



**T.C.  
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**METİSİLİNE DİRENÇLİ STAFİLOKOKLARDA  
AZALMIŞ VANKOMİSİN DUYARLILIĞININ  
ARAŞTIRILMASI**

**Dr. FATMA AVCIOĞLU  
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DÜZCE-2014**





T.C.  
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**METİSİLİNE DİRENÇLİ STAFİLOKOKLARDA  
AZALMIŞ VANKOMİSİN DUYARLILIĞININ  
ARAŞTIRILMASI**

Dr. FATMA AVCIOĞLU  
TIPTA UZMANLIK TEZİ

Prof. Dr. C. ELİF ÖZTÜRK  
TEZ DANIŞMANI

DÜZCE-2014

## ÖNSÖZ

Bilimsel titizliği ve çalışma disiplininini örnek aldığım, dostluk ve desteğini esirgemeyen, eğitimim ve tezimin gerçekleşmesinde büyük katkıları olan tez danışmanım Prof. Dr. C. Elif ztrk'e, tıpta uzmanlık eğitim ve öğrenimim süresince bilgi ve deneyimleri ile yetişmemde önemli katkıları olan, sayın hocalarım başta Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İdris şahin, Doç. Dr. şükrü ksz'e, eğitimimin çok az bir bölümünde birlikte olabildiğimiz ve bu süre boyunca değerli bilgi ve katkılardan yararlandığım Doç. Dr. M. Tevfik Yavuz'a, ayrıca tezimin istatistiksel değerlendirmesinde yardımını aldığım Doç. Dr. Handan Ankaralı'ya, tezimin hazırlanma aşamasında yakın ilgi ve desteklerini esirgemeyen Dr. Ferit Kuşçu'ya;

Birlikte alıştığım asistan arkadaşlarım Dr. Asiye Altınöz, Dr. Emel alışkan, Dr. Nida Kılıç, Dr. Özge Kuşçu, Dr. şahika Göçmen, Dr. Hilal Türkmen Albayrak'a ve laboratuvar ortamında birlikte anlayış ve huzur içinde çalıştığımız, tezimin hazırlık aşamasında büyük destek veren başta Arif Kızılırmak, Kamer zkan ve Seda Karaman olmak üzere tüm biyolog ve teknisyen arkadaşlarıma;

Hayatımın her aşamasında maddi-manevi destek ve sevgileriyle her zaman yanımda olan; sabır ve fedakrlıkları hiç tükenmeyen annem ve aileme;

Yaşamda varlığımın nedeni olan, eğitim ve meslek hayatımın her aşamasında ilgi ve özveriyle desteğini hep içimde hissettiğim, her sıkıntıyı beraber aştığım, sevgi, sabır ve anlayışımı benden eksik etmeyip yaşamı birlikte paylaşarak öğrendiğim eşim Sedat Avcıoğlu'na,

Varlığıyla hayatımıza renk ve anlam katan biricik oğlum Kerem'e sonsuz teşekkür ve sevgilerimi sunarım.

Dr. Fatma Avcıoğlu

## ÖZET

Stafilokoklar, insan normal florasında bulunmakla birlikte nozokomiyal ve toplumdan kazanılmış enfeksiyonların en önemli etkenlerindedir. Özellikle metisilin dirençli *S.aureus* suşlarının neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde büyük sıkıntılar yaşanmaktadır. Metisilin dirençli *S.aureus* suşları beta-laktam ve beta-laktam dışı antibiyotiklerin çoğuna karşı dirençlidir. Bu nedenle, glikopeptid antibiyotikler metisilin dirençli *S.aureus* 'un neden olduğu ciddi enfeksiyonların tedavisinde ilk seçenektir.

Metisilin dirençli stafilokoklarda vankomisin direncinin araştırılmasının amaçlandığı bu çalışma, Ocak 2010-Kasım 2013 tarihleri arasında yapıldı. Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden (idrar, balgam, kan, yara sürüntüsü, bronş lavaj sıvısı, katater... vb.) izole edilen toplam 331 stafilokok suşu incelemeye alındı. Sadece metisilin dirençli *S.aureus*'lar ve metisilin dirençli koagülaz negatif stafilokoklar çalışmaya dahil edildi. Metisilin direncini tespit etmede oksasilin agar tarama, sefoksitin disk difüzyon testi; vankomisin direncini saptamada vankomisin agar tarama, standart e test, makro e test ve PAP yöntemleri kullanıldı.

*S. aureus* izolatlarının 115 (% 54,2)'i metisilin dirençli *S.aureus*; koagülaz negatif stafilokok izolatlarının 66 (%51,2)'sı metisilin dirençli koagülaz negatif stafilokok olarak bulundu. Kullanılan vankomisin agar besiyerine ekilen 181 metisilin dirençli stafilokok suşunun ilk 24 saatte sadece ikisinde üreme saptandı. Üreme saptanan suşların her ikisi de *S. aureus* idi. Bu metisilin dirençli *S.aureus* suşları standart E Test ve Makro E Test incelemelerinde vankomisine duyarlı olarak bulundu. PAP yöntemi ile hiçbir suшта üreme saptanmadı. Bu veriler sonucunda hastanemizde VIS ve h/VIS olmadığı kanaatine varıldı.

Metisilin dirençli *S.aureus* enfeksiyonu düşünülen hastalarda tedavide glikopeptid kullanımının ileride hVISA ve VISA gelişimine sebep olabileceği akılda tutulmalı ve tedaviye yanıt vermeyen hastalarda vankomisin direnci için tarama mutlaka yapılmalıdır. Sonuç olarak bu seçkin antibiyotiğin kullanımında özenli olunması ve gerek tedavi öncesi, gerekse tedavi sırasında hastaların mikrobiyolojik yönden yakın izleminin önemli ve gerekli olduğu düşünülmüştür.

**Anahtar Kelimeler:** Staphylococcus aureus, koagülaz negatif stafilokok, metisilin, vankomisin, direnç, hVISA, VISA.

## ABSTRACT

Staphylococci are among the most important aetiological agent of nosocomial and community-acquired infections, although found in human normal flora. Particularly in methicillin resistant *S. aureus* infection treatment have been experienced great difficulties. Methicillin resistant *S. aureus* strains are resistant to beta lactam and most of the non beta lactam antibiotics. Therefore, glycopeptide antibiotics are the first option in the treatment of severe infections caused by methicillin resistant *S. aureus*.

The study which aimed to investigate, presence of vancomycin resistance in methicillin resistant staphylococci, was conducted between January 2010 and November 2013. Total of 331 staphylococcal strains which were isolated from the variety of clinical samples (urine, sputum, blood, wound swabs, bronchial lavage fluid, catheter...etc.) which were sent to Clinical Microbiology laboratory of Duzce University Faculty of Medicine Research and Application Hospital were analyzed. Only methicillin resistant coagulase negative staphylococci and methicillin resistant *S. aureus* were included to the study. To detect methicillin resistance oxacillin screening agar, cefoxitin disk diffusion test and to detect vancomycin resistance vancomycin screening agar, standard E test, macro E test and PAP methods were used.

115 (54,2 %) of *S. aureus* isolates were found as methicillin resistant *S. aureus*. 66 (51,2%) of coagulase negative staphylococci isolates were found as methicillin resistant coagulase negative staphylococci. Only two of the 181 methicillin resistant staphylococci strains which inoculated to vancomycin screening agar were grewed in first 24 hours. Both of them were *S. aureus*. These methicillin resistant *S. aureus* strains were found sensitive to vancomycin on standard and macro E test methods. There was not found any growth of vancomycin resistant strains with PAP method. As a result of these data, there was no growth of VIS and h/VIS strains in our hospital.

It should be kept in mind that; in the treatment of suspected methicillin-resistant *S. aureus* infected patients, it should be kept in mind that usage of glycopeptides may lead to development of future hVISA and VISA, screening for vancomycin resistance should be performed in patients who do not respond to treatment. As a result, that it needs to be attentive

in the usage of these exclusive antibiotics and as well as during pre-treatment and treatment close follow-up in microbiological aspect of patients was necessary and important had been considered.

**Key words:** *Staphylococcus aureus*, coagulase negative staphylococci, methicillin, vancomycin, resistance, hVISA, VISA.

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfalar</u>
ÖNSÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT) .....	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR .....	vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Stafilokoklar.....	2
2.1.1. Tarihçe.....	2
2.1.2. Sınıflandırma.....	2
2.1.3. Mikroskopik özellikler.....	3
2.1.4. Üreme özellikleri ve koloni morfolojisi.....	3
2.1.5. Hücre yapısı.....	4
2.1.6. Hücre dışı toksinler.....	5
2.1.7. Enzimler.....	5
2.1.8. Virülans faktörleri.....	7
2.1.9. Epidemiyoloji.....	7
2.1.10. Stafilokokların neden olduğu enfeksiyonlar.....	8
2.1.11. Labaratuvar tanısı.....	8
2.2. Antibiyotik Direncinin Özellikleri.....	13
2.2.1. Penisilin direnci.....	13
2.2.2. Metisilin direnci.....	15
2.2.3. Vankomisin direnci.....	17
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	20
3.1. Gereçler.....	20
3.1.1. Koyun kanlı agar.....	20
3.1.2. Mueller-Hinton agar besiyeri.....	20
3.1.3. 6 µg/ml Vankomisin içeren beyin kalp infüzyon agar.....	20
3.1.4. 1-10 µg/ml Vankomisin içeren beyin kalp infüzyon agar.....	21
3.1.5. Oksasilinli Mueller-Hinton agar.....	21
3.1.6. Antibiyotik diskleri.....	21
3.1.7. Cihaz ve ekipman.....	21
3.1.8. Kitler.....	21
3.1.9. Otomatize sistemler.....	22
3.2. Yöntem.....	23
3.2.1. Örneklem grubunun oluşturulması.....	23
3.2.2. Etkenlerin izolasyonu ve tanımlanması.....	23
3.2.3. Metisilin direncinin belirlenmesi ve yorumu.....	23
3.2.4. Vankomisin direncinin belirlenmesi ve yorumu.....	24
4. BULGULAR.....	28
5. TARTIŞMA.....	37
6. SONUÇ VE ÖNERİ.....	47
7. KAYNAKLAR.....	49
8. EKLER.....	59
Ek-1. Düzce Üniversitesi Etik Kurul Onay Formu.....	59

## SİMGE VE KISALTMALAR

BKİA: Beyin Kalp İnfüzyon Agar

DNA: Deoksiribonükleik Asit

DNaz: Deoksiribonükleaz

EDTA: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit

hVISA: Heterojen Vancomycin-Intermediate *Staphylococcus aureus*

HKMRSA: Hastane Kaynaklı Metisiline Rezistans *Staphylococcus aureus*

KKA: Koyun Kanlı Agar

KNS: Koagülaz Negatif Stafilokok

RNA: Ribonükleik Asit

MSSA: Metisilin Sensitive *S. aureus*

MRSA: Metisiline Rezistans *Staphylococcus aureus*

MHA: Mueller-Hinton Agar

MLST: Multilocus Sequence Typing

NAG: N Asetil Glukozamin

NAM: N Asetil Muramik Asit

PAP-AUC: Population Analysis Profile-Area Under the Curve

PCR: Polimerase Chain Reaction

PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis

PBP: Penisilin Bağlayan Protein

PVL: Panton-Valentine leukocidin

SCCmec: Staphylococcal Chromosome Cassette mec

SPA: Stafilokokkal Protein A

TKMRSa: Toplum Kaynaklı Metisiline Rezistans *Staphylococcus aureus*

VISA: Vankomisin Intermediate *Staphylococcus aureus*

VRSA: Vankomisin Rezistan *Staphylococcus aureus*

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Genel olarak mikroorganizmalarda antibiyotiklere karşı hızla geliştirilen direnç mekanizmalarından dolayı bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde ciddi sorunlar yaşanmakta ve bu da yeni antibiyotiklere duyulan ihtiyacı artırmaktadır.

Gram pozitif koklar, özellikle stafilokok türleri son yıllarda hastane kaynaklı enfeksiyonlarda Gram negatif bakterilerden daha sık sorumlu tutulan etkenler olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle yoğun bakım ünitelerinde olmak üzere metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) enfeksiyonları giderek artan oranlarda rapor edilmektedir (1, 2). Son yıllarda, MRSA enfeksiyonlarının epidemiyolojisinde önemli değişiklikler meydana gelmiştir. Bunlardan birincisi *S.aureus* izolatlarında görülen metisilin direnç oranlarındaki artıştır. Yapılan bazı çalışmalarda, yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *S.aureus* izolatlarının yaklaşık %80'i metisiline dirençli saptanmıştır (2). İkinci önemli değişiklik, bazı merkezlerde MRSA izolatlarında görülen vankomisin duyarlılığındaki azalmadır. Bu izolatların vankomisin MİK değerleri  $\leq 2$   $\mu\text{g/ml}$  olmak üzere duyarlı sınırlarında olmasına rağmen, vankomisin 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, 4).

Bu sebeplerden dolayı çalışmamızda Ocak 2010-Kasım 2013 tarihleri arasında hastanemiz Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen stafilokok suşlarında öncelikle metisilin direncini ve daha sonra da MRSA ve metisiline dirençli koagülaz negatif stafilokok (MRKNS) izolatlarında vankomisin direncini (VIS, hVIS varlığını) araştırmayı amaçladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Stafilokoklar

#### 2.1.1. Tarihçe

Stafilokokları ilk kez 1878'de Robert Koch tanımlamış, 1880'de Pasteur sıvı besiyerinde üretmiş ve 1881'de İskoçyalı cerrah Alexander Ogston fare ve kobaylar için patojen olduğunu vurgulamıştır. Staphylococcus terimi Grekçe staphyle (üzüm salkımı) tabirinden türetilmiştir ve karakteristik kümelenmeler yaptıklarından dolayı Alexander Ogston tarafından seçilmiştir (5). Rosenbach 1884'te beyaz renkli kolonileri *Staphylococcus albus*, sarı-portakal rengi kolonileri ise *Staphylococcus aureus* olarak isimlendirmiştir. Bu ayırım yakın zamana kadar devam etmiştir (6).

#### 2.1.2. Sınıflandırma

Türlerin sınıflamasında, kemo-taksonomik, biyokimyasal ve morfolojik özelliklere dayalı değişik teknikler kullanılsa da günümüzde DNA-DNA hibridizasyon yöntemine dayalı sınıflandırma kabul görmektedir. Günümüze kadar Staphylococcus genusunda 33 tür ve 17 alt tür saptanmıştır. Stafilokok türleri DNA/DNA ilişkileri ve fenotipik özelliklerine göre en az dört grup altında toplanabilirler. *Staphylococcus epidermidis* grubunda; *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. warneri*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* ve *S. saccharolyticus* türleri, *Staphylococcus saprophyticus* grubunda; *S. saprophyticus*, *S. cohnii*, *S. xylosus* türleri, *Staphylococcus simulans* grubunda; *S. simulans*, *S. carnosus* türleri, *Staphylococcus sciure* grubunda; *S. sciure*, *S. lentus* türleri yer almaktadır. *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus auricularis*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus hyicus* ve *Staphylococcus caseolyticus* herhangi bir gruba dahil edilememiştir. İnsanlardaki stafilokok enfeksiyonlarında öncelikle *S. aureus* yer alır. Fırsatçı patojenler olan *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* da sıklıkla enfeksiyona sebep olurlar. Daha nadiren *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. warneri*, *S. saccharolyticus*, *S. cohnii* ve *S. simulans* da fırsatçı enfeksiyonlara neden olurlar (2, 7).

#### 2.1.3. Mikroskopik özellikleri

Stafilokoklar, ışık mikroskobu ile incelenmesinde 0,5-1,5 mikrometre çapında, Gram

pozitif kok görünümünde bakterilerdir. Boyalı preparatlarda tekli, ikili yada üzüksalkımına benzer gruplar şeklinde görülürler. Özellikle sıvı besiyerlerinden yapılan preparatlarda kısa zincirler yapmış koklar şeklinde görülebilir (7, 8, 9).

#### **2.1.4. Üreme özellikleri ve koloni morfolojisi**

Hareketsiz, spor oluşturmeyen, genellikle katalaz pozitif, oksidaz negatif, kapsülsüz bakterilerdir. Aerop yada fakültatif anaerop ortamlarda 37 °C’de kolaylıkla üretilirler. Anaerobik ortamda glukozdan asit oluştururlar. *Staphylococcus saccharolyticus* ve *S.aureus*subsp. *Anaerobius* alt tipleri diğerlerinden farklı olarak anaerop, katalaz negatif ve karbohidratlardan gaz oluşturmazlar. Optimal üreme sıcaklıkları 30-37°C ve pH değerleri de 7-7,5 olup geniş pH ve sıcaklık aralıklarında da (pH 4,2-9,3 sıcaklık 18-45°C) kolaylıkla üreyebilirler. Birçok türünde karotenoid pigment bulunabilir. Basitrasin, furazalidon, lizostafine duyarlı olmakla birlikte lizozime direnç gösterirler (5).

Koagülaz deneyi, *S. aureus*’u diğer stafilocoklardan ayırt etmede en yaygın olarak kullanılan ve genel olarak kabul gören identifikasyon kriteridir. *S. aureus* koagülaz pozitifdir. İki farklı yöntemle koagülaz testi yapılabilir. Birincisi tüp testidir. Stafilocokların besiyerine saldıkları serbest koagülaz araştırılır. İkincisi ise kümeleştirme faktörü olarak da bilinen bağlı koagülazın araştırıldığı lam deneyidir. Lam deneyi hızlı sonuç vermeye birlikte, *S. aureus* suşlarının %10-15’i bu yöntemle negatif sonuç verebilir. Koagülaz negatif olan stafilocoklar manitolü parçalamazlar. Mannitole etki deneyi, koagülaz testinden sonra *Staphylococcus aureus*’u diğer stafilocoklardan ayırt etmede en yararlı deneydir. Diğer karbohidratlardan trehaloz, mannoz, maltoz, sükröz ve laktozu parçalarlar, ksiloz, sellobioz, arabinoz ve rafinozu parçalamazlar. Nitratları nitritlere indirgerler. Oksidaz olumsuzdurlar (5, 6). Kısaca *S. aureus*’u diğer stafilocoklardan ayırmak için koagülaz, manitol fermentasyonu ve deoksiribonükleaz testleri kullanılır. Bu testlerin pozitif sonuç vermesi, bakterinin *S. aureus* olduğunu gösterir (10). Stafilocoklar, % 10 ve daha az NaCl içeren ortamlarda, birçok basit besiyerlerinde ürerler. Stafilocoklar koyun kanlı agarda (KKA) 18-24 saatlik inkübasyonu takiben, 1-4 milimetre (mm) çapında, yuvarlak ve düzgün, hafif konveks, beyazdan altın sarısına, sarı renkten turuncuya kadar değişen pigmentli, krema kıvamında, düzgün kenarlı beta hemolitik veya hemolitik olmayan koloniler şeklinde üreme gösterirler (8, 9).

#### **2.1.5. Hücre yapısı**

#### 2.1.5.1. Genom

Bakteri genomu; profajlar, plazmidler, transpozonlar ve 2800 baz çiftli sirküler bir kromozomdan oluşur. Antibiyotik direnci ve bakteri virülansından sorumlu olan genler bu kromozom veya ekstrakromozomal yapılar üzerinde bulunabilir (11).

#### 2.1.5.2. Hücre duvarı

Hücre duvarının ana bileşenlerini peptidoglikan ve teikoik asit oluşturur. Hücre duvarı kuru ağırlığının %50-60'ı heteropolimerik bir yapıda olan peptidoglikan tabakadır. Hücre duvarı  $\beta$ -1,4 bağları ile bağlı N-asetilglukozamin ve polimerlerinin kısa peptid zincirlerine çapraz bağlarla bağlanmasıyla oluşan bir kompleks yapıdır. N-asetilmuramik asitin karboksil ucuna bağlı pentapeptid rezidüleri bir zincirdeki D-alanin ile diğer zincirdeki L-lizin arasındaki pentaglisin köprüleri ile birbirlerine bağlanır. Stafilokok cinsinin tanımlanmasında pentaglisin köprülerinin lizostafin enzimine gösterdikleri özgül duyarlılıktan yararlanır (7, 8, 11, 12).

Hücre duvarında bulunan teikoik asit, mukozalarda bulunan özgül reseptörleri (fibronektin, fibrinojen, laminin, trombospondin, elastin, kollajen, vitronektin ve sialoprotein) ile birleşerek stafilokokların enfeksiyon bölgesine yapışmasını sağlar. Teikoik asit, peptidoglikan tabakaya ya da lipofilik zincir arasından sitoplazmik membrana kovalan olarak bağlanmış, türe özgü fosfat içeren polimerlerden oluşur. Kalınlığı, bakteri türüne göre değişmekle birlikte 10–12 nm arasındadır. Teikoik asitler buldukları yere göre 2 kısma ayrılır. Bunlar; hücre duvarı ve membran teikoik asitleridir. Duvar teikoik asitlerinden N-asetil glukozamin (GlcNAc) rezidüleri içeren ve polisakkarit A olarak da adlandırılan ribitol teikoik asit *S. aureus*'ta, glikozil rezidüleri içeren ve polisakkarit B olarak da adlandırılan gliserol teikoik asit ise *S. epidermidis*'te bulunur (11).

#### 2.1.5.3. Hücre kapsülü ve biyofilm tabakası

Stafilokokların bazılarında kapsül ve biyofilm tabakası bulunabilir. Bunlar bakterinin adheransını, fagositozdan ve antimikrobiklerin etkilerinden korunmasını sağlar (8, 13).

#### 2.1.5.4. Yüzey proteinleri

Protein A, elastin, kollajen, fibronektin bağlayan proteinler ve “clumping” faktör, kimyasal yapıları ve hücre duvarı yerleşimleri birbirlerine benzeyen stafilokoksik yüzey proteinleridir. Bu proteinler stafilokokların konak dokularında kolonize olmasında en

önemli faktörlerdir. Bu proteinlerin prototipi olan protein A'nın en önemli özelliği, IgG3 dışındaki tüm IgG ve IgA2 ile bazı IgM'lerin Fc reseptörleri ile birleşebilmesidir. Bu nedenle protein A'nın antikomplemanter ve antifagositer etkinliği vardır (6,14).

### 2.1.6. Hücre dışı toksinler

*Staphylococcus aureus* konak hücrelerine sitotoksik veya enzimatik etki gösteren, hücre yapısını ve/veya işlevini etkileyen çok sayıda toksin üretme yeteneğine sahiptir. Bunlar; toksik şok sendromu toksin-1, enterotoksinler, eksfoliyatif toksin ve hemolizinlerdir (9, 15, 16).

### 2.1.7. Enzimler

#### 2.1.7.1. Katalaz

Bütün stafilokoklar miyeloperoksidaz sistemince düzenlenen toksik hidrojen peroksitin su ve oksijene dönüşümünü katalize eden katalaz enzimi üretirler (9,17). Hidrojen peroksit bakteriyel metabolizma sırasında veya fagositoz sonrası birikebilir (17). Katalaz fagosite edilmiş bakterinin oksijen radikalleri ile öldürülmesini engelleyerek konak savunma mekanizmalarını bozar (18).

#### 2.1.7.2. Koagülaz

*Koagülaz* aktivitesi *S. aureus* suşlarının hemen hemen tamamında (%98-99) tespit edilir. Hücre dışı bir ön enzim olan koagülaz, protrombin aktivatörü olup fibrinojenin fibrine dönüşümünü sağlar (9, 13, 19, 20).

#### 2.1.7.3. Fibrinolizin

Aynı zamanda stafilokinaz olarak da isimlendirilir. Hemen hemen tüm *S.aureus* türlerince üretilen fibrinolizin, fibrin kılıfını eriterek infeksiyonun yayılımını kolaylaştırır (7, 9, 17).

#### 2.1.7.4. Hyaluridaz

Hyaluronik asiti hidrolize eder. Bu enzim *S.aureus*'un dokuda yayılımını kolaylaştırır. *S.aureus* suşlarının %90'dan fazlası bu enzimi üretirler (6, 7, 9, 17).

#### 2.1.7.5. Lipaz

*S.aureus*'un tüm suşları ve KNS'ların %30'dan fazlası birkaç farklı lipaz üretirler. Bu enzim lipitleri hidrolize eder ve vücutta yağdan zengin deri bölgelerinde bulunan stafilocokların canlılığını devam ettirmesini sağlayan bir faktördür. Ayrıca kutanöz ve subkutanöz dokularda yüzeysel cilt infeksiyonlarının gelişiminde rol oynar (6, 7, 9, 17).

#### 2.1.7.6. Nükleaz

Endo ve ekzo nükleaz aktivitesine sahip, deoksi ribonükleik asit (DNA)'i veya ribonükleik asit (RNA)'i nükleotidlere parçalayan fosfodiesterazlardır (7). Termotabil nükleaz, *S.aureus*'u diğer stafilocoklardan ayırt etmede kullanılan diğer bir faktördür. İnfeksiyonun patogeneğinde bu enzimin rolü bilinmemektedir (6, 17).

#### 2.1.7.7. Proteaz

*S. aureus* serin proteaz, sistein proteaz, metalloproteaz, stafopain olmak üzere ön enzim özelliğinde başlıca dört hücre dışı proteaz üretir (15). Söz konusu proteazların patojenitedeki rolleri bugün için tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte konak savunmasının bozulması ve doku yayılımında rol aldıkları düşünülmektedir (20).

#### 2.1.7.8. Penisilinaz

Penisilinin ilk klinik kullanıma girdiği 1941 yılında stafilocoklar büyük oranda penisiline duyarlı iken, organizmanın ürettiği penisilinaz sayesinde bugün stafilocokların %90'ından fazlası penisiline dirençli durumdadır (17).

Yapılan ayrıntılı çalışmalar, *S.aureus*'un en az 3 farklı tipte  $\beta$ -laktamaz ürettiğini göstermiştir. Penisilin ve ampicilin'e direnci sağlayan stafilocok penisilinazı; antibiyotik tarafından yapımı indüklenebilen enzim niteliğinde olabileceği gibi, sürekli üretilen yapısal bir enzim niteliğinde de olabilir. Bu enzimi kodlayan genler genellikle plazmid üzerinde bulunur (ekstrakromozomal DNA) ve aynı zamanda eritromisin ve tetrasiklin gibi çeşitli antibiyotiklere direnç genlerini de taşırlar. Bu direnç genleri transformasyon ve transdüksiyon ile diğer bakterilere de transfer edilebilir (9).

### 2.1.8. Virulans faktörleri

Bakterinin yukarıda açıkça bahsettiğimiz yapısal bileşenleri(kapsül, peptidoglikan, teikoik asit, protein A, sitoplazmik membran), toksinleri (sitotoksinler, eksfoliatif toksin, enteretoksinler, toksik şok sendromu toksin), enzimleri (koagülaz, katalaz, hyaluronidaz, fibrinolizin, lipaz, nükleaz, penisilinaz) aynı zamanda virülans faktörleri olarakta görev

yapmaktadır.

### **2.1.9. Epidemiyoloji**

Stafilokoklar önemli enfeksiyon etkenleri olarak 100 yıldan uzun bir süredir tıp dünyasını meşgul etmektedir. İlk olarak 1881 yılında İskoçya'lı cerrah Alexander Ogston tarafından tanımlanan stafilokoklar, o dönemde çok ağır seyreden, tedavisi güç, ölümcül enfeksiyonlara neden olmaktaydı. Alexander Fleming'in penisilini bulması (1928) ve 1940 yılında Forey ve Chain tarafından penisilinin büyük miktarlarda üretiminin başarılması ile stafilokokal enfeksiyonların tedavisinde önemli bir aşama kaydedilmiştir. Ancak penisilinin yaygın klinik kullanıma girmesiyle birlikte penisilini parçalayan stafilokok suşları ortaya çıkmıştır. Penisilinaz üretimi ilk olarak 1940'da Abraham Chain tarafından *Escherichia coli*'de saptanmış, ilk penisilinaz üreten stafilokoklar ise 1944'de Kirby tarafından bildirilmiştir. Bu tarihten itibaren stafilokoklarda penisilin direnci giderek artmış, 1950'li yıllarda penisilinin yanısıra eritromisin, tetrasiklin, streptomisin gibi o dönemde kullanımda olan diğer antibiyotiklere de direnç gelişmiştir (21).

1960 yılında metisilinin ve daha sonra da diğer penisilinaza dirençli penisilinlerin kullanıma girmesiyle birlikte stafilokokal enfeksiyonların tedavisinde 2. önemli aşama kaydedilmiştir. Ancak çok kısa bir süre içerisinde (1961) stafilokoklarda metisilin direnci tanımlanmış ve 1970'li yıllardan itibaren de MRSA suşlarında multipl antibiyotik direnci problemi ortaya çıkmıştır. Direnç probleminin artmasıyla birlikte MRSA tüm dünyada nozokomiyal epidemilere yol açan ciddi bir sağlık sorunu haline gelmiştir (21).

### **2.1.10. Stafilokokların neden olduğu enfeksiyonlar**

Folikülit, fronkül, karbonkül, impetigo, süpüratif hidraadenit, mastit, yara enfeksiyonları, bakteriyemi, endokardit, menenjit, perikardit, pulmoner enfeksiyonlar, osteomyelit, septik artrit, septik bursit, piyomyozit, stafilokok toksinlerine bağlı besin zehirlenmesi, haşlanmış deri sendromu ve toksik şok sendromu gibi çeşitli klinik tablolara neden olmaktadır (22).

### **2.1.11. Laboratuvar tanısı**

Bakterinin kültürde üretilmesi altın standart yöntem olmakla birlikte, tanı amaçlı serolojik ve moleküler yöntemler de kullanılabilir (9). Özellikle stafilocokları mikrokoklardan ayırt etmede; Gram boyama, katalaz testi, lizostafin, furazolidon ve basitrasin gibi duyarlılık testleri, anaerop koşullarda glikozdan asit oluşturma ve modifiye oksidaz testi gibi konvansiyonel yöntemlere başvurulabilir. *Staphylococcus aureus*'un tür düzeyinde tanımlanmasında koagülaz testi, mannitol fermentasyonu, deoksiribonükleaz (DNaz) testi ve benzeri konvansiyonel testler rutin olarak uygulanmaktadır (13, 19, 20).

#### 2.1.11.1. Konvansiyonel yöntemler

*Staphylococcus aureus* basit besiyerlerinde üreyebilmekle birlikte %5 KKA'da, 35-37°C'de normal atmosferde 18-24 saatlik inkübasyon sonrası tipik koloni oluşturarak üreme gösterir (8). Morfolojik olarak, krem renginden sarı-portakal rengine kadar değişen aralıkta, düzgün yüzeyli, hafif kabarık ve kanlı agarda genellikle hemolizli koloniler oluştururlar. (13)

Stafilokok ve benzeri bakterileri, streptokok ve enterokok ile benzeri bakterilerden ayırt etmek amacıyla katalaz testi kullanılır (9). Temiz cam bir lam üzerine %3'lük hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) damlatılır. Kan içermeyen besiyerinde üreyen taze ve saf kültür halindeki bakteriden birkaç koloni alınarak H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> çözeltisinde süspansiyon edilir. Oksijen gazı oluşumu lam üzerinde gaz kabarcıklarının oluşması şeklinde görülür ve bakteri katalaz olumlu olarak yorumlanır. Bazı stafilocok türlerinin katalaz olumsuz olabileceği, yine bazı enterokok türlerinin de zayıf katalaz özelliği gösterebileceği unutulmamalıdır (9, 19).

Stafilokokların mikrokoklardan glikoz içeren besiyerinde gerçekleştirilen oksidasyon/fermentasyon tepkimesi ile ayırt edilmesi mümkündür. Anaerobik koşullarda stafilocoklar glikozu fermente ederken mikrokoklar fermente etmezler (20, 23).

Lizostafin stafilocok hücre duvarında bulunan peptidoglikan tabakadaki pentaglisin köprülerini parçalayan ve bakteriyi ozmotik lizise duyarlı hale getiren bir endopeptidazdır (14). Tüp testte, 0,2 mililitre (ml) steril tuzlu su içinde bakterinin yoğun bir süspansiyonu hazırlanır. Üzerine 0,2 ml ticari lizostafin solüsyonu eklenerek 35°C'de 2 saat inkübe edilir. Başlangıçtaki süspansiyon bulanıklığının inkübasyon sonrası değerlendirilmede berraklaşması lizostafin duyarlılığı şeklinde yorumlanır. Agar testte ise, Mueller-Hinton Agar (MHA)'a 0,5 McFarland bulanıklığındaki test edilecek bakteri süspansiyonu inoküle edilir ve 10 mikrogram (µg) lizostafin içeren ticari disk yerleştirilir. MHA'da 35°C'de 24 saat inkübe

edildikten sonra değerlendirilir. Stafilokoklar 10-16 mm arasında değişen çapta duyarlılık zonu oluştururken, mikrokok ve ilişkili türlerde duyarlılık zonu oluşumu gözlenmez (9).

Furazolidon duyarlılık testi, stafilokok mikrokok ayrımında kullanılır. Test edilecek bakterinin steril distile su veya sıvı besiyerinde 0,5 McFarland bulanıklığında süspansiyonu hazırlanır ve KKA'a ekim yapılır. Ticari 100 µg furazolidon içeren disk agara yerleştirilir. Agar 35°C'de 18-24 saat inkübe edilir. Stafilokoklar furazolidon duyarlıdır ve inkübasyon sonrası yapılan değerlendirmede 15 mm veya daha fazla çapta duyarlılık zonu oluştururlar. Mikrokoklar ise furazolidona dirençlidir, inhibisyon zonu oluşturmazlar, 6-9 mm arasında değişen çapta zon oluşumu beklenir (9, 19).

Basitrasin duyarlılık testi, stafilokok mikrokok ayrımında kullanılan diğer bir yöntemdir. Steril distile su veya sıvı besiyerinde 0,5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonu MHA veya KKA yüzeyine ekilir. Ticari 0,04 ünite (U) basitrasin içeren disk agara yerleştirilir. Agar 35°C'de 18-24 saat inkübe edilir. Stafilokoklar basitrasine dirençlidirler ve inkübasyon sonrası yapılan değerlendirmede inhibisyon zon oluşumu gözlenmezken, mikrokoklar basitrasine duyarlıdırlar, 10 mm ve daha büyük çapta inhibisyon zonu oluştururlar (9, 19).

Modifiye oksidaz testi, stafilokok mikrokok ayrımında kullanılan diğer bir testtir. Bu test dimetil sülfoksit içinde tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorit emdirilmiş filtre kağıtları kullanılarak gerçekleştirilebilir. Besiyerinden alınan bakteri kolonisi filtre kağıt üzerine sürülür. Filtre kağıdında 30 saniye içinde mavi-mor renk oluşumunun gözlenmesi durumunda test pozitif olarak yorumlanır. Modifiye oksidaz testi mikrokok türlerinde pozitif; *S. lentus*, *S. sciuri*, *S. vitulinus* harici stafilokoklarda ise negatiftir (9).

Koagülaz testi *S. aureus*'un rutin mikrobiyoloji laboratuvar tanısında kullanılan temel testtir. Geleneksel koagülaz testi lam ve tüp koagülaz testi olarak iki şekilde gerçekleştirilebilir (9, 13, 19). Lam koagülaz testinde, birçok *S. aureus* kökeninde kümeleştirici faktör olarak da bilinen hücre duvarına bağlı koagülaz veya "clumping faktör" adı verilen enzim insan, tavşan veya domuz plazması ile aglütinasyon gösterir. Bakteri hücre yüzeyindeki bu enzim fibrinojen ile doğrudan reaksiyona girerek fibrine dönüştürür ve aglütinasyon oluşumuna neden olur. Test edilecek bakterinin yoğun tuz içermeyen besiyerinden alınması olası bir yalancı pozitifliğin önlenmesi açısından önemlidir. Bu yöntemde, test edilecek bakteri kolonileri temiz bir lam üzerinde steril su veya serum fizyolojik içinde yoğun bir şekilde süspanse edilir. Bir damla sulandırılmış etilen diamin tetra

asetik asit (EDTA) içeren tavşan plazması ile karıştırılır ve aglütinasyon oluşumu gözlenir. Aglütinasyon görüldüğünde araştırılan bakteri *S. aureus* olarak kabul edilebilir. *S. aureus* kökenlerinin %5 kadarında bağlı koagülaz enzim üretiminin görülmediği, bu sebeple lam koagülaz testi negatif suşlarda tüp koagülaz testinin yapılması gerekliliği unutulmamalıdır (19, 20, 23). Ayrıca *S. schleiferi* subsp. *schleiferi* ve *S. lugdunensis* gibi bazı KNS'larda bağlı koagülaz üretimi nedeniyle test pozitif bulunabilmektedir (9).

Tüp koagülaz test yöntemi, stafilokoagülaz veya serbest koagülaz varlığını tespit eder. Serbest koagülaz, bakterinin plazma ile inkübasyonu sonucunda pıhtılaşmaya neden olan hücre dışı bir moleküldür. Serbest koagülaz trombin benzeri bir molekül olan koagülaz reactingfaktör ile etkileşerek pıhtı oluşumuna neden olur. Bu iki molekül trombin gibi davranarak fibrinojenin fibrine dönüşümünü dolaylı yoldan sağlarlar (9). Test için, steril bir tüp içerisine serum fizyolojik ile 1:5 oranında sulandırılmış 1 ml EDTA'lı tavşan plazması konulur. Taze bakteri kolonisi cam tüpte plazma içerisinde homojen hale getirilir. Test tüpü 35°C'de inkübe edilir. İnkübasyonun 4. saatinde tüp pıhtı oluşumu açısından kontrol edilir. Pıhtı oluşumunun gözlenmediği tüplerin inkübasyonuna oda ısısında 18-24 saat daha devam edilmelidir. Çünkü bazı suşlar 35°C' de uzun inkübasyon periyodunda fibrinolizin üreterek pıhtının çözülmesine neden olabilir. İnkübasyon sonunda pıhtı oluşumu gözlenen tüpler koagülaz pozitif olarak değerlendirilir (9, 19). *S. aureus* harici *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. delphini*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans* gibi bazı KNS'lerin de tüp koagülaz testi pozitif olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır (9, 23).

*Staphylococcus aureus*'un rutin laboratuvar uygulamalarında mannitolü fermente etme özelliğinin gösterilmesinde sıklıkla %1 mannitol,%7,5 sodyum klorür, fenol kırmızısı ayırıcı ve pepton içeren mannitol salt agar seçici besiyeri kullanılır. Yüksek tuz konsantrasyonu diğer flora üyelerinin üremesini baskımlarken, mannitolü fermente eden *S. aureus* kolonileri çevresinde besiyerinde pembeden sarıya dönüşen renk değişimi gözlenir (8, 9).

Deoksiribonükleaz (DNaz) testi, özellikle şüpheli koagülaz test sonucu durumunda ya da koagülaz negatif özellik gösteren bazı *S. aureus* suşlarının tanısında yararlıdır. DNaz testi, deoksiribonükleik asit üretimini göstermektedir. DNA içeren katı besiyerinde test edilecek bakterinin inokülasyonu noktasal tarzda ve yoğun olacak şekilde yapılır. Besiyeri 35°C'de 24 saat inkübe edilir. İnkübasyon sonunda 1 N hidroklorik asit besiyeri yüzeyine dökülerek bakteri üremesinin olduğu bölge çevresinde DNA'nın hidrolize edilmesi sonucu

deoksiribonükleik asit üretimini gösteren şeffaf bir alan gözlenir. DNaz enziminin tespiti ayrıca bakterinin metakromatik boya olan toluidin mavisi içeren katı DNaz besiyerine ekilmesi ve inkübasyon sonunda ekim yeri çevresinde pembe renk gözlenmesi ile de tespit edilebilir (8, 9, 19).

#### 2.1.11.2. Serolojik yöntemler

*Staphylococcus aureus*'un serolojik tanısında kullanılmak üzere bakterinin antijenik özelliklerine dayalı birçok *manuel* veya otomatize ticari tanı sistemleri geliştirilmiştir. Kümeleştirici faktör, protein A, kapsüler polisakkarit ve gruba özgül antijen bu amaçla kullanılan başlıca bakteriyel yapılardır (15). Lateks aglütinasyon ve pasif hemaglütinasyon yöntemlerini esas alan kitler kolay uygulanabilir ve çabuk sonuç alınabilir olma özellikleri nedeni ile tercih edilmektedir. Bununla birlikte söz konusu testlerin yalnızca ön tanı testi olarak kullanılması ve doğrulama için altın standart yöntemlere başvurulması gerektiği unutulmamalıdır (24).

#### 2.1.11.3. Moleküler yöntemler

Moleküler biyolojideki gelişmeler doğrultusunda günümüzde polymerase chain reaction (polimeraz zincirleme tepkimesi, PCR) temeline dayalı genotipik yöntemlerle *S. aureus* tanısını koymak, bakteriye ait virülans faktörleri ve başta metisilin olmak üzere çeşitli antimikrobilyallere direnç varlığını tespit etmek mümkündür. Bugün için PCR yönteminin rutin laboratuvar tanıda yaygın olarak kullanılması her zaman mümkün olmamakla birlikte, yüksek duyarlılıkta sonuçlar alınabilmesi nedeniyle özellikle metisilin direncinin tespitinde altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir (8, 24).

*Staphylococcus aureus* suşlarının tiplendirilmesi ve neden olduğu epidemilerin araştırılması amacıyla kullanılan fenotipik yöntemlere ek olarak PCR'a dayalı random amplified polymorphic DNA, repetitive extragenic palindromic element, amplified fragment length polymorphism; multilocus sequence typing (MLST) ve pulsed-field jel elektroforezi (PFGE) gibi genotiplendirme yöntemlerinden yararlanılmaktadır (9).

#### 2.1.11.4. Diğer yöntemler

Günümüzde *S. aureus*'un tanımlanması ve antimikrobiyal duyarlılığın belirlenmesi amacıyla biyokimyasal özelliklere ve/veya enzim substrat testlerine dayalı birçok yarı otomatize veya tam otomatize hızlı ticari sistemler ya da kromojenik agar gibi özel besiyerlerinin kullanılması da söz konusudur. Bu test ve sistemler laboratuvarların gereksinimlerine göre rutin uygulamada da kullanılabilir (9, 24).

## 2.2. Antibiyotik Direncinin Özellikleri

### 2.2.1. Penisilin direnci

Bugün stafilokokların %90' nından fazlası penisilinaz üretmektedir.  $\beta$ -laktamaz için gen, plazmid üzerinde lokalize olmuş, aktarılabılır bir elementtir ve çoğu kez ek antimikrobiyal direnç genlerini de taşır.

Stafilokokların penisilin direncine  $\beta$ -laktamazı kodlayan blaZ geni aracılık eder.  $\beta$ -laktamaz ekstraselüler bir enzim olup, stafilokoklar  $\beta$ -laktam antibiyotiklere maruz kaldığı zaman sentezlenir. Bu enzim,  $\beta$ -laktam halkasını hidrolize ederek penisilini inaktive eder. blaZ, represör blaI ve antirepresör blaR1 olmak üzere iki regülatuar genin kontrolü altındadır (25).

Stafilokoklar 20-40 nanometre kalınlığında, peptidoglikan olarak adlandırılan ağ benzeri bir yapı ile çevrilmiştir (26). Peptidoglikan tabaka 3 bölümden meydana gelir:

- 1- Polisakkarit yapıda bir iskelet: Birbirine  $\beta$  (1,4) bağlarıyla bağlı, tekrarlayan N-asetil glukozamin (NAG) ve N-asetil muramik (NAM) asit alt birimlerinden oluşur.
- 2- N-asetil muramik asite bağlı D ve L aminoasitlerden oluşmuş tetrapeptid zincir.
- 3- Bir tetrapeptidin dördüncü aminoasitinin (alanin)  $\alpha$ -terminal karboksil grubu ile komşu N-asetil muramik asit'deki tetrapeptidin üçüncü aminoasitinin amino grubu arasındaki çapraz bağlar.

NAG ve NAM,  $\beta$  (1,4) bağları ile bağlanarak peptidoglikan iskeletini oluşturur.

Muramik asite bağlı tetrapeptid zincirlerindeki alanin aminoasitinin karboksi terminali ile lizin aminoasitinin amino grubu pentaglisin peptid zincirleri ile çapraz bağlanır (6).

Pentaglisin apraz kopruleri, fem (factor essential for resistance to methicillin) genlerinin kodladığı FemX, FemA, FemB proteinleri ile sitoplazmada oluşturulur. Bu Fem proteinleri ana peptiddeki L-lizin rezidulerine, glisin rezidulerini bağlar. Çapraz bağlama veya transpeptidasyon reksiyonlarını sitoplazmik membranın dış yüzeyinde yer alan “Penisilin Bağlayan Proteinler” (PBP) katalize ederler (25, 26). *S.aureus*'ta dört penisilin bağlayan protein PBP1-PBP2-PBP3-PBP4 vardır. Bu PBP'ler yüksek moleklağırlıklı iki protein domainine sahiptir. Birisi transpeptidasyon (apraz bağlamada) diğeri ise transglikolizasyonu (glikan zincirini büyüten) içerir. Ana peptide bağlı terminal D-alanin-D-alanin'e benzeyen -laktam antibiyotikler, PBP'lerin transpeptidasyon domainlerini (ve düşük moleküler ağırlıklı PBP'lerin karboksipeptidaz aktivitesini) inhibe ederler. Böylece apraz bağlanma reaksiyonuna müdahale ederler. Peptidoglikanın apraz bağlanması olmayınca hücre duvarı mekanik olarak zayıflar, sitoplazmik içeriklerin bazıları dışarı salınır ve hücre ölür (25-28).

Metisilin direnci, metisilini hidrolize eden -laktamaz ekspresyonundan ve normal PBP2'lerle karşılaştırıldığında daha düşük penisilin bağlama afinitesi olan, PBP2'nin değişmiş formlarının ekspresyonu yoluyla ortaya çıkar. Bununla birlikte *S.aureus*' da ki metisilin direncinin ana mekanizması PBP2a'nın ekspresyonu ile olur. Bu PBP2 ile karıştırılmamalıdır. PBP2a'nın sentezi normalde düşük seviyelerdedir, fakat bu sentezi düzenleyen genlerde mutasyon oluşursa sentez seviyesi artar (25-32).

MRSA, MSSA izolatlarından genetik olarak kromozomlarındaki “mec elementi” denilen yabancı DNA'nın varlığıyla ayrılır. mecA geni, 76 kDa ağırlığında PBP2a'yı kodlar. Mekanizması bilinmemekle beraber mecA geninin orjininin *Staphylococcus sciuri* olduğu ileri sürülmektedir. Diğer PBP'lerle benzer olarak PBP2a'da penisiline bağlanma ile ilişkili ortak yapısal motif gösterir. Fakat -laktam antibiyotiklere afinitesi oldukça düşüktür. Bunun sonucunda diğer PBP'lerin transpeptidasyon aktivitesini inhibe edebilecek metisilin dozlarında, PBP2a peptidoglikanda glikan zincirlerinin çapraz bağlanmasını sağlayacak şekilde aktif kalır. Bundan dolayı metisilin direncinde sefalosporinleri de içeren tüm -laktam antibiyotiklere direnç vardır (25-28).

### **2.2.2. Metisilin direnci**

MSSA izolatlarında beş adet PBP bulunmaktadır. MRSA izolatlarında ise bunlara ek olarak "PBP2a" olarak adlandırılan ve 78 kDa ağırlıkta olan farklı bir PBP vardır. PBP2a, diğerlerinden farklı olarak beta-laktam yapısındaki antibiyotiklere karşı oldukça düşük afinite gösterir ve böylece beta-laktam grubu antibiyotiklerin varlığında, yüksek afiniteli PBP'lerin fonksiyonunu görerek peptidoglikan sentezini devam ettirir (33). PBP2a, 2.1 kb büyüklüğündeki *mecA* geni tarafından kodlanır. Metisiline dirençli olan tüm stafilokok izolatlarında bu gen bulunur. *mecA* geni, stafilokokal kaset kromozomu (*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*; *SCCmec*) olarak adlandırılan kaset bölgesinde yerleşim göstermektedir. *ccr* (*ccrAB* veya *ccrC*) *vemecA* gen komplekslerinde görülen yapısal değişikliklere göre bugün için tanımlanmış 11 alt tipi (Tip I-XI) bulunmaktadır (33, 34).

MRSA çoklu ilaç direnci gösteren bir bakteri olması nedeniyle önemlidir. Tüm beta-laktam grubu antibiyotiklerin yanı sıra linkozamidler, makrolidler ve aminoglikozidlere karşı da direnç gösterir (33). Günümüzde MRSA tüm dünyada yaygın olarak görülmekte olup, prevalansı ülkeler arasında farklılık göstermektedir. Kuzey Avrupa ülkelerinde MRSA prevalansı %1'in altında iken, Güney Avrupa ülkelerinde, Amerika'da ve bazı Asya ülkelerinde bu oran %50'lere ulaşmıştır. Bu oran Amerika Birleşik Devletleri (ABD) yoğun bakım ünitelerinde ise %60'ları aşmıştır (33).

1990'lı yıllarda başlamak üzere hastane kaynaklı MRSA (HK-MRSA) enfeksiyonlarının yanı sıra toplum kaynaklı MRSA (TK-MRSA) enfeksiyonlarının görülme sıklığında da önemli bir artış ortaya çıkmıştır. TK-MRSA'ların moleküler mikrobiyolojisi HK-MRSA'lardan oldukça farklılık gösterir. HK-MRSA izolatlarında, genellikle tip I, II veya III *SCCmec* genetik elemanı bulunmaktadır. TK-MRSA izolatlarında ise başta tip IV olmak üzere tip V veya VII *SCCmec* genetik elemanı ve bakterinin virülansında rol oynayan bir toksini kodlayan "Panton-Valentine leukocidin (PVL)" geni bulunmaktadır. PVL, önemli bir virülans faktörü olup invaziv deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ve nekrotizan pnömoni ile ilişkili bulunmuştur. *SCCmec* tip II ve tip III taşıyan HK-MRSA izolatlarında metisilinin yanı sıra makrolid, klindamisin, streptogramin B ve tetrasiklin direnci de görülürken; TK-MRSA izolatları sıklıkla klindamisin, trimetoprim-sülfametoksazol, tetrasiklin, gentamisin, florokinolonlar ve kloramfenikole karşı duyarlıdır (36, 37).

TK-MRSA izolatlarının *SCCmec* tipleri, PFGE paternleri, MLST ve SPA (*Staphylococcal protein A*) profilleri HK-MRSA'lardan farklılık gösterir. Örneğin; ABD'de HK-MRSA enfeksiyonlarının önemli bir bölümünden USA100 ve USA200 sorumluyken,

TK-MRSA enfeksiyonlarından USA300 ve USA400 pulsotipleri sorumludur. Dolayısıyla TK-MRSA'ların HK-MRSA'lardan bağımsız olarak TK-MSSA'lardan geliştiği düşünülmektedir. Toplum kaynaklı ve hastane kaynaklı MRSA'lar sadece genetik farklılıklar değil aynı zamanda oluşturdukları enfeksiyonlar açısından da farklılık gösterirler. TK-MRSA'lar genellikle deri ve yumuşak doku enfeksiyonları (apse, follikülit vb.) ile pnömoniye yol açarken, HK-MRSA'lar solunum yolu enfeksiyonları, kan akımı enfeksiyonları ve cerrahi yara enfeksiyonları gibi klinik tablolara yol açarlar. TK-MRSA'lar günümüzde özellikle acil servis yoğun bakım ünitelerinde, yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde, askeri kışlalarda ve hapishanelerde meydana gelen enfeksiyonların önemli bir etkeni haline gelmiştir (38).

### 2.2.3. Vankomisin direnci

“Yenen, fetheden” anlamına gelen “vanquish” kelimesinden adını alan vankomisin, klinikte en sık kullanılan glikopeptit antibiyotiktir. Vankomisin ilkekez 1956 yılında Borneo adasında bulunan *Streptomyces orientalis*'ten izole edilen dar spektrumlu bakterisidal bir antibiyotiktir. İzolasyundan çok kısa bir süre sonra 1956 yılında pürifiye edilerek klinik kullanıma girmiştir. İlk yıllarda kullanılan preparatların saf olmaması ve yan etkilerin sıklığı nedeniyle metisilin kullanıma girdikten sonra önemini yitirmiş ancak, ilk kez 1961'de metisiline dirençli bir *Staphylococcus aureus* izolatının bildirilmesi ve 1982 yılından beri giderek artan MRSA enfeksiyonlarının ortaya çıkmasıyla birlikte yeniden önem kazanmıştır. Vankomisin ayrıca oral yolla verildiğinde, *Clostridium difficile* tarafından oluşturulan antibiyotikle ilişkili ishalin tedavisinde de hayli etkilidir, ancak ülkemizde vankomisin oral preparatı yoktur (39, 40).

1989'da ABD'de vankomisine dirençli enterokoklar önemli nozokomiyal patojenler olarak ortaya çıkmışlardır. VISA suşları 1996'da Japon hastanelerinde, 1997'de ABD'de saptanmıştır (41, 42).

Vankomisin yaklaşık 1450 dalton moleküler ağırlığı ile diğer antibiyotiklerden büyük moleküllü, çözünebilir özellikte trisiklik birpolipeptittir. Tedavide hidroklorür tuzu kullanılır ve vankomisin hidroklorür odasında 14 gün stabil kalır. Vankomisin başka bazı kimyasal maddelerle çözünmez bileşikler oluşturur. Bu yüzden klinikte sodyumbikarbonat, heparin, penisilinler, sülfonamidler, kloramfenikol, kortikosteroidler, aminofilin, vitaminler, varfarin ve barbitüratlar ile karıştırılarak uygulanmamalıdır (40).

Vankomisin, Gram pozitif bakterilerin hücre duvarı sentezini, peptidoglikan polimerlerinin D-alanil-D-alanin prekürsörlerine bağlanarak ve dolayısıyla transglikozilaz ve transpeptidaz enzimlerinin hedeflerini bozarak inhibe eder. Ayrıca RNA sentezini bozabilir ve sitoplazmik membran permeabilitelerini değiştirerek protoplastlara zarar verebilir. Hedef organizmalara hızlıca ve sıkıca bağlanarak çoğalmakta olan bakteriler üzerinde bakterisidal etki gösterir. Gram negatif bakterilerin lipid membranından penetre olamadıkları için bu mikroorganizmalar üzerinde etkili değildir. Vankomisinin serum düzeyi inhibitör konsantrasyonunun altına düştükten sonrada, 2 saat süren bir postantibiyotik etkiyle, antibakteriyel aktivitesi sürmektedir (40).

Vankomisin esas olarak Gram pozitif bakteriler üzerine etkilidir. VRSA'larda, VISA ve hVISA izolatlarında görülen glikopeptid direnç mekanizmaları birbirinden farklılık gösterir. VRSA'larda görülen direnç, vanA geni varlığına bağlıdır. Bu genin vankomisine dirençli enterokoklardan *S.aureus*'lara aktarıldığı düşünülmektedir. Vankomisin, sentezlenmekte olan peptidoglikanın D-alanin-D-alanin ucuna bağlanarak transpeptidasyon basamağını inhibe eder. vanA gen varlığında ise D-alanin-D-alanin yerine D-alanin-D-laktat sentezlenir. Böylece değişen öncül moleküllere vankomisin bağlanamaz ve hücre duvar sentezini inhibe edemez (3, 43).

VISA ve hVISA izolatlarında ise vanA geni bulunmaz. Bu izolatlarda vankomisin direncinden sorumlu olan mekanizma tam olarak açıklık kazanmamıştır. VISA ve hVISA izolatlarında görülen olası direnç mekanizmalarından birincisi "vankomisin tüketiminde artma"dır. Yapılan çalışmalar sonucunda VISA ve hVISA suşlarında hücre duvarının, vankomisine duyarlı olan *S.aureus* izolatlarına kıyasla daha kalın olduğu saptanmıştır (44). Bu izolatlarda hücre duvarında yer alan peptidoglikan zincirleri arasındaki çapraz bağların miktarında azalma görülmektedir. Çapraz bağ sayısının daha düşük olması nedeniyle serbest halde bulunan D-alanin-D-alanin miktarı daha fazladır. Vankomisin, bu serbest halde bulunan ve "tuzak moleküller" olarak adlandırılan D-alanin-D-alanin rezidülerine bağlandığı için asıl hedefine ulaşamaz. Bunun sonucunda vankomisin, hücre membranına yakın yerleşim gösteren öncül peptidoglikan zincirlerinde bulunan D-alanin-D-alanin moleküllerine yani asıl hedefine ulaşmadan büyük miktarlarda kullanılarak tüketilir. Bir diğer deyişle vankomisin molekülleri kalınlaşmış duvarda hapsedilir (trapping/spongeeffect). Hücre duvarında meydana gelen bu değişiklikler, hücre duvar metabolizmasının birçok yolağını içermek üzere birden fazla genetik değişiklikle ilişkilidir. Yapılan çeşitli çalışmalarda VraSR, GraSR ve WalKR olmak üzere iki komponentli regülasyon sistemleri hVISA ve VISA direnç türleriyle

direkt ilişkili bulunmuştur (3, 44, 45).

VISA ve hVISA izolatlarında görülen ikinci direnç mekanizması ise “tıkanma (clogging)”dır. Vankomisin büyük bir moleküldür. Tamamlanmış olan peptidoglikan tabakalarındaki tuzak moleküller tarafından büyük miktarda tutulan vankomisin molekülleri, diğer vankomisin moleküllerinin önünde fiziksel bir engel oluşturur. Dolayısıyla vankomisin molekülleri, oluşan bu fiziksel bariyeri geçip asıl hedeflerine ulaşamaz (46).

VISA/hVISA suşlarının, laboratuvarlarda uygulanan rutin duyarlılık testleriyle saptanması güçtür. Stafilokokların glikopeptid grubu antibiyotiklere karşı yalancı duyarlı olarak saptanmaları, bu suşlarla gelişen enfeksiyonların tedavisinde başarısızlığa yol açabilmektedir. Bu izolatların saptanması amacıyla, vankomisin içeren (4-6 mg/L) BKİA ile tarama, E-test, makro E-test ve PAP-AUC (population analysis profile-area under the curve; popülasyon analiz profili-eğri altında kalan alan) olmak üzere farklı yöntemler kullanılmıştır. Popülasyon analiz profili (PAP), bu suşların tespitinde halen altın standart yöntemdir (47-49). Bu çalışmada, agar tarama, makro E-test ve PAP-AUC yöntemleriyle VIS ve hVIS izolatlarının sıklığının araştırılması amaçlanmıştır (47).

### **3. GEREÇ VE YÖNTEM**

Araştırmamız Düzce Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenen 2012. 04. HD.066 protokol numaralı projedir. Proje 2012/257 karar no ile etik komite onayını 29.03.2012 tarihinde almıştır.

#### **3.1. Gereçler**

##### **3.1.1. Koyun kanlı agar**

Toz halindeki kanlı agar (HIMEDİA, Hindistan)'dan 40 gram 1000 ml distile suya eklenerek otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi, 45-50°C'de soğutuldu, %5 oranında defibrine koyun kanı ilave edilip karıştırılarak petri kutularına 12,5'er mL döküldü. Plaklar kullanılıncaya kadar +4°C'de buzdolabında saklandı. Bu besiyeri genel olarak stafiokokların tanısı için kullanıldı.

##### **3.1.2. Mueller-Hinton agar besiyeri**

Toz halindeki MHA (HIMEDİA, Hindistan)'dan 38 gram 1000 ml distile suya eklenerek otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi ve 13 cm'lik petri kutularına 4 mm kalınlıkta olacak şekilde dökülerek soğumaya bırakıldı. Plaklar kullanılıncaya kadar +4°C'de buzdolabında saklandı. Bu besiyeri disk difüzyon yöntemi ile duyarlılık testleri için kullanıldı (22).

##### **3.1.3. 6 µg/ml Vankomisin içeren BKİA**

Toz halindeki BKİA (HIMEDİA, Hindistan)'dan 38 gram 1000 ml distile suya eklenerek otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi ve 40-50°C'ye kadar soğutuldu. Daha sonra içerisine 6 µg/ml Vankomisin(1 gr flakon, Sandoz, Türkiye) eklendi ve homojenize olana kadar karıştırıldı. En sonunda bu karışım 13 cm'lik petri kutularına 4 mm kalınlıkta olacak şekilde dökülerek, soğumaya bırakıldı. Bu besiyeri vankomisin agar tarama yönteminde kullanıldı. Aynı besiyeri 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 µg/ml Vankomisin içeren şekli ile de hazırlandı. Bu besiyerleride PAP-AUC yöntemi için kullanıldı (47).

##### **3.1.4. 1-10 µg/ml Vankomisin içeren BKİA**

Toz halindeki BKİA (HIMEDİA, Hindistan)'dan 38 gram 1000 ml distile suya eklenerek otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi ve 40-50°C'ye kadar soğutuldu. Daha

sonra 10 tane ayrı steril kaba ayrıldı. Bunların içerisinde 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 µg/ml oranlarında vankomisin eklendi ve homojenize olana kadar karıştırıldı. En sonunda bu karışımlar ayrı oranlarda olacak şekilde 13 cm'lik petri kutularına 4 mm kalınlıkta dökülerek, soğumaya bırakıldı. Bu besiyeri PAP-AUC yöntemi için kullanıldı (47).

### **3.1.5. Oksasilinli MHA**

Toz halindeki MHA (HIMEDİA, Hindistan)'dan 38 gram 1000 ml distile suya eklenerek otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi ve 40-50°C'ye kadar soğutuldu. Daha sonra içerisinde %4 NaCl ve 6 µg/ml oksasilin tozu (Oxacillin sodium salt monohydrate, HIMEDİA, Hindistan) eklendi ve homojenize olana kadar karıştırıldı. En sonunda bu karışım 13 cm'lik petri kutularına 4 mm kalınlıkta olacak şekilde dökülerek, soğumaya bırakıldı. Bu besiyeri oksasilin agar tarama yönteminde kullanıldı (22).

### **3.1.6. Antibiyotik diskleri**

- Disk difüzyon testinde kullanılanlar:
- Sefoksitin (FOX)-30 µ g (HIMEDİA, Hindistan)

### **3.1.7. Cihaz ve ekipman**

- Etüv (Nüve, Türkiye)
- Otoklav (Nüve, Türkiye)
- Derin Dondurucu (Arçelik, Türkiye)
- Santrifüj (Nüve, Türkiye)
- Vorteks (Boeco, Almanya)

### **3.1.8. Kitler**

- Vankomisin E test (HIMEDİA, Hindistan)
- VITEK 2 Gram pozitif identifikasyon kartları (bioMérieux, Fransa)
- *S.aureus* ATCC 29213
- *S. aureus* ATCC 25923
- *S. aureus* ATCC 43300
- Mu3 (hVISA)
- Mu50 (VISA)

### **3.1.9. Otomatize sistemler**

### 3.1.9.1. Vitek 2 Sistemi (BioMérieux, St.Louis)

Hastanemiz Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında KNS'ların tiplendirilmesinde Vitek 2 sistemi kullanılmıştır. Vitek 2 cihazı Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Vitek 2 cihazı

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Örneklem grubunun oluşturulması

Metisilin dirençli stafilokoklarda vankomisin direncinin araştırılmasının amaçlandığı çalışma Ocak 2010-Kasım 2013 tarihleri arasında yapıldı. Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden (idrar, balgam, kan, yara sürüntüsü, bronş lavaj sıvısı, katater... vb.) izole edilen

edilen toplam 331 stafilokok suşu incelemeye alındı. Sadece MRSA'lar ve MRKNS'lar çalışmaya dahil edildi.

### **3.2.2. Etkenlerin izolasyonu ve tanımlanması**

İzolatların tanımlanmasında konvansiyonel laboratuvar yöntemleri kullanıldı. Bu amaçla %5'lik KKA'da üreyen kolonilerden öncelikle Gram boyama, %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalaz testi, lamda ve tüpte koagülaz testleri yapıldı. Gram pozitif, katalaz pozitif ve koagülaz pozitif bulunan izolatlar *S. aureus* olarak kabul edildi. KNS'lar bir ileri basamak olarak VITEK® 2 otomatize sistemi ile tiplendirildi. Bütün suşlar tek koloni tekniği ile saflaştırılıp BKİ sıvı besiyerinde üretildikten sonra -40°C'de derin dondurucuda çalışma gününe kadar saklandı.

### **3.2.3. Metisilin direncinin belirlenmesi ve yorumu**

#### **3.2.3.1. Oksasilin agar tarama**

*S.aureus* izolatlarında metisilin direncini saptamada, Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2010) önerileri doğrultusunda oksasilin agar tarama testi kullanıldı. Suşların serum fizyolojik içinde 0,5 McFarland eşeline uygun olarak hazırlanan süspansiyonları, %4 NaCl ve 6 µg/ml oksasilin içeren MHA ekilerek 35°C'de 24 saat inkübe edildi. Bir koloni ve fazlası üreme oksasilin direnci olarak kabul edildi. Kontrol suşu olarak metisiline duyarlı olduğu bilinen *S.aureus* ATCC 29213 ve metisiline dirençli ATCC 25923 kullanıldı (22).

#### **3.2.3.2. Sefoksitin disk difüzyon yöntemi**

KNS'larda metisilin direncinin saptanmasında oxacilin disk difüzyon testine göre duyarlılığı ve özgülüğü daha yüksek olan sefoksitin disk difüzyon yöntemi kullanıldı (50). Serum fizyolojik içinde 0.5 McFarland eşeline uygun hazırlanan bakteri süspansiyonundan MHA'a ekim yapıp 30µg sefoksitin diski yerleştirildikten sonra 35°C'de 24 saat inkübe edildi. CLSI tarafından belirlenen direnç sınır değerlerine göre inhibisyon zon çapı ≤ 21 mm olan izolatlar dirençli, ≥ 22 mm olan izolatlar ise duyarlı olarak kabul edildi (51-53). Kontrol suşu olarak *S. aureus* ATCC 25923 ve *S. aureus* ATCC 43300 kullanıldı.

### **3.2.4. Vankomisin direncinin belirlenmesi ve yorumu**

#### 3.2.4.1. Agar tarama yöntemi

Bu yöntem, “Centers for Disease Control and Prevention (CDC)” önerileri doğrultusunda 6 µg/mL vankomisin içeren BKİA besiyerinde yapıldı. 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlanan bakteri süspansiyonlarından 10’ar µl alınarak ekimler gerçekleştirildi ve plaklar 35°C’de normal atmosfer koşullarında toplam 48 saat inkübe edildi. Tarama besiyerlerinde 24. saatte üreyebilen bakteriler, kuşkulu vankomisine duyarlılığı azalmış stafilokok suşu (VIS), 48. saatte üreyen bakteriler ise kuşkulu heterojen vankomisine duyarlılığı azalmış stafilokok suşu (hVIS) olarak kabul edildi. Üreme göstermeyen izolatlar ise vankomisine duyarlı olarak değerlendirildi (47).

#### 3.2.4.2. Standart E-test yöntemi

Üretici firmanın önerileri doğrultusunda bakterilerin 0,5 McFarland eşeline uygun olarak serum fizyolojik içinde süspansiyonları hazırlandı ve MHA yüzeyine yayıldı. Vankomisin E-test şeritleri yerleştirildikten sonra 35°C’de 24 saat inkübe edilerek, vankomisin MIC değerleri belirlendi ve CLSI’nın önerdiği MIC değerleriyle karşılaştırıldı. Vankomisin MİK değerleri *S.aureus* için  $\leq 2$  µg/ml duyarlı, 4-8 µg/ml orta duyarlı,  $\geq 16$  µg/ml dirençli; KNS için  $\leq 4$  µg/ml duyarlı, 8-16 µg/ml orta duyarlı,  $\geq 32$  µg/ml dirençli kabul edildi. Kontrol suşu olarak *S.aureus* ATCC 29213 kullanıldı (47).

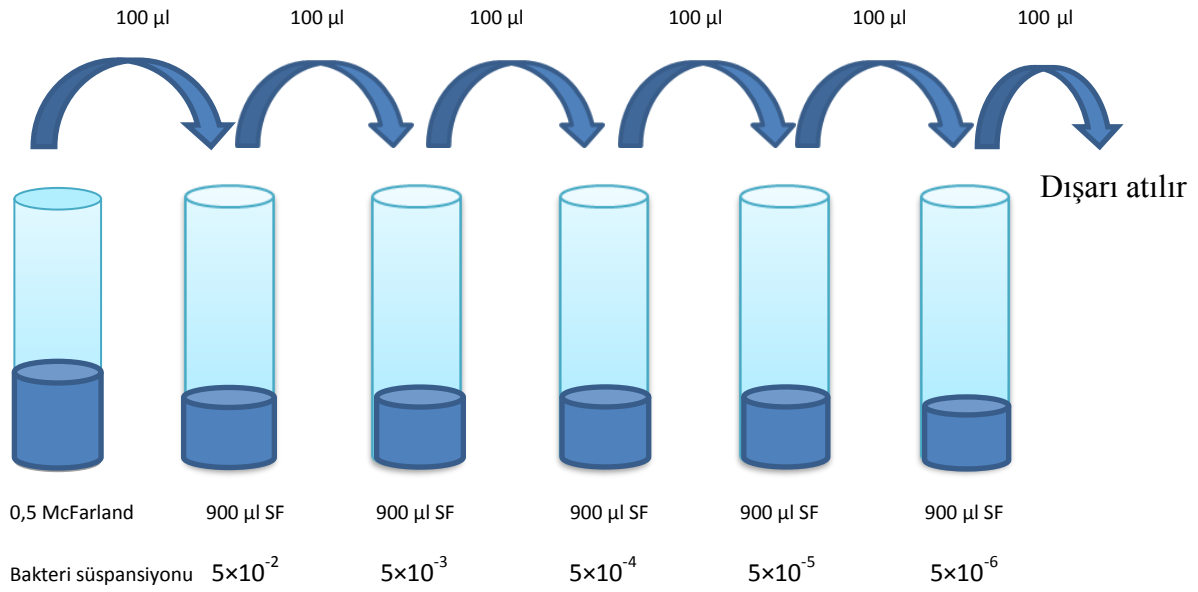
#### 3.2.4.3. Makro E-test yöntemi

Walsh ve arkadaşları (54) tarafından tarif edildiği şekilde, 2 McFarland bulanıklığına ayarlanan bakteri süspansiyonlarından 200 µl alınarak BKİA besiyerinin yüzeyine yayıldı, kuruması için 10 dakika beklendikten sonra, vankomisin (0.016-256 µg/ml) E-test şeritleri yerleştirildi. 35°C’de 48 saat inkübe edildi. Sonuçlar yorumlanırken, vankomisin MİK değerleri  $\geq 8$  µg/ml olan izolatlar VIS/hVIS olarak yorumlandı.

#### 3.2.4.4. Popülasyon analiz profili

PAP-AUC yöntemi, 6 µg/ml vankomisin içeren BKİA besiyerinde üreyen şüpheli hVIS/VIS izolatlarının duyarlılık düzeylerini doğrulamak amacıyla uygulandı. Şüpheli izolatların 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlanmış süspansiyonlarından ve 10 kat seri dilüsyonlarından 50’şer µl, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 µg/ml’şer vankomisin içeren BKİA besiyeri yüzeyine yayıldı. Bakteri süspansiyonlarının hazırlanışı Şekil 2’de ve PAP yönteminin yapılışı Şekil 3’de gösterildi. 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 stafilokok, 0,90-1,3 ise hVIS,  $\geq 1,3$  ise VIS olarak değerlendirildi (47). Kontrol suşu olarak Mu3 (hVISA) ve Mu50 (VISA) kullanıldı.



**Şekil 2.** Bakteri süspansiyonlarının hazırlanışı

x/y	0.5	0,05	0,005	0,0005	0,00005	0,000005
1 µg/ml	O	O	O	O	O	O
2 µg/ml	O	O	O	O	O	O
3 µg/ml	O	O	O	O	O	O
4 µg/ml	O	O	O	O	O	O
5 µg/ml	O	O	O	O	O	O
6 µg/ml	O	O	O	O	O	O
7 µg/ml	O	O	O	O	O	O
8 µg/ml	O	O	O	O	O	O
9 µg/ml	O	O	O	O	O	O
10 µg/ml	O	O	O	O	O	O

X: Bakteri süspansiyonunun McFarland oranı

Y: BKİA' daki vankomisin miktarı

O: Ekim yapılan petriyeler

**Şekil 3.** PAP yönteminin yapılışı

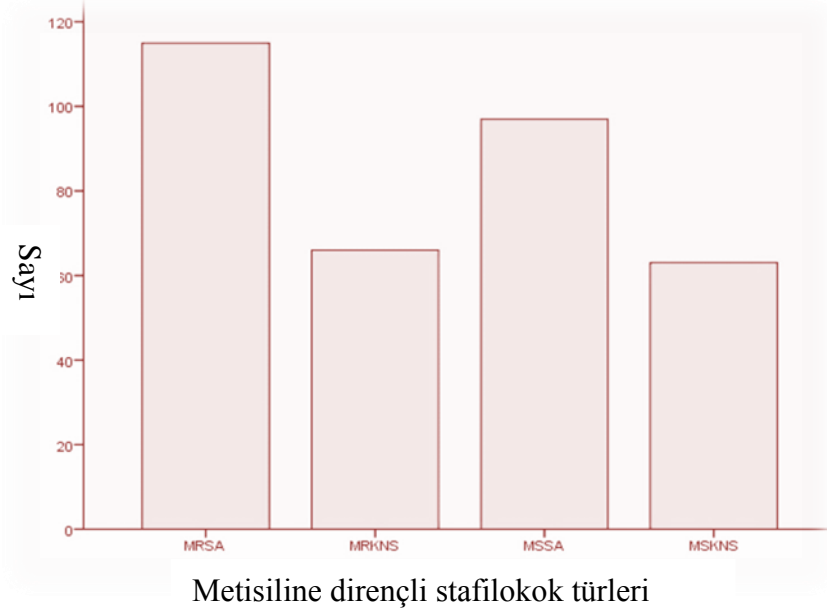
#### 4. BULGULAR

Çalışma süresi olarak belirlenen ortalama üç yıllık dönemde, hastalara ait kültür örneklerinin rutin değerlendirmeleri sonucunda toplam 341 stafilocok suşu (212 *S. aureus* ve 129 KNS) etken olarak izole edildi. 341 stafilocok suşunun 175 (%51,3)'i hastanede yatan hastalardan, 166 (48,7)'sı poliklinik hastalarından izole edildi. Stafilocok üretilmiş materyallerin gönderildiği kliniklere göre dağılımı Tablo 1'de gösterildi.

**Tablo 1.** Stafilocok izole edilmiş materyallerin gönderildiği kliniklere göre dağılımları

Klinik	Sayı	%
Acil Servis	76	22,3
Nöroşiruji	55	16,2
Pediyatri	47	13,8
Enfeksiyon Hastalıkları	28	8,2
Dahiliye Yoğun Bakım	27	7,9
Ortopedi	24	7,1
Dahiliye	22	6,5
Dermatoloji	18	5,3
Üroloji	15	4,4
Reanimasyon	11	3,2
Diğerleri	11	3,3
Nöroloji	7	2,1
<b>Toplam</b>	<b>341</b>	<b>100</b>

*S. aureus* izolatlarının 115 (% 54,2)'i MRSA, 97 (%45,8)'si MSSA olarak saptandı. KNS izolatlarının ise 66 (%51,2)'sı MRKNS, 63(%48,8)'ü MSKNS olarak bulundu. İzolatların genel olarak direnç dağılımları Şekil 4'de ve Tablo 2'de gösterildi.



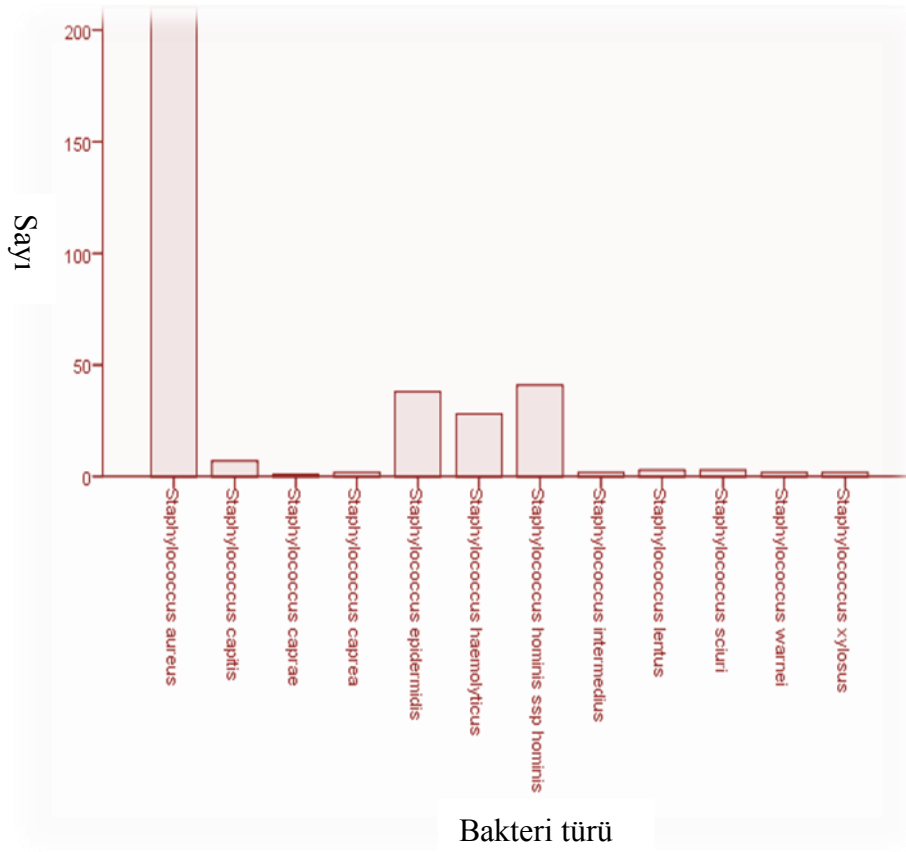
**Şekil 4.** Stafilokok suşlarında saptanan metisiline direnç oranlarının dağılımı

**Tablo 2.** İncelenen tüm stafilokok suşlarında metisilin direnç oranlarının dağılımı

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

#### 4.1. Stafilokok İzolatlarının Türleri

341 stafilokok suşunun 212(%62,2)'si *S. aureus*, 129(%37,8)'u KNS idi. KNS suşlarının 41(%31,8)'i *S.hominis*, 38(%29,5)'i *S.epidermidis*, 28(%21,7)'i *S.haemoliticus* idi. Stafilokokların tür dağılımları Şekil 5'de gösterildi.



Şekil 5. Stafilocokların tür dağılımları

#### 4.2. İzolatların Klinik Örneklerle Göre Dağılımı

Çalışmaya alınan 341 stafilocok suşunun 152(%44,6)'si kan ve kateter, 98 (%28,7)'i yara, 52(%15,2)'si idrar, 28(%8,2)'i solunum yolu, 7(%2,1)'si doku, 4(%1,2)'ü ise periton sıvısı örneklerinden enfeksiyon etkeni olarak izole edildi. İzolatların klinik örneklerle göre dağılımı Tablo 3'de gösterildi.

Tablo 3. İzolatların klinik örneklerle göre dağılımı ve yüzdesi

Örnek Türü	Sayı	%
Kan ve Katater	152	44,6
Yara	98	28,7

İdrar	52	15,2
Solunum yolu	28	8,2
Doku	7	2,1
Periton sıvısı	4	1,2
<b>Toplam</b>	<b>341</b>	<b>100</b>

#### 4.3. MRSA İzole Edilmiş Materyallerin Gönderildiği Kliniklere Göre Dağılımları

Örnek Türü	Sayı	%
YBÜ	26	22,6
Enfeksiyon	24	20,9
Nöroşiruji	18	15,6
Ortopedi	15	13
Dahiliye	13	11,3
Pediyatri	13	11,3
Üroloji	6	5,3
<b>Toplam</b>	<b>115</b>	<b>100</b>

YBÜ: Yoğun bakım üniteleri

#### 4.4. MRSA İzolatların Klinik Örneklerle Göre Dağılımı

Örnek Türü	Sayı	%
Yara	69	60
Solunum yolu	23	20
İdrar	14	13

Kan ve Kateter	4	3,5
Periton sıvısı	4	3,5
<b>Toplam</b>	<b>115</b>	<b>100</b>

#### 4.5. MRKNS İzolatlarının İzole Edilmiş Materyallerin Gönderildiği Kliniklere Göre Dağılımları

Örnek Türü	Sayı	%
Dahiliye	17	25,8
YBÜ	15	22,7
Acil	12	18,2
Pediyatri	9	13,6
Ortopedi	7	10,6
Diğerleri	6	9,1
<b>Toplam</b>	<b>66</b>	<b>100</b>

YBÜ: Yoğun bakım üniteleri

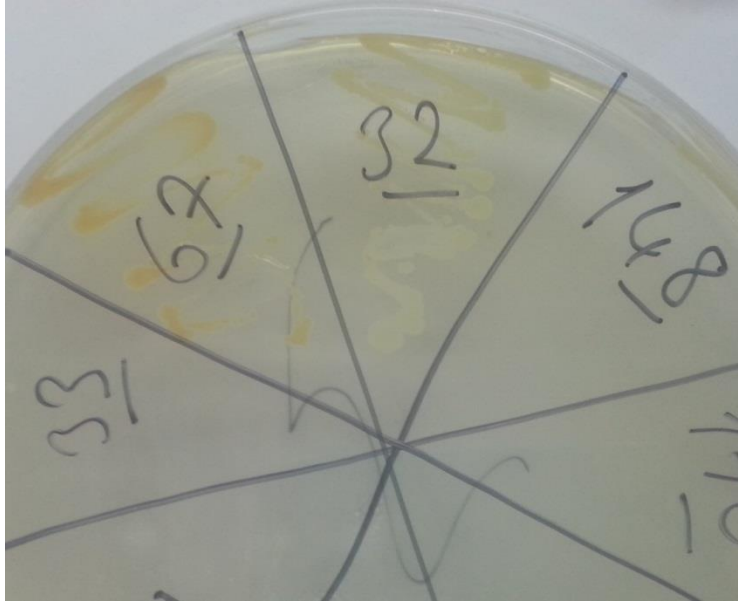
#### 4.6. MRKNS İzolatlarının Klinik Örneklerle Göre Dağılımı

Örnek Türü	Sayı	%
Kan ve Kateter	35	53
Yara	17	25,8
İdrar	12	18,2

Diğerleri	2	3
<b>Toplam</b>	<b>66</b>	<b>100</b>

#### 4.7. Agar Tarama Yöntemi Sonuçları

Metisilin dirençli stafilokoklarda vankomisin direncini saptamada tarama yöntemi olarak kullanılan vankomisin agar besiyerine ekilen 181 metisilin dirençli stafilokok(*S.aureus* ve KNS) suşunun ilk 24 saatte sadece ikisinde üreme saptandı. Üreme saptanan suşların her ikisi de *S. aureus* idi. 48.saatte yeni üreme hiç olmadı. Vankomisinli agar tarama yöntemi sonuçları Tablo 4’de ve Şekil 6’ da gösterildi.



Şekil 6. Vankomisinli agar tarama yönteminde üreme görülen izolatlar

Tablo 4. Vankomisinli agar tarama yöntemi sonuçları

İzolat türü	24. saatte üreme	48. saatte üreme
MRSA	2	-
MRKNS	-	-
<b>Toplam</b>	<b>2</b>	<b>0</b>

#### 4.8. Standart ve Makro E Test Sonuçları

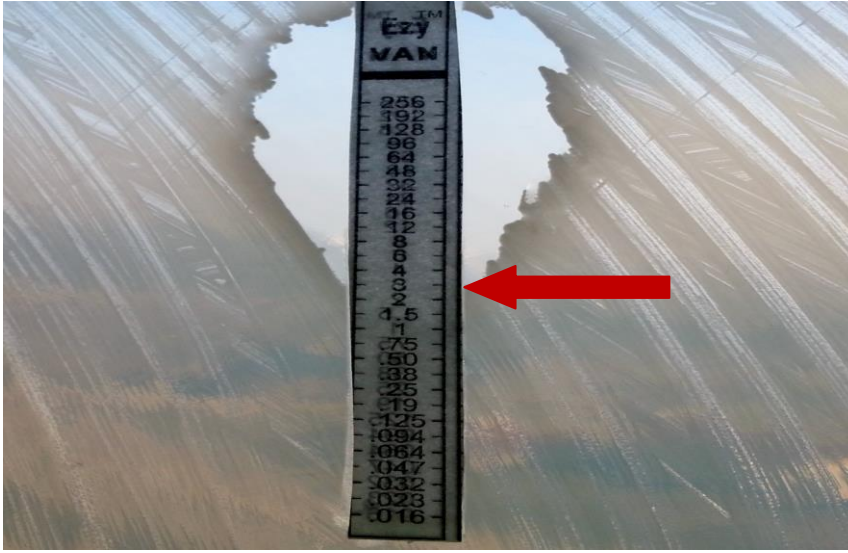
Vankomisinli agar tarama yönteminde üreme görülen MRSA suşları 1 ve 2 numaralı izolatlar olarak isimlendirildi. Bu MRSA suşları standart E Test ve Makro E Test incelemelerinde vankomisine duyarlı olarak bulundu. Test sonuçları Tablo 5 ile Şekil 7 ve 8'de gösterildi.

**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 Nolu	1,5	3
2 Nolu	2	4



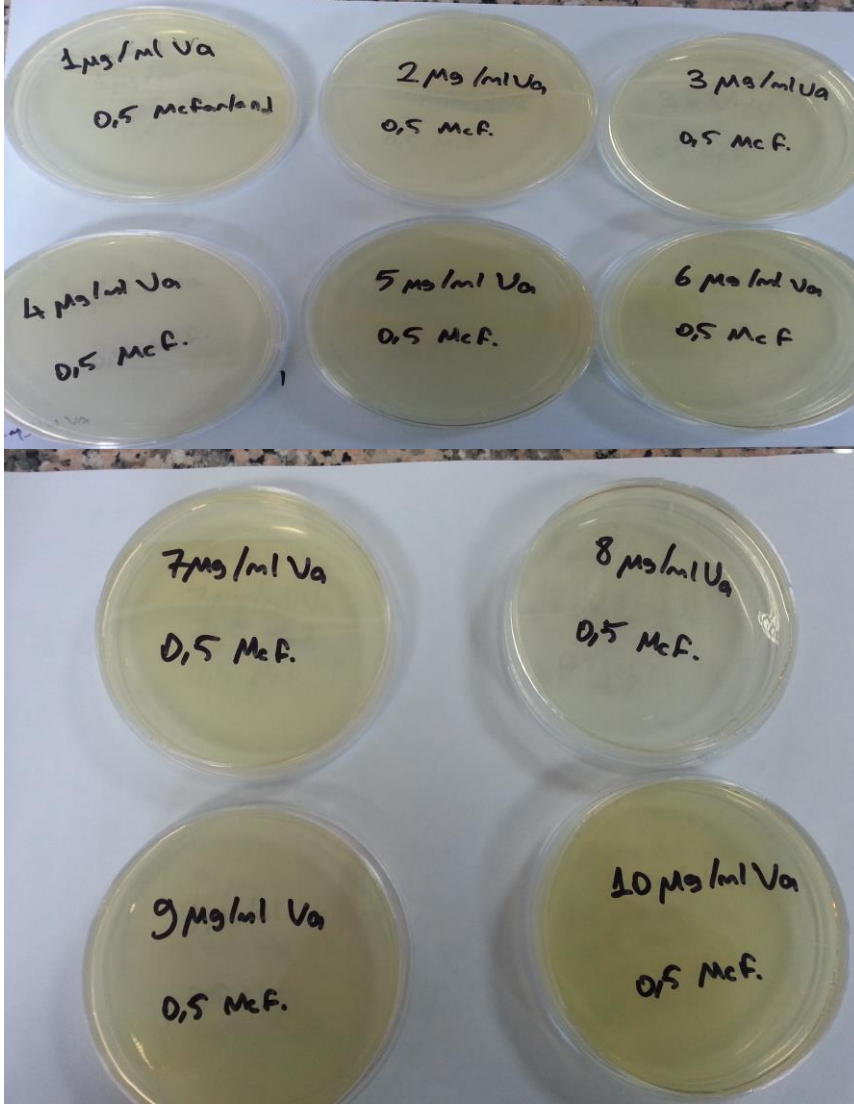
Şekil 7. 2 nolu izolatın Standart E test sonucu



Şekil 8. 1 nolu izolatın Makro E test sonucu

#### 4.9. PAP Yöntemi Sonuçları

Vankomisinli agar tarama yöntemi ile şüpheli bulunan hVIS/VIS suşlarının hiçbir sulandırımı ve vankomisin konsantrasyonlarında üreme saptanmadı. Bu yöntemle alınan sonuçların sadece bir serisi Şekil 9’da gösterildi.



Şekil 9. PAP yönteminde 0,5 McFarland bakteri süspansiyonu ile alınan sonuçlar

## 5. TARTIŞMA

Gram pozitif koklar, özellikle stafilokok türleri, son yıllarda hastane kaynaklı enfeksiyonlarda Gram negatif bakterilerden daha sık sorumlu tutulan etkenler olarak karşımıza çıkmaktadır. İlk defa 1881 yılında İskoçya'lı cerrah Alexander Ogston tarafından patojen olarak tanımlanan stafilokoklar, çok ağır seyreden, tedavisi güç, ölümcül enfeksiyonlara neden olmaktadır (21). Alexander Fleming'in 1928 yılında penisilini bulması sonrasında 1940 yılında Forey ve Chain tarafından penisilinin büyük miktarlarda üretiminin başarılması ile stafilokokal enfeksiyonların tedavisinde önemli bir aşama kaydedilmiştir. Ancak penisilinin yaygın klinik kullanıma girmesiyle birlikte, penisilini parçalayan stafilokok suşları ortaya çıkmıştır. Penisilinaz üretimi ilk olarak 1940'da Abraham Chain tarafından *Escherichia coli*'de saptanmış, ilk penisilinaz üreten stafilokoklar ise 1944'de Kirby tarafından bildirilmiştir. Bu tarihten itibaren stafilokoklarda penisilin direnci giderek artmış, 1950'li yıllarda penisilinin yanı sıra eritromisin, tetrasiklin, streptomisin gibi o dönemde kullanımda olan diğer antibiyotiklere de direnç gelişmiştir (21). Penisilinaza dirençli penisilinlerin (metisilin), 1960'da kullanıma girmesiyle birlikte stafilokokal enfeksiyonların tedavisinde 2. önemli aşama kaydedilmiştir. Ancak çok kısa bir süre içerisinde (1961) stafilokoklarda 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 (21). Özellikle yoğun bakım ünitelerinde olmak üzere MRSA enfeksiyonları giderek artan oranlarda rapor edilmektedir (1,2).

MRSA suşlarının sebep olduğu enfeksiyonların yüksek morbidite ve mortaliteye sahip olması, ek maliyete neden olması, başta MRSA olmak üzere, çoklu antibiyotik direnci gösteren stafilokokların prevalansının hemen her ülkede izlenmesine ve konuya ilişkin çok merkezli çalışma programlarının düzenlenmesine neden olmuştur (55).

1997-1999 yılları arasında 17 ayrı ülkeden toplanan *S.aureus* suşlarında metisilin direnç oranları; İsviçre'de %1,8, Hollanda'da %2, Almanya'da %4,9, Kanada'da %5,7, Avusturya'da %9,4, İspanya'da %19,3, Fransa'da %21,4, Belçika'da %25,6, İngiltere'de %27,5, ABD'de %34,2, Yunanistan'da %34,4, Türkiye'de %37,5, İtalya'da % 50,5, Portekiz'de %54,4, Tayvan'da %61,1, Japonya'da %71,6 ve Hong Kong'da %73,8 olarak

belirlenmiştir (56).

Avrupa'nın Türkiye dışındaki 26 ülkesinde yapılan ve sonuçları 2004 yılında yayınlanan başka bir çalışmada, *S.aureus* suşlarındaki en düşük metisilin direnci oranları İzlanda (%0,5), Danimarka (%0,6), Hollanda (%0,6), İsveç (%0,8) ve Estonya (%0,9)'da saptanmıştır. En yüksek metisilin direnci oranları İtalya (%40,9), İrlanda (%41,2), İngiltere (%41,5), Malta (%43,8) ve Yunanistan (%44,4) olarak bildirilmiştir (57).

Türkiye'de 1996-1999 yılları arasında yapılan dokuz ayrı çalışmada bildirilen metisilin direnç oranlarının ortalaması %47,5 olarak hesaplanmış, 2000-2003 yıllarında ise sekiz ayrı çalışma sonuçlarının ortalaması da bu orana çok yakın (%46,6) bulunmuştur (58, 59). Ancak ülkemizde 2003-2004 yıllarında hastanede yatan hastalardan izole edilen *S.aureus* suşlarına ilişkin verileri içeren yayımlar, bu yıllarda metisilin direncinin artarak %52'ye yükseldiğini göstermiştir (59). 2008-2009 yıllarında Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı'nca yayınlanan Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı (UHESA) Raporu Özet Veri Kitapçığı'nda sunulan antimikrobiyal direnç hızlarının persentil dağılımları tablosunda MRSA'nın ağırlıklı genel ortalaması 2008'de 58,9, 2009'da 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 (24). Bizim çalışmamızdaki MRSA oranı da (%54,2) Türkiye geneli ortalamalarına yakın olarak bulunmuştur.

Ülkemizde yapılan yayınlara baktığımızda; Özgüneş ve ark.'nın, İstanbul'da yaptıkları çalışmada yatan hastalardan ve poliklinik hastalarından izole ettikleri 223 *S. aureus* suşunun 105 (%47)'inde metisilin direnci saptamışlardır (60, 61). Kurutepe ve ark. 1998-2002 tarihleri arasında Manisa'da yaptıkları çalışmada toplam 814 *Staphylococcus aureus* suşunda 264(%32.4) metisilin direnci saptamışlardır (62). Ekşi ve ark. Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde çeşitli klinik örneklerden izole edilen 116 *S. aureus* suşunda %4 NaCl içeren MHA ve 1 µg'lık oksasilin diski kullanılarak metisilin direncini araştırmışlardır. 116 *S. aureus* suşunun 71(%61.2)'ini MRSA, 45(%38.8)'ini de MSSA olarak belirlemişlerdir (63). Özel ve ark.'nın 2006- 2008 tarihleri arasında Ankara'da, çeşitli klinik örneklerden izole ettikleri toplam 247(125 *S. aureus*, 122'si KNS) stafilokok suşunda PBP2a lateks aglütinasyon yöntemi ile metisilin direnci araştırmışlardır. KNS'larda 66(%54.1), *S.aureus*'larda 53(%42.4) oranlarında metisilin direnci bulmuşlardır (64). Aytar ve ark. 2011-2012 tarihleri arasında Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde kan kültürlerinde etken

olarak üretilen 264 *S.aureus* suşunda metisilin direnci araştırmışlar, oksasilin ve/veya sefoksitin direnci saptanması durumunda izolatu metisiline dirençli kabul etmişlerdir. 264 *S.aureus* suşunun 172(% 65)' sinde oksasilin direnci ve 169(% 64)'unda sefoksitin direnci bulmuşlardır (65). Çalışmaları genel olarak değerlendirdiğimizde metisilin direncinin *S. aureus*'larda %14 - %65, KNS'larda %54 - %73 arasında olduğu görülmüştür. Çalışmamızda saptadığımız %54,2 MRSA, %48,8 MRKNS oranları Türkiye'den bildirilen çalışmalara benzer; ancak Avrupa ve Amerika'dan bildirilen MRSA oranlarına göre yüksek olduğu görülmüştür. Bu durumun Türkiye'de antibiyotik kullanım politikalarının gevşek olmasından, reçetesiz antibiyotik satılmasından, yetkisiz kişiler tarafından antibiyotiklerin rahatlıkla kullanılabilmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Metisilin direncini tespit etmede çok çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Metisiline dirençli stafilocokların, hatalı olarak duyarlı saptanması tedavi başarısızlıklarına, benzer şekilde metisiline duyarlı stafilocokların da dirençli tanımlanması gereksiz yere glikopeptid antibiyotiklerin kullanılmasına, toksik etkilerine maruz kalınmasına ve tedavi maliyetinin artmasına yol açmaktadır (32, 66).

Konvansiyonel fenotipik metodlarla bütün metisilin direnç profilleri saptanamayabilmektedir. Bu nedenle stafilocoklarda, metisilin direncini belirleyebilmek için PCR ile *mecA* geninin tespiti altın standart olarak kabul edilmektedir. Fakat her laboratuvarın moleküler teknikleri kullanma imkânı olmadığından, metisilin direncini gösteren fenotipik yöntemlerin duyarlılıklarını araştıran birçok çalışma yapılmıştır. CLSI tarafından 2010 yılında, metisilin direncini göstermede referans yöntem olarak kabul edilen oksasilin sıvı mikrodilüsyon kadar yüksek performans gösterdiği için sefoksitin disk difüzyon yöntemi tavsiye edilmiştir (50).

Çeşitli çalışmalarda PCR yöntemi ile *mecA* geni analizi referans alınarak, oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon yöntemlerinin MRSA tespitindeki duyarlılıkları incelenmiştir. Oksasilin ve sefoksitin disk difüzyon yönteminin duyarlılığını sırasıyla Valesco ve ark. %94,1 - %100; Boutiba ve ark. %90,4 - %96-5; Swenson ve ark. %91 - %99; Felten ve ark. %96,4 - %100; Mimica ve ark. %96 - %98; Telli ve ark %98,8 - %98,3 ve Salimnia ve ark. %93,3- %99,7 olarak bildirmişlerdir (32, 67-71). Bu çalışmalarda metisilin direncini belirlemede, sefoksitin disk difüzyon yöntemi, oksasilin disk difüzyon yönteminden daha üstün bulunduğu bildirilmiştir (22). Çalışmamızda, sefoksitin disk difüzyon yöntemi ile MRKNS %48,8 oranında bulunmuştur.

Metisiline direnci saptamada fenotipik yöntem olarak kullanılan oksasiline MHA metodunda yüksek tuz konsantrasyonunun (%2-4) metisilin direncinin ortaya çıkmasında fayda sağladığı bildirilmektedir (72). Çalışmamızda bu nedenden dolayı %4 lük NaCl'li oksasiline içeren MHA kullanılmıştır. Metisiline heterojen dirençli suşların tespit edilebilmesi için inokulum miktarının artırılması önerilmektedir. Ancak inokulumun artırılması yöntemin güvenilirliğini azaltmaktadır. Burada standart bir inokulum miktarının kullanılması önem taşımaktadır. Çalışmamızda standart inokulum miktarı olarak MacFarland 0,5 yoğunluğu kullanılmıştır.

Metisilin direncini belirlemede düşük inkübasyon ısıları(30°C) 35°C'ye göre daha başarılı bulunduğu gösterilmiştir (73). Aynı zamanda heterojen dirençli suşlar yavaş ürettiği için inkübasyon süresinin 48 saate çıkarılması test güvenilirliğini arttırdığı gösterilmiştir (72, 74, 75). Çalışmamızda 35°C'de 48 saat inkübasyon uygulanmıştır. Ancak 24. saat ve 48. saat arasında metisilin direnci saptanması bakımından bir fark bulunmamıştır.

Günümüzde KNS türlerinde metisilin direncine sık rastlanmaktadır. KNS'lardaki direnç mekanizması *S.aureus* suşlarındaki ile aynıdır. Ancak MRSA suşlarından farklı olarak MRKNS çok daha yaygın olarak bulduklarından genellikle tek bir suşun yayılımına bağlı olarak gelişen epidemilere rastlanmamaktadır. Bu nedenle MRKNS ile kolonize/infekte hastaların izolasyonu önerilmemektedir (76-78). Türkiye'de yapılan çeşitli çalışmalarda MRKNS görülme oranları %54,1 ve %58 olarak bildirilmiştir (64, 79). Çalışmamızda toplam 129 KNS suşunun 66(%51,2)'sı MRKNS olarak bulunmuştur. Bütün KNS izolatlarının tür düzeyinde ayırımına baktığımızda çoğunun (%61,3) kontaminant bakteriler olarak bilinen *S.hominis* ve *S.epidermidis*'e ait olduğu görülmüş ve yüksek direnç oranlarının buna bağlı olduğu düşünülmüştür.

Kırca'ya ait tez çalışmasında 2006-2007 yılları arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde klinik örneklerden toplam 66 MRSA suşu izole etmişler ve bunların %28,7 yara, %19,6 kan, %18,1 bronkoalveoler lavaj, %9 balgam örneklerinden izole edildiğini bildirmişlerdir (22). Hoşbul'a ait tez çalışmasında 2006–2008 yılları arasında GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesinde 105 MRSA suşunun %39'unu kan ve katater, %28,6'sını yara , %21,9'unu solunum yolu ve %10,5'ini ise apse, doku ve idrar örneklerinden soyutlamışlardır (80). Çalışmamızda izole edilen MRSA'ların örneklerin gönderildiği kliniklere göre dağılımında %22,6 YBÜ'lerinde, %20,9 enfeksiyon hastalıkları kliniğine, %15,6 nöroşiruji, %13 ortopedi, %11,3 dahiliye kliniğine ait olduğu görülmüştür.

Bu bölümlerin hastaların uzun süre yatarak yoğun antibiyotik tedavisi aldığı klinikler olduğu dikkat çekmektedir. MRSA ların örneklere göre dağılımı incelendiğinde %60'ı yara, %20'si solunum yolu, %13'ü idrar, %3,5'i kan ve kateter olarak bulunmuştur. Bildirilen diğer çalışmalarla benzer olarak en sık yara kültürlerinden etkenin izole edildiği görülmüştür. Buna karşın MRKNS'ların kliniklere göre dağılımı incelendiğinde %25,8 dahiliye, %22,7 YBÜ, %18,2 acil, %13,6 pediatri kliniğine ait olduğu; izole edildiği klinik örneklere göre dağılımı incelendiğinde %53 kan ve kateter, %25,8 yara, %18,2 idrar olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçların da bildirilen diğer çalışmalarla benzer olduğu görülmüştür. Mikrobiyoloji laboratuvarında izole edilen KNS'ların 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 çoğunlukla kontaminant bakteri olarak kabul edilen *S. hominis* ve *S. epidermidis* en sık izole edilen KNS türleri olarak karşımıza çıkmıştır.

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 (36). 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 (36).

İlk kez 1996 yılında Japonya'dan Hiramatsu ve arkadaşları vankomisine azalmış duyarlılık gösteren MRSA klinik izolatını tanımlamışlardır. Bu izolatın vankomisin MİK değerini, mikrodilüsyon yöntemi ile 8 µg/ml olarak tespit etmişlerdir (41). Bunu takiben, Amerika'dan iki ve Fransa'dan bir olgu olmak üzere vankomisine azalmış duyarlılık gösteren diğer *S.aureus* izolatları da bildirilmiştir (81, 82). Vankomisin MİK değerleri 8µg/ml olarak saptanan bu izolatlar, CLSI kriterlerine göre VISA olarak tanımlanmıştır (81, 82). Bütün bu olgular ayrıntılı olarak incelendiğinde ortak olan özellik, direnç gelişiminden altı ay önceki dönem içinde birçok kez ve uzun süreli olmak üzere vankomisin ya da teikoplanin tedavisinin uygulanmış olmasıdır. 1996 yılından sonra Asya, Amerika ve Avrupa ülkelerinden olmak üzere vankomisin MİK değerleri 8-16 µg/ml arasında değişen diğer VISA izolatları bildirilmeye başlanmıştır (83, 84). 2007 yılına gelindiğinde ise tüm dünyadan bildirilen VISA izolatları yaklaşık 100'ü bulmuştur (85).

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 (86). Bu ilk izolatdan sonra birçok ülkeden değişen oranlarda hVISA izolatları bildirilmiştir (87). 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  $10^4$ - $10^5$ 'de bir sıklıkta olmak üzere, MİK değeri  $>2$   $\mu\text{g/ml}$  olan bir subpopülasyon içeren suşlar hVISA olarak tanımlanmaktadır (87). MRSA'lar içerisinde VISA suşlarına halen ender olarak rastlanmasına rağmen, hVISA suşlarının görülme sıklığı %0,71-65 arasında olmak üzere değişkenlik göstermektedir (55, 87-89).

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 (43).

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 artırabilmek 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 (28). Dolayısıyla daha önceden hVISA olarak tanımlanmış olan izolatlardan bazıları, yeni belirlenmiş olan değerlere göre VISA olarak kabul edilmektedir. Benzer olarak “European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing (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 (45).

hVISA izolatları standart duyarlılık testleriyle tanımlanamamaktadır. Bugüne kadar hVISA izolatlarının tanımlamasında birçok yöntem denenmiştir. Bunların arasında Hiramatsu'nun popülasyon analizi yöntemi, E-test makrometod ve PAP-AUC yöntemi

sayılabilir (87). PAP-AUC yöntemi günümüzde hVISA izolatlarının saptanmasında altın standart olarak kabul edilmekle birlikte, rutinde uygulanması zor, pahalı ve zahmetli bir yöntemdir. E-test makrometod 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 (87, 89, 91).

VRSA, VISA ve hVISA izolatlarının yanı sıra ortaya çıkan bir başka problem ise son yıllarda özellikle bazı merkezlerde ortaya çıkan vankomisin MİK değerlerinde görülen yükselmedir (92, 93). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *S.aureus* izolatlarının vankomisin MİK değerleri, CLSI direnç sınır değerlerinin altında olmasına rağmen, yıllara göre değerlendirme yapıldığında vankomisin MİK değerlerinde yükselmeler olduğu gözlenmiştir. Duyarlılık aralığında kalmak koşuluyla vankomisin MİK değerlerinde yükselme görülmesi “MIC creeping” olarak adlandırılmaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalarda vankomisin MİK değerleri 1 µg/ml ve 2 µg/ml olan MRSA izolatları ile meydana gelen enfeksiyonlar karşılaştırıldığında, vankomisin tedavi başarısızlığının, vankomisin MİK değerleri yüksek izolatlarla meydana gelen enfeksiyonlarda daha yüksek olduğu saptanmıştır (83, 93). Örneğin; yapılan bir çalışmada vankomisin MİK değeri  $\geq 2$  µg/ml olan MRSA’larla meydana gelen enfeksiyonlardaki klinik yanıt (%62), MİK değeri  $< 2$  µg/ml olanlarla elde edilenden (%85) daha düşük bulunmuştur (2).

Nakipoğlu ve arkadaşları’nın İstanbul Tıp Fakültesi’nde 2001-2002 tarihleri arasında yaptıkları araştırmada, 81 *S.aureus*, 54 KNS olmak üzere toplam 135 metisiline dirençli ve duyarlı stafilokokta VISA ve hVISA suşlarına rastlanmadıklarını bildirmişlerdir (94). Çelikkbilek ve ark. Kasım 2006-Ağustos 2010 tarihleri arasında, Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi laboratuvarlarında çeşitli klinik örneklerden üretilen 67 MRSA izolatının vankomisin, teikoplanin, linezolid ve daptomisine karşı duyarlılıklarını ve bu ilaçların MİK değerlerini E-test yöntemi ile belirlemişlerdir. Çalışmada, vankomisine olası orta duyarlı (mikrodilüsyon ve popülasyon analizi ile doğrulanmadığından olası olarak kabul edilmiştir) bir izolat (%1.5) dışındaki tüm izolatlar test edilen dört ilacın tamamına duyarlı bulunmuştur (95). Dizbay ve ark. İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesinde 2005 yılında yaptıkları çalışmada 120 MRSA izolatında glikopeptid direncini 4 µg/ml vankomisin içeren BKİA’da araştırmışlar ve izole edilen MRSA suşları arasında glikopeptid direnci saptamamışlardır (96). Batıkutlu, Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesinde 2004-2005 yılları arasında 68 *S. aureus* suşunda E Test yöntemiyle vankomisin MIC değerlerini araştırmışlar ve vankomisine dirençli suşa rastlamamışlardır (61). Güneş, 2007- 2008 tarihleri arasında Süleyman Demirel

Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen çeşitli örneklerden izole edilmiş 60'ar adet MRSA, MSSA, MRKNS ve MSKNS suşunda glikopeptilere karşı direnç araştırmıştır. Çalışmalarında incelenen tüm suşlar değerlendirildiğinde, vankomisin için 145'inin MİK değerleri duyarlı aralıkta iken, 95'inin MİK değerinin orta derecede duyarlı aralıkta olduğunu tespit etmişlerdir. Ancak sonuç olarak suşların hiçbirinde vankomisin için dirençli düzeyde MİK değeri tespit etmediklerini bildirmişlerdir (97). Sancak ve arkadaşlarının Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde 2005'de yaptıkları çalışmada, klinik örneklerden izole edilen 256 MRSA izolatı değerlendirilmiş; makro E-test ve 4 mg/L vankomisin içeren BKİA tarama yöntemleriyle izolatların 46(%17.9)'sı hVISA olarak tespit edilmiş ve bu suşlar popülasyon analizi ile doğrulanmıştır (89). Kuşçu ve arkadaşları 2007-2009 yılları arasında Ankara'da yaptıkları çalışmada, metisiline dirençli 148 stafilokok izolatının 5(%3.4)'ini VIS, 2(%1.4)'sini ise hVIS olarak tanımlamışlardır. *S.aureus* suşları dikkate alındığında ise, VISA (1/107) ve hVISA (1/107) prevalansı benzer olarak %0.9 oranında bulunduğu bildirilmiştir (47).

Değişik çalışmalarda saptanan prevalans oranları arasındaki farklılıkların başlıca nedeni, kullanılan yöntemlerin farklı olmasıdır. Bugün için kabul edilen altın standart PAP yöntemidir, ancak oldukça zahmetli ve zaman alıcıdır. Bundan dolayı birçok çalışmada değişik oranlarda vankomisin içeren agar tarama testi kullanılmıştır. Fakat tarama plaklarının kullanılması sonucunda elde edilen yalancı negatiflik ve pozitiflik oldukça önemlidir. Bunu engellemek amacıyla tarama plağında üreme görülen izolatlar mutlaka doğrulanmalıdır. Bizim çalışmamızda da, kullanmış olduğumuz 6 µg/ml vankomisin içeren tarama plaklarında iki suşta 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 suşların doğrulanmasında E test ve PAP yöntemlerinin mutlaka yapılması gerektiği kanısına varılmıştır.

Stafilokokların laboratuvarlarda konvansiyonel yöntemlerle doğru tiplendirilmeleri, özellikle de KNS ve *S. aureus* ayrımının doğru yapılması sonraki tanı aşamalarında çok önemlidir. Nitekim metisilin direnci saptanmasında bu iki bakteri arasında büyük farklılıklar vardır. Doğru tanılamada lam koagülaz testinin yanısıra tüp koagülaz testi de mutlaka yapılmalıdır. KNS'ların yanlışlıkla *S. aureus* gibi değerlendirilmesi bundan sonraki aşamalarda zincirleme birçok hataya neden olabileceği gözönünde bulundurulmalıdır.

## **6. SONUÇ VE ÖNERİ**

Çoklu antibiyotik direnci gösteren MRSA'ların etken olduğu enfeksiyonlarda tek tedavi seçeneği olarak çoğu kez glikopeptid antibiyotikler kullanılmaktadır. Bu antibiyotiklerin yoğun bir biçimde kullanılması, stafilokoklarda glikopeptidlere karşı hassasiyet azalmasına ve direnç gelişmesine sebep olmuştur. Dirence neden olan mekanizmalardan bazılarının rutin laboratuvar yöntemleri ile saptanamaması, direncin anlaşılabilmesi konusunda birçok çalışma yapılmasına neden olmuştur. Stafilokoklarda 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.

Ülkemizde metisilin ve vankomisin direncinin saptanmasında CLSI önerileri kullanılmaktadır. Ancak ülkemizin tedavi protokolleri, hasta popülasyonu ve ekonomisi bu sistemlerin hazırlandığı ülkelerden çok farklıdır. Bu nedenlerden dolayı, kendi standartlarımızın oluşturulması ve bunlara göre değerlendirme yapılmasının daha uygun olacağı düşünülmüştür.

MRSA enfeksiyonu düşünülen hastalarda tedavide glikopeptid kullanımının ileride hVISA ve VISA gelişimine sebep olabileceği akılda tutulmalı ve tedaviye yanıt vermeyen hastalarda vankomisin direnci için tarama mutlaka yapılmalıdır. Direnci saptadıktan sonra izolasyon ve korunma da çok önemlidir. Ayrıca enfeksiyon kontrol önlemlerinin etkinliği de, bu bakterilerin hastane içi yayılımını önlemede bir diğer önemli faktördür. Direnci saptamadaki amaç, hastayı uygun şekilde tedavi etmek olmasının yanı sıra yayılımını da önlemek olmalıdır. Bilindiği gibi bu direnç kişilerin elleri, burun taşıyıcılığı, aletler gibi çeşitli faktörlerle hastalar arasında yayılabilir. Bu konuda CDC'nin önerilerini dikkate almak gerekmektedir.

Dünya çapında giderek artan sıklıkta bildirilmeye başlanan h-VISA, VISA ve VRSA suşları ülkemizde de yakın bir gelecekte görülecek direnç gelişiminin ilk uyarılarını vermektedir. Sonuç olarak bu seçkin antibiyotiğin kullanımında özenli olunması ve gerek tedavi öncesi, gerekse tedavi sırasında hastaların mikrobiyolojik yönden yakın izlemi önemli ve gereklidir.

## 7. KAYNAKLAR

- 1- Culos KA, Cannon JP, Grim SA. Alternative agents to vancomycin for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. Am J Ther. 2013;20(2):200-212.
- 2- Ippolito G, Leone S, Lauria FN, Nicastrì E, Wenzel RP. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the superbug. Int J Infect Dis. 2010;14(14):7-11.
- 3- Stryjewski ME, Corey GR. New treatments for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Curr Opin Crit Care. 2009;15(5):403-12.
- 4- Soriano A, Marco F, Martínez JA, Pisos E, Almela M, Dimova VP, et al. Influence of vancomycin minimum inhibitory concentration on the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. Clin Infect Dis 2008;46(2):193-200.
- 5- Waldvogel FA. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock). Ed: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, Mandell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases. pp. 2069-2092, Churchill Livingstone, New York, 2000.
- 6- Cengiz T. Staphylococcus. Ed: Ustaçelebi Ş, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. pp. 339-347, Güneş Kitabevi, Ankara, 1999.
- 7- Bilgehan H. Gram olumlu koklar. Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. pp. 239-268, Fakülteler Kitabevi, İzmir, 2000.
- 8- Peacock SJ. Staphylococcus. Ed: Borriello SP, Murray PR, Funke G, Topley & Wilson's Microbiology & Microbial Infections. pp. 771-816, Edward Arnold Ltd, Washington, DC, 2005.
- 9- Winn W Jr, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, et al. Staphylococci and related Gram positive cocci. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. pp. 623-671, Philadelphia, 2006.
- 10- Kloos WE, Schleifer KH. Isolation and characterization of staphylococci from human skin. II: description of four new species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis* and *Staphylococcus simulans*. Int J Syst Bacteriol. 1975;1:82-87.
- 11- Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med. 1998;339(5):520-531.
- 12- Cengiz AT. Staphylococcus Ed: Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. pp. 339-348, Güneş Kitabevi, Ankara, 1999.
- 13- Sultan N. Stafilokoklar ve Benzeri Gram Pozitif Koklar, Ed: Başustaoglu A, Yıldırım ŞA, Tanyüksel M, Yapar M. Tıbbi Mikrobiyoloji. pp. 209-223, Atlas Kitapçılık, Ankara, 2010.

- 14- Tünger A. *Staphylococcus aureus*: mikrobiyoloji, patogenez ve epidemiyoloji, Ed: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S, Gram-Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. pp. 9-68, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 2004.
- 15- Peacock S. *Staphylococcus aureus*. Ed: Gillespie SH, Hawkey PM, Principles and Practice of Clinical Bacteriology. pp. 73-98, John Wiley and Sons Ltd, England, 2006.
- 16- Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev. 2000;13(1):16-34.
- 17- Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Staphylococcus and related organisms. pp. 202-216, Mosby Inc, St. Louis, 2002.
- 18- Dündar V, Dündar DE. Stafilokoklar. Ed: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. pp. 1507-1516, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 2002.
- 19- Bilgehan H. Gram olumlu koklar. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. pp. 495-506, Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, İzmir, 2004.
- 20- Harrison LS. Staphylococci. Ed: Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G, Test Book of Diagnostic Microbiology. pp. 367-381, Elsevier Inc, St. Louis Missouri, 2007.
- 21- Çetinkaya Y. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* infeksiyonlarının epidemiyolojisi ve kontrolü. Hastane İnfeksiyonları Derg. 2000;4:205.
- 22- Kırca F. *Staphylococcus aureus* suşlarında metisilin direnci tanısında kullanılan bazı fenotipik yöntemlerin karşılaştırılması. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara 2008.
- 23- Gümral R. Staphylococcus, micrococcus ve diğer katalaz pozitif koklar. Ed: Başustaoğlu A, Kubar A, Yıldırım ŞT, Tanyüksel M, Klinik Mikrobiyoloji. pp. 390-411, Atlas Kitapçılık, Ankara, 2009.
- 24- [www.rshm.gov.tr/enfeksiyon/dosya/lab.doc](http://www.rshm.gov.tr/enfeksiyon/dosya/lab.doc).
- 25- Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. J Clin Invest. 2003;111:1265-1273.
- 26- Stapleton PD, Taylor PW. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Sci Prog. 2002;85:57-72.
- 27- Berger-Bachi B, Rohrer S. Factor influencing methicillin resistance in staphylococci. Arch Microbiol. 2002;178:165-171.
- 28- Hardy KJ, Hawkey PM, Gao F, Oppenheim BA. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the critically ill. Br J Anaesth. 2004;92:121-30.
- 29- Akcam FS, Tinaz BG, Kaya O, Tigli A, Ture E, Hosoglu S. Evaluation of methicillin resistance by cefoxitin disk diffusion and PBP2a latex agglutination test in mecA-positive

- Staphylococcus aureus* and comparison of *mecA* with *femA*, *femB*, *femX* positivities. *Microbiol Res.* 2009;164(4):400-403.
- 30- Perez LRR, Antunes ALS, Barth AL, Azvedo PA. Variations of agar screen test for detection of methicillin resistance in staphylococci: focus on ceftiofur. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2007;26:267-270.
- 31- Hackbarth C, Chambers HF. Methicillin-resistant Staphylococci: Genetics and mechanisms of resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989;33:991-994.
- 32- Velasco D, Tomas MM, Cartelle M, Beceiro A, Perez A, Molina F et al. Evaluation of different methods for detecting methicillin (oxacillin) resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55:379-382.
- 33- Banu S. *Staphylococcus aureus* ve antibiyotik direnci *Mikrobiyol Bul.* 2011; 45(3):565-576.
- 34- [www.sccmec.org](http://www.sccmec.org)
- 35- Hawkey PM. The growing burden of antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62(11):1-9.
- 36- Shorr AF. Epidemiology of staphylococcal resistance. *Clin Infect Dis.* 2007;45(3):171-176.
- 37- Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(3):222-235.
- 38- Rehm SJ, Tice A. *Staphylococcus aureus*: methicillin-susceptible *S.aureus* to methicillin-resistant *S.aureus* and vancomycin-resistant *S.aureus*. *Clin Infect Dis.* 2010;51(2):176-82.
- 39- Gültekin M, Günseren F. Vankomisin dirençli enterokoklar. *Hastane İnfeksiyonları Derg.* 2000;4:195-204.
- 40- Arman D. Vankomisin ve diğer glikopeptid antibiyotikler. Ed: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. pp. 252-257, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, 2002.
- 41- Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogenously resistant to vancomycin. *Lancet.* 1997;350:1670-1673.
- 42- Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin United States 1997. *MMWR.* 1997;46:765-766.
- 43- Gould IM. Clinical activity of anti-Gram-positive agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(14):17-21.

- 44- McAleese F, Wu SW, Sieradzki K, Dunman P, Murphy E, Projan S, et al. Over expression of genes of the cell walls timulonin clinical isolates of *Staphylococcus aureus* exhibiting vancomycin-intermediate-*S.aureus*-type resistance to vancomycin. J Bacteriol. 2006;188(3):1120-1133.
- 45- 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):516-521.
- 46- Cui L, Iwamoto A, Lian JQ, Neoh HM, Maruyama T, Horikawa Y, et al. Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(2):428-438.
- 47- Kuşçu F, Öztürk D, Gürbüz Y, Tütüncü E, Şencan İ, et al. Metisiline dirençli stafilkoklarda azalmış vankomisin duyarlılığının araştırılması. Mikrobiyol Bul. 2011;45(2):248-257.
- 48- Moreillon P, Que Y, Glauser MP. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock), Ed: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, Principles and Practice of Infectious Disease. pp. 2321-2351, Churchill Livingstone, Philadelphia, 2005.
- 49- Tenover FC, Biddle JW, Lancaster MV. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. Emerg Infect Dis. 2001;7(2):327-332.
- 50- 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.
- 51- Azarkan A. Yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda metisilin rezistan *Staphylococcus aureus*'un hızlı test (moleküler yöntem) ile araştırılması. Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Diyarbakır 2011.
- 52- Sancak B. *Staphylococcus aureus*'ta metisilin ve vankomisin direnci. Hacettepe Tıp Dergisi. 2007;38:127-134.
- 53- 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):1000-1018.
- 54- Walsh TR, Bolmström A, Qwärnström 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):2439-2444.

- 55- vanHal SJ, Paterson DL. Systematic review and meta-analysis of the significance of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(1):405-410.
- 56- Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, et al. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis.* 2001;32(2):114-121.
- 57- Tiemersma EW, Bronzwaer SLAM, Lyytikäinen O, Degener JE, Schrijnemakers P, Bruinsma N et al. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in Europa 1999-2002. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(9):1627-1634.
- 58- Derbentli Ş. Cerrahi infeksiyonlarda dirençli gram pozitif bakteri sorunu. *ANKEM Derg.* 2004;18(Ek 2):215-221.
- 59- Derbentli Ş. Stafilokoklarda antibiyotik direnci, 2003-2004 Türkiye haritası. *ANKEM Derg.* 2005;19(Ek 2):54-60.
- 60- Özgüneş N, Ergen P, Ceylen N, Yazıcı S, Aksoy Y et al. Yatan hastalardan ve poliklinik hastalarından izole edilen stafilokok suşlarında metisilin direnci ve dirençli suşlarda glikopeptid duyarlılığı. *ANKEM Derg.* 2002;16(4):423-426.
- 61- Batıkutlu S. Çeşitli klinik materyallerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında metisilin direnci ve E test ile vankomisin MIC değerlerinin araştırılması. Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, İstanbul 2006.
- 62- Kurutepe S, Sürücüoğlu S, Gazi H, Teker A, Özbakkaloğlu B. Metisiline dirençli ve duyarlı *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotiklere direnç oranları. *İnfeksiyon Derg.* 2007;21(4):187-191.
- 63- Ekşi F, Balcı İ, Gayyurhan E, Çekem G. Klinik örneklerden soyutlanan *Staphylococcus aureus* suşlarının metisilin direncinin belirlenmesi ve antimikrobiyal ilaçlara duyarlılıklarının değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Derg.* 2007;21(1):27-31.
- 64- Özel G, Aslan V, Erdem G, Çağatay M, Şencan İ et al. Stafilokoklarda metisilin duyarlılığının belirlenmesinde oksasilin, seftoksitin, seftizoksim ve moksalaktam disk difüzyon yöntemlerinin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul.* 2011;45(2):258-265.
- 65- Aytar A, Öksüz Ş, Öztürk E, Avcıoğlu F. Kan kültürlerinden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında antibiyotiklere direnç. *ANKEM Derg.* 2013;27(2):60-63.

- 66- Hasbek M, Hakgüdeney Y, Kaya S, Bakıcı ZM. Stafilokoklarda metisilin direncinin farklı yöntemlerle belirlenmesi ve çoğul antibiyotik direnci. C Ü Tıp Fakültesi Dergisi. 2002;24(4):179-184.
- 67- Boutiba I, Abbes RB, Abdallah HB, Mamlouk K, Mahjoubi F, Kammoun A, et al. Evaluation of a cefoksitin disk diffusion test for the routine detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect. 2004;10:749-772.
- 68- Felten A, Grandry B, Lagrange PL, Casin I. Evaluation of three techniques for the detection of low level methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a disk diffusion method with cefoxitin and moxolactam, the Vitek-2 system and the MRSA-screen latex agglutination test. J Clin Microbiol. 2002;40:2766-2771.
- 69- Mimica MJ, Berezin EN, Carvalho RL, Mimica IM, Mimica LM, Sáfadi MA, et al. Detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from pediatric patients: is the cefoxitin disk diffusion test accurate enough? Braz J Infect Dis. 2007;11(4):415-417.
- 70- Salimnia H, Brown WJ. Comparison of Phoenix oxacillin and cefoxitin MIC's Microscan oxacillin MIC, oxacillin and cefoxitin disk diffusion, and mecA gen detection. ICAAC 2005 konferansı poster sunusu.
- 71- Telli M, Sümerkan B, Eşel D. *Staphylococcus aureus*'ta metisilin direncinin belirlenmesinde sefoksitin disk, oksasilin disk, oksasilin agar tarama ve PBP2A lateks testlerinin karşılaştırılması. İnfeksiyon Derg. 2006;20(2):93-96.
- 72- Brown Derek FJ. Guide lines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). J Antimicrob Chemother. 2005;56:1000-1018.
- 73- Pottumarthy S, Fritsche T.R, Jones R.N. Evaluation of alternative disk diffusion methods for detecting mecA-mediated oxacillin resistance in an international collection of staphylococci: Validation report from the Sentry Antimicrobial Surveillance Program. Diag Microbiol Infect Dis. 2005;51:57-62.
- 74- Wijaya L, Hsu L-Y, Kurup A. Community-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Overview and local situation. Ann Acad Med. 2006;35:479-485.
- 75- Brown DFJ. Detection of Methicillin/oksacillin resistance in staphylococci. J Antimicrob Chemother. 2001;48:65-70.
- 76- Bannerman TL. Staphylococcus, Micrococcus and other catalase positive cocci that grow aerobically. Ed: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Manual of Clinical Microbiology. pp. 384-404, ASM Press, Washington, D.C, 2003.




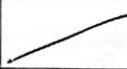
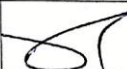

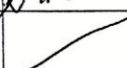


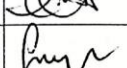
- 77- Boyce JM. Coagulase-negative staphylococci. Ed: Mayhall CG, Hospital Epidemiology and Infection Control. pp. 495-516, Lippincott Williams and Wilkins, New York, 2004.
- 78- Hartstein AI, Sebastian TJ, Strausbaugh LJ. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Ed: Mayhall CG, Hospital Epidemiology and Infection Control. pp.471- 494, Lippincott Williams and Wilkins, New York, 2004.
- 79- Öksüz Ş, Yavuz T, Şahin İ, Yıldırım M, Akgünoğlu M, et al. Kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg. 2008;38(3-4):117-121.
- 80- Hoşbul T. Makrolidlere Heterojen dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının direnç mekanizmalarının ve klonalitelerinin araştırılması. Gülhane Askeri Tıp Akademisi Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, İstanbul 2010.
- 81- Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, Cruz C, Lancaster MV, Robinson-Dunn B, et al. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. N Engl J Med. 1999;340(7):493-501.
- 82- Ploy MC, Grelaud C, Martin C, deLumley L, Denis F. First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. Lancet.1998;351(9110):1212.
- 83- Hanaki H, Hososaka Y, Yanagisawa C, Otsuka Y, Nagasawa Z, Nakae T et al. Occurrence of vancomycin-intermediate-resistant *Staphylococcus aureus* in Japan. J Infect Chemother. 2007;13(2):118-121.
- 84- De Lassence A, Hidri N, Timsit JF, Joly-Guillou ML, Thiery G, Boyer A, et al. Control and outcome of a large out break of colonization and infection with glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. Clin Infect Dis. 2006;42(2):170-178.
- 85- Lentino JR, Narita M, Yu VL. New antimicrobial agents as therapy for resistant Gram-positive cocci. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2008;27(1):3-15.
- 86- Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J Antimicrob Chemother. 1997;40(1):135-136.
- 87- Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection and clinical implications. Clin Microbiol Rev. 2010;23(1):99-139.

- 88- Bell JM, Walters JD, Turnidge J D, Jones RN. hVISA's are common among vancomycin susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Report from SENTRY Asia-Pacific Region. Program and Abstracts of the 46th Annual Meeting of the Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, C2-1160. SanFrancisco, 2006.
- 89- 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):519-523.
- 90- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 20th Informational Supplement, Document M100-S20,2010. CLSI Wayne, PA.
- 91- Walsh TR, Bolmström A, Qwörnström 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):2439-2444.
- 92- Moise PA, North D, Steenberg JN, Sakoulas G. Susceptibility relationship between vancomycin and daptomycin in *Staphylococcus aureus*: facts and assumptions. Lancet Infect Dis. 2009;9(10):617-624.
- 93- Hawser SP, Bouchillon SK, Hoban DJ, Dowzicky M, Babinchak T. Rising incidence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin and susceptibility to antibiotics: a global analysis 2004-2009. Int J Antimicrob Agents. 2011;37(3):219-224.
- 94- Nakipoğlu Y, Katrancı H, Çağatay A, et al. İstanbul Tıp Fakültesi'nde çeşitli örneklerden izole edilen stafilokok suşlarında glikopeptid direncinin araştırılması. ANKEM Derg 2004;18(4):209-212.
- 95- Çelikkilek N, Özdem B, Gürel F, et al. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* izolatlarının vankomisin, teikoplanin, linezolid ve daptomisine invitro duyarlılıkları. Mikrobiyol Bul 2011;45(3):512-518.
- 96- Dizbay M, Sipahi A, Günel Ö, et al. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* izolatlarında glikopeptid ve linezolid direncinin araştırılması. ANKEM Derg 2007;21(1):23-26.
- 97- Güneş H. Metisiline dirençli stafilokoklarda glikopeptid antibiyotiklere duyarlılık durumunun araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Isparta 2008.



## 8. EKLER

**DÜZCE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ İNVAZİV OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK  
KOMİTESİ, ARAŞTIRMA BAŞVURU ONAYI**  
DÜZCE UNIVERSITY, SCHOOL OF MEDICINE, ETHICS COMMITTEE OF NONINVASIVE CLINICAL RESEARCHES  
APPROVAL FOR APPLICATION

<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>  (APPLICATION INFORMATION)	<b>ARAŞTIRMANIN ADI</b>	Metisiline Dirençli Stafilokoklarda Azalmış Vankomisin Duyarlılığının Araştırılması		
	<i>TITLE OF THE PROJECT</i>	Investigation of Reduced Vancomycin Susceptibility in Methicillin-Resistant Staphylococci		
	<b>SORUMLU ARAŞTIRICI (AUTHORIZED RESEARCHER)</b>	<b>Prof. Dr Elif Öztürk</b>		
	<b>DİĞER ARAŞTIRMACILAR (OTHER RESEARCHERS)</b>	<b>Dr. Fatma Avcıoğlu</b>		
	<b>ARAŞTIRMA MERKEZİ (RESEARCH CENTER)</b>	Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Hastanesi (DÜZCE UNIVERSITY, SCHOOL OF MEDICINE)		
<b>ÇALIŞMA ESASI İYİ KLİNİK UYGULAMALAR KILAVUZU (Good Clinical Practice)</b>				
<b>KARAR BİLGİLERİ</b> (INFORMATION OF DECISION)	Karar No (Decision Nr) : 2012/257		Tarih (Date:dd.mm.yyyy) : 29/03/2012	
	<b>Prof. Dr Elif Öztürk</b> sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgelerin araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda, <b>adı geçen araştırmanın gerçekleştirilmesinde etik yönden sakınca olmadığına</b> mevcudun oy birliği/oy çokluğu ile karar verilmiştir. (This project was decided to be approved for clinical ethics.)			
<b>Ünvanı/Adı/Soyadı (Members)</b>	<b>Uzmanlık Alanı (Profession)</b>	<b>Kurumu (Institution)</b>	<b>Şerh Açıklaması (Varsa) (Declaratory Clause [if any])</b>	<b>İmza (Signature)</b>
Prof. Dr. Hakan ÖZHAN (Başkan)	Kardiyoloji (Cardiology)	Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi	—	
Yrd. Doç. Dr. Ertuğrul KAYA (Bşk. Yard.)	Tıbbi Farmakoloji (Pharmacology)	Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi	—	
Yrd. Doç. Dr. Hilmi DEMİRİN (Raportör)	Tıbbi Biyokimya (Medical Biochemistry)	Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi	—	
Prof. Dr. Ali TEKİN (Üye)	Üroloji (Urology)	Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi	—	
Doç. Dr. Yavuz DEMİRARAN (Üye)	Anestezi (Anesthesia)	Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi	—	
Prof. Dr. Handan ANKARALI (Üye)	Biyoistatistik (Biostatistics)	Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi	—	
Yrd. Doç. Dr. İsmet ÖZAYDIN (Üye)	Genel Cerrahi (General Surgery)	Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi	—	
Doç. Dr. Seyit ANKARALI (Üye)	Fizyoloji (Physiology)	Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi	—	
Eczacı Elif EFE (Üye)	Eczacı (Pharmacist)	Düzce Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi	—	
Avukat Suat UYAR (Üye)	Hukuk (Attorney)	Düzce Üniversitesi	—	
Metin TOZ (Üye)	Sivil Üye (Civil member)	---	—	