* idi. 48. saatte yeni üreme hiç olmadı. Vankomisinli agar tarama yöntemi sonuçları Tablo 4’te gösterildi.



Şekil 1. Vankomisin agarda 24. saatte üreme görülen koloniler

Tablo 4. Vankomisinli agar tarama yöntemi sonuçları

İzolat türü	24. saatte üreme	48. saatte üreme
MRSA	2	-
MRKNS	-	-
Toplam	2	0

Vankomisinli agar tarama yönteminde üreme görülen MRSA suşları 1 ve 2 numaralı izolatlar olarak isimlendirildi. Bu MRSA suşları standart E Test ve Makro E Test incelemelerinde vankomisine duyarlı olarak bulundu. Test sonuçları Tablo 5’te gösterildi.

Tablo 5. 1 ve 2 numaralı izolatların standart ve Makro E test sonuçları

Suş numarası	Standart E test Sonucu (µg/ml)	Makro E test Sonucu (µg/ml)
1 Numaralı	1,5	3
2 Numaralı	2	4

PAP Yöntemi Sonuçları

Vankomisinli agar tarama yöntemi ile şüpheli bulunan hVIS/VIS suşlarının hiçbirinde PAP yöntemi ile vankomisine direnç saptanmamıştır.

TARTIŞMA

Penisilin 1928 yılında Alexander Fleming tarafından bulunması ile stafilocokal enfeksiyonların tedavisinde önemli bir aşama kaydedilmiştir. Stafilocokların penisilinaz üretmesiyle 1944’de penisilin direnci giderek artmış, 1950’li yıllarda penisilin yan sıra eritromisin, tetrasiklin, streptomisin gibi diğer antibiyotiklere de direnç geliştirmiştir (10). Penisilinaza dirençli penisilinlerin (metisilin), 1960’da kullanıma girilmesiyle birlikte stafilocokal enfeksiyonların tedavisinde ikinci önemli aşama kaydedilmiştir. Ancak çok kısa bir süre içerisinde (1961) stafilocoklarda metisilin direnci tanımlanmış ve 1970’li yıllardan itibaren de MRSA suşlarında çoklu antibiyotik direnci problemi ortaya çıkmıştır. Direnç

probleminin artmasıyla birlikte MRSA tüm dünyada nozokomiyal epidemilere yol açan ciddi bir sağlık sorunu haline gelmiştir (10). Özellikle yoğun bakım ünitelerinde olmak üzere MRSA enfeksiyonları giderek artan oranlarda rapor edilmektedir (1). MRSA bakteriyemisi gibi ciddi klinik tablolarda hastanede yatış süresi belirgin olarak uzamakta ve medikal maliyet oranları daha fazla olmaktadır (11).

Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yoğun bakım ünitelerinde *S. aureus* izolatları arasında metisilin direncinin prevalansı %60'tır (12). Ülkemizde 2003-2004 yıllarında yapılan yayınlar izole edilen *S. aureus* suşlarında %52 metisilin direnci olduğunu göstermiştir (13). 2008-2009 yıllarında Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı'nca yayınlanan Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı (UHESA) raporu özet veri kitapçığında sunulan antimikrobiyal direnç hızlarının persentil dağılımları tablosunda MRSA'un ağırlıklı genel ortalaması 2008 yılında 58,9 olarak, 2009 yılında 58,5 olarak belirtilmiştir. Aynı kitapçık 2010 yılında da yenilenerek sunulmuştur. 2010 yılında ağırlıklı genel ortalama MRSA için (53,4), MRKNS için ise (73,0) olarak gösterilmiştir (14). Çalışmamızda saptadığımız %54,2 MRSA oranı, Türkiye'den bildirilen UHESA verilerine ve Amerika'dan bildirilen MRSA oranlarına benzer olduğu görülmüştür. Çalışmamızda izole edilen MRSA örneklerinin gönderildiği kliniklere göre dağılımında %22,6 yoğun bakım ünitelerinde, %20,9 enfeksiyon hastalıkları kliniğine, %15,6 nöroşirürji, %13 ortopedi, %11,3 dahiliye kliniğine ait olduğu görülmüştür. Bu bölümlerin hastaların uzun süre yatarak yoğun antibiyotik tedavisi aldığı klinikler olduğu dikkat çekmektedir. MRSA'nın örnek türlerine göre dağılımı incelendiğinde %60'ı yara, %20'si solunum yolu sekresyonu, %13'ü idrar, %3,5'i kan ve kateter olarak bulunmuştur. Buna karşın MRKNS'lerin kliniklere göre dağılımı incelendiğinde %25,8 dahiliye, %22,7 yoğun bakım ünitesi (YBÜ), %18,2 acil, %13,6 pediatri kliniğine ait olduğu; örnek türlerine göre dağılımı incelendiğinde %53 kan ve kateter, %25,8 yara, %18,2 idrar olduğu tespit edilmiştir. Mikrobiyoloji laboratuvarında izole edilen KNS'lerin gerçek etken olup olmadığının belirlenmesinde çok önemli bir rol de klinisyene düşmektedir. İzole edilen her MRKNS'nin etken olamayacağı aşikârdır. Bunların birçoğunun kontaminant bakteriler olabileceği unutulmamalıdır. Çalışmamızda tespit edilen KNS türlerinden çoğunluğunu, *S. hominis* ve *S. epidermidis* oluşturmuştur. Bu bakteriler KNS türleri arasında çoğunlukla kontaminant bakteri olarak kabul edildiği için, dahiliye ve YBÜ'den gelen kan ve kateter ucu kültür örneklerinin çoğunluğunun kontaminasyon olabileceğini düşündürmüştür.

Günümüzde MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde glikopeptid grubu antibiyotikler kullanılmaktadır. Glikopeptid grubu ilaçlar, hücre duvar sentezini inhibe ederek etki gösterirler. Sentezlenmekte olan hücre duvarının bir komponenti olan peptidoglikanın D-alanil-D-alanin ucuna bağlanarak transpeptidasyon basamağını inhibe ederler (15). İlk olarak 1958 yılında kullanıma giren ve sadece Gram pozitif bakterilere etkili olan vankomisine karşı uzun yıllar boyunca direnç saptanmamıştır. Ancak 1989 yılında vankomisine dirençli

enterokoklar (VRE) görülmeye başlanmıştır; bunu 1996 yılında VISA ve 2002 yılında da VRSA izolatları izlemiştir (15).

1997 yılında, VISA suşlarının ortaya çıkmasından kısa bir süre sonra Hiramatsu ve arkadaşları, "heterojen VISA (hVISA)" olarak adlandırılan yeni bir vankomisin direnç tipi tanımlamışlar ve "Mu 3" olarak isimlendirmişlerdir (16). Bu ilk izolattan sonra birçok ülkede değişen oranlarda hVISA izolatları bildirilmiştir (17). CLSI tarafından belirlenen vankomisin direnç sınır değerlerine göre VISA ve VRSA izolatları tanımlanabilirken, hVISA izolatları için bu geçerli değildir. CLSI kriterlerine göre vankomisine duyarlı bulunan (vankomisin MİK değeri $\leq 2 \mu\text{g/ml}$) ancak en az 10^4 - 10^5 'te bir sıklıkta olmak üzere, MİK değeri $>2 \mu\text{g/ml}$ olan subpopülasyon içeren suşlar hVISA olarak tanımlanmaktadır (17). MRSA'lar içerisinde VISA suşlarına halen ender olarak rastlanmasına rağmen, hVISA suşlarının görülme sıklığı %0,71-65 arasında olmak üzere değişkenlik göstermektedir (17-20).

Stafilokoklarda gözlenen bu direnç gelişimini takiben ilk kez 2002 yılında Michigan'da bir diyaliz hastasında VRSA izolatı tanımlanmıştır. Bugüne kadar, tüm dünyada VRSA enfeksiyonunun görüldüğü 11 olgu mevcuttur. Bunlardan dokuzu ABD'den (Michigan 7, Pennsylvania 1, New York 1 olgu), ikisi ise İran ve Hindistan'dan bildirilmiştir. Bu olguların hepsinde PCR ile vanA geni gösterilmiştir (21).

2006 yılına kadar *S. aureus* için vankomisin direnç sınır değerleri, $\leq 4 \mu\text{g/ml}$ duyarlı, 8-16 $\mu\text{g/ml}$ orta duyarlı ve $\geq 32 \mu\text{g/ml}$ dirençli olarak kabul edilmiştir. 2006 yılında ise CLSI, in vitro duyarlılık sonuçları ile elde edilen klinik sonuçlar arasındaki korelasyonu arttırabilmek amacıyla *S. aureus* için belirlenmiş olan vankomisin MİK direnç sınır değerlerini düşürmüştür. Sonuç olarak günümüzde yeni direnç sınır değerlerine göre, MİK $\leq 2 \mu\text{g/ml}$ olan izolatlar duyarlı, 4-8 $\mu\text{g/ml}$ olan izolatlar VISA ve $\geq 16 \mu\text{g/ml}$ olanlar VRSA olarak kabul edilmektedir (22). Dolayısıyla daha önceden hVISA olarak tanımlanmış olan izolatlardan bazıları, yeni belirlenmiş olan değerlere göre VISA olarak kabul edilmektedir. Benzer olarak EUCAST, 2009 yılında VISA tanımını tamamen kaldırarak, vankomisin MİK değeri $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ olan tüm *S. aureus* izolatlarını vankomisine dirençli olarak kabul etmiştir. Yapılan tüm bu değişikliklere rağmen ne yazık ki vankomisin MİK değeri $2 \mu\text{g/ml}$ olan *S. aureus* izolatları ile vankomisin tedavisinde başarısızlıklar görülmeye devam etmiştir. Bu durum özellikle bakteriyemi ya da pnömoni gibi ciddi MRSA enfeksiyonlarında saptanmıştır (23).

hVISA izolatları standart duyarlılık testleriyle tanımlanamamaktadır. Bugüne kadar hVISA izolatlarının tanımlanmasında birçok yöntem denenmiştir. Bunların arasında Hiramatsu'nun E-test makrometodu ve PAP-AUC yöntemi sayılabilir (17). PAP-AUC yöntemi günümüzde hVISA izolatlarının saptanmasında altın standart olarak kabul edilmekle birlikte, rutinde uygulanması zor, pahalı ve zahmetli bir yöntemdir. E-test makrometodu ise hVISA izolatlarının saptanmasıyla ilgili yapılan birçok çalışmada diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında, PAP-AUC yöntemine daha yakın duyarlılık ve özgüllük değerlerine sahip bir yöntem olarak bulunmuştur (17,20,24).

Türkiye’de MRSA izolatlarında hVISA varlığını araştıran ilk çalışmayı 2005 yılında Sancak ve arkadaşları yapmışlardır (20). Bu çalışmada 256 MRSA izolatından 46’sı (%18) PAP-AUC yöntemiyle hVISA olarak tespit edilmiştir. Kuşçu ve arkadaşları, 148 metisiline dirençli stafilocok kökeninde, hVISA araştırmışlar ve 107 MRSA içerisinde bir adet (%0,9) hVISA izolat tespit etmişlerdir (9). Mirza ve arkadaşları, ilk kez pediyatrik popülasyondan izole edilen MRSA izolatlarında, PAP-AUC çalışmışlar ve %21,3’ünün hVISA olduğunu tespit etmişlerdir (25). Korkut Tunç ve arkadaşları (26) 52 adet MRSA şuşundan, popülasyon analiz profili sonucuna göre dokuzunda (%17,30) hVISA saptamışlardır. Yunanistan’da Souli ve arkadaşları (27), 175 izolatta altı adet (%3,4) hVISA tespit etmişlerdir. Khatib ve arkadaşları (28) 371 MRSA izolatı arasından %1,6’sında (n=6) VISA, %8,1’inde (n=30) hVISA tespit etmişlerdir. Pitz ve arkadaşlarının (29) yapmış olduğu çalışmada 147 MRSA izolatında hVISA sıklığı %1,2 (n=2) olarak tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalarda saptanan prevalans oranları %0,9 ile %21,3 arasında değişmektedir. Elde edilen farklı sonuçların başlıca nedeni, kullanılan yöntemlerin (Mikrodilüsyon, Makrodilüsyon, PAP-AUC gibi) ve alınan örnek türlerinin (tüm stafilocoklar ya da sadece MRSA’lar gibi) farklı olmasına bağlanmıştır. Bugün için kabul edilen altın standart PAP yöntemidir; ancak oldukça zahmetli ve zaman alıcıdır. Metisiline direnç saptanan bütün stafilocoklarda, PAP-AUC uygulanması rutin laboratuvar şartlarında mümkün olmayacağından hVISA şüpheli izolatların tespit edilmesi için farklı tarama yöntemleri geliştirilmiştir. Bunlar arasında en çok kullanılan yöntemler, standart E test, makro E test, vankomisin içeren agar tarama yöntemleridir. Fakat yapılan çalışmalarda farklı sonuçlar bildirilmesi nedeniyle yöntemler rutin kullanım için henüz standardize edilmemiş; hangi yöntemin güvenle kullanılabilirliğine dair bir konsensüs sağlanmamıştır (9,30). Bizim çalışmamızda da, kullanmış olduğumuz 6 µg/ml vankomisin içeren tarama plaklarında iki şuşta üreme saptanmış olup bunların doğrulama testleriyle (E test, makro E test, PAP AUC) aslında vankomisine duyarlı olduğu görülmüştür. Vankomisin tarama agarın ilk basamakta vankomisin direnci saptamada kolay ve maliyet etkin bir yöntem olduğu görülmüştür. Agar tarama testinde saptanmış dirençli şuşların doğrulanmasında E test ve PAP yöntemlerinin mutlaka yapılması gerektiği kanısına varılmıştır.

Çoklu antibiyotik direnci gösteren MRSA’ların etken olduğu enfeksiyonlarda tek tedavi seçeneği olarak çoğu kez glikopeptid antibiyotikler kullanılmaktadır. Bu antibiyotiklerin yoğun bir biçimde kullanılması, stafilocoklarda glikopeptidlere karşı hassasiyet azalmasına ve direnç gelişmesine sebep olmuştur. Stafilocoklarda azalmış glikopeptid direncinin taranması ve doğrulanması için tüm dünyada kabul görmüş bir yöntem olmamasına rağmen vankomisin tarama agar, standart E test, makro E test ve altın standart olarak kabul edilen PAP-AUC oranının hesaplanması önerilmektedir. Çalışmamızda da vankomisinli agar tarama besiyerinde üreyen *S. aureus*’ların standart E-test, makro E test ile MİK değerlerinin duyarlı sınır aralıklarında olduğu gösterildi. En sonunda altın standart olarak kabul edilen PAP-AUC yönteminin kullanılmasıyla da vankomisine

karşı azalmış hassasiyet ya da dirence rastlanmadı.

Sonuç olarak bu seçkin antibiyotiğin özenli kullanılmasının, gerek tedavi öncesi, gerekse tedavi sırasında hastaların mikrobiyolojik yönden yakın izlemi önemli ve gereklidir.

Finansal Destek: Bu çalışma Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fonu tarafından desteklenmiştir. Proje No: 2012.04.HD.066

KAYNAKLAR

1. Culos KA, Cannon JP, Grim SA. Alternative agents to vancomycin for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *AmJ Ther.* 2013; 20(2): 200-12.
2. Ippolito G, Leone S, Lauria FN, Nicastrì E, Wenzel RP. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the superbug. *IntJ Infect Dis.* 2010; 14(14): 7-11.
3. Sancak B. *Staphylococcus aureus* ve antibiyotik direnci. *Mikrobiyol Bul.* 2011; 45(3): 565-76.
4. Kırca F. *Staphylococcus aureus* şuşlarında metisilin direnci tanısında kullanılan bazı fenotipik yöntemlerin karşılaştırılması [Uzmanlık tezi]. Ankara: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2008.
5. Swenson JM, Lonsway D, McAllister S, Thompson A, Jevitt L, Zhu W, et al. Detection of mecA-mediated resistance using reference and commercial testing methods in a collection of *Staphylococcus aureus* expressing borderline oxacillin MICs. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007; 58: 3-39.
6. Azarkan A. Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda metisilin rezistan *Staphylococcus aureus*’un hızlı test (moleküler yöntem) ile araştırılması [Uzmanlık tezi]. Diyarbakır: Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2011.
7. Sancak B. *Staphylococcus aureus*’ta metisilin ve vankomisin direnci. *Hacettepe Tıp Dergisi.* 2007; 38: 127-34.
8. Brown DF, Edwards DI, Hawkey PM, Morrison D, Ridgway GL, Towner KJ, et al. Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56(6): 1000-18.
9. Kuşçu F, Öztürk D, Gürbüz Y, Tütüncü E, Şencan İ, Gül S. Metisiline dirençli stafilocoklarda azalmış vankomisin duyarlılığının araştırılması. *Mikrobiyol Bul.* 2011; 45(2): 248-57.
10. Çetinkaya Y. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* enfeksiyonlarının epidemiyolojisi ve kontrolü. *Hastane İnfeksiyonları Derg.* 2000; 4: 205-17.
11. Cosgrove SE, Qi Y, Kaye KS, Harbarth S, Karchmer AW, Carmeli Y. The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2005; 26(2): 166-74.
12. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January through 1992 June 2004, issued October 2004. *Am J Infect Control.* 2004; 32(8): 470-85.
13. Derbentli Ş. Stafilocoklarda antibiyotik direnci, 2003-2004 Türkiye haritası. *ANKEM Derg.* 2005; 19(Ek 2): 54-60.

14. Refik Saydam Hıfzıssıhha Merkezi Başkanlığı'na yayınlanan Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı (UHESA) Raporu Özet Veri Kitapçığı. [Son güncelleme tarihi: 6 Mayıs 2017; Erişim tarihi: 19 Temmuz 2018]. Erişim adresi: www.rshm.gov.tr/enfeksiyon/dosya/lab.doc.
15. Shorr AF. Epidemiology of staphylococcal resistance. *Clin Infect Dis.* 2007; 45(3): 171-6.
16. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother.* 1997; 40(1): 135-6.
17. Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection and clinic alimplications. *Clin Microbiol Rev.* 2010; 23(1): 99-139.
18. Van Hal SJ, Paterson DL. Systematic review and meta-analysis of the significance of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(1): 405-10.
19. Bell JM, Walters LJ, Turnidge JD, Jones RN. hVISA's are common among vancomycin susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Program and abstracts of the 46th Annual Meeting of the Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC); 2006 September; San Francisco, CA. Washington: American Society for Microbiology; 2006. p. 1160.
20. Sancak B, Ercis S, Menemenlioglu D, Colakoglu S, Hasçelik G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin in a Turkish university hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56(3): 519-23.
21. Gould IM. Clinical activity of anti-Gram-positive agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 2011; 66(14): 17-21.
22. Hardy KJ, Hawkey PM, Gao F, Oppenheim BA. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the critically ill. *Br J Anaesth.* 2004; 92(1): 121-30.
23. Nannini E, Murray BE, Arias CA. Resistance or decreased susceptibility to glycopeptides, daptomycin, and linezolid in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Pharmacol.* 2010; 10(5): 516-21.
24. Walsh TR, Bolmström A, Qwarnström A, Ho P, Wootton M, Howe RA, et al. Evaluation of current methods for detection of staphylococci with reduced susceptibility to glycopeptides. *J Clin Microbiol.* 2001; 39(7): 2439-44.
25. Mirza HC, Sancak B, Gur D. The prevalence of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* and Heterogeneous VISA among methicillin-resistant strains isolated from pediatric population in a Turkish university hospital. *Microbial Drug Resistance.* 2015; 21(5): 537-44.
26. Korkut Tunç E, Kuzucu Ç, Otlu B. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarında vankomisine karşı azalmış duyarlılığın araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2017; 47(1): 39-46.
27. Souli M, Karaiskos I, Galani L, Maraki S, Perivolioti E, Argyropoulou A, et al. Nationwide surveillance of resistance rates of *Staphylococcus aureus* clinical isolates from Greek hospitals, 2012-2013. *Infectious Diseases.* 2016; 48(4): 287-92.
28. Khatib R, Jose J, Musta A, Sharma M, Fakih MG, Johnson LB, et al. Relevance of vancomycin-intermediate susceptibility and heteroresistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2011; 66(7): 1594-9.
29. Pitz AM, Yu F, Hermsen ED, Rupp ME, Fey PD, Olsen KM. Vancomycin susceptibility trends and prevalence of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in clinical methicillin-resistant *S. aureus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology.* 2011; 49(1): 269-74.
30. Wootton M, MacGowan AP, Walsh TR, Howe RA. A multicenter study evaluating the current strategies for isolating *Staphylococcus aureus* strains with reduced susceptibility to glycopeptides. *Journal of Clinical Microbiology.* 2007; 45(2): 329-32.