Türk Mikrobiyol Cem Derg 47(1):39-46, 2017
doi:10.5222/TMCD.2017.039

Araştırma

Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* Suşlarında Vankomisine Karşı Azalmış Duyarlılığın Araştırılması

Emine KORKUT TUNÇ, Çiğdem KUZUCU, Barış OTLU
İnönü Üniversitesi, Turgut Özal Tıp Merkezi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Bölümü, Malatya

ÖZ

Amaç: *Staphylococcus aureus, tüm dünyada toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlara yol açan en önemli etkenlerden biridir. Metisiline dirençli Staphylococcus aureus (MRSA)'da bakteriler vankomisine karşı çok yüksek minimal inhibitör konsantrasyon değerlerine sahip olduğundan, rutin duyarlılık testlerinde tespit edilebilmektedir. "Vankomisin-intermediate" S. aureus (VISA)/heterojen VISA (hVISA) suşlarının ise laboratuvarlarda uygulanan rutin duyarlılık testleriyle saptanması güçtür. Çalışmamızda, Ocak 2008-Ağustos 2013 tarihleri arasında hastanemiz mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilmiş çeşitli örneklerden izole edilip -80°C'de stoklanmış 52 adet MRSA suşu kullanılarak VISA ve hVISA izolatlarının sıklığının araştırılması amaçlanmıştır.*

Gereç ve Yöntem: *Bu örnekler öncelikle multipleks polimerize zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile mecA, nuc ve 16S genleri açısından moleküler olarak test edildi. Bu suşlara vankomisin mikrodilüsyon, gradient test, vankomisin agar tarama (BHI-V6) uygulandı. Agar taramada üreyen dokuz suşa makrogradient test ve PAP-AUC yöntemi uygulandı.*

Bulgular: *Elli iki suşta PZR ile mecA gen bölgesi gösterildi. Gradient-test ve buyyon mikrodilüsyon yöntemi ile tüm suşların vankomisine duyarlı (MİK değeri ≤2 µg/ml) olarak tespit edildi. Altı µg/ml vankomisin içeren beyin kalp infuzyon agar (BHI-V6) tarama testi sonucunda ilk 24 saatte sekiz örnekte, 48. saatte bir örnekte üreme gözlendi. Makrogradient testte dokuz suştan beş tanesinin MİK değeri ≥8 µg/ml olarak, dört suşun MİK değeri ≤8 µg/ml olarak tespit edildi. Popülasyon analiz profili sonucuna göre dokuz suş (%17.30) hVISA olarak değerlendirildi.*

Sonuç: *Bu sonuçlara göre, vankomisine karşı azalmış duyarlılığa sahip MRSA suşları hastanemizde de mevcuttur. Bu suşların tespiti rutin laboratuvar testleri ile olası olamamaktadır. Bununla birlikte, günümüzde MRSA tedavisinde ilk tercihin glikopeptid gurubu antibiyotikler olması nedeniyle bu suşların tespiti tedavi başarısızlığının önüne geçmek için yapılmalıdır.*

Anahtar kelimeler: *MRSA, vankomisin, VISA/hVISA*

ABSTRACT

Investigation of Reduced Vancomycin Susceptibility in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Strains

Objective: *Staphylococcus aureus is one of the most important factors that leads to community-acquired and nosocomial infections in the whole world. Vancomycin-resistant S. aureus (VRSA) bacteria can be detected in routine sensitivity tests because they have very high minimal inhibitory concentration values aganist vancomycin. Vancomycin-intermediate S. aureus (VISA)/heterogenous VISA (hVISA) bacterial strains can not be detected using routine sensitivity tests applied in laboratories. In our study we aimed to search the frecuency of VISA and hVISA strains isolated from various samples sent to our hospital microbiology laboratory between January 2008-August 2013. Fifty-two MRSA bacteriel strains.samples isolated and stocked in microbiology laboratory of our hospital at -80°C were used to investigate the freguency of VISA and hVISA isolates.*

Materials and Methods: *These samples were first subjected to molecular tests by multipleks polymerase chain reaction (PCR) method for detecting mecA, nuc and 16S genes. Vancomycin microdilution, gradient test, vancomycin screen agar (BHIA-V6) were applied on these samples. Macrogradient test and PAP-AUC method were runned on nine bacterial strains which were reproduced in screen agar.*

Results: *mecA gene zone was displayed in 52 bacterial strains by PCR. All bacterial strains are found to be sensitive to vancomycin (MIK≤2 µg/ml) by using gradient test and broth microdilution method. Bacterial growth was observed within the first 24 (n=8), and 48 hours (n=1) in indicated number of samples in brain heart infusion (BHIV6) agar screen test which contained 6 µg/ml vancomycin. In macrogradient test MIK values were found to be ≥8 µg/ml in 5 strains, and ≤8 µg/ml in four bacterial strains Nine bacterial strains (17.3%) were evaluated to be hVISA according to the population analysis profile results.*

Conclusion: *According to these results we found that MRSA strains which have decreased sensitivity aganist vancomycin also present in our hospital. These bacterial strains can not be detected with routine laboratory tests. These bacterial strains should be identified to prevent unsuccesful treatment because nowadays glycopeptide antibiotics are the first choice in the treatment of MRSA.*

Keywords: *MRSA, vancomycin, VISA/hVISA*

Alındığı tarih: 28.03.2016
Kabul tarihi: 30.03.2017
Yazışma adresi: Emine Korkut Tunç, İnönü Üniversitesi, Turgut Özal Tıp Merkezi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Bölümü, Malatya
e-posta: dreminekorkut@hotmail.com

GİRİŞ

Günümüzde MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde en sık kullanılan ilaçlar vankomisin ve teikoplanin olmak üzere glikopeptid grubu antibiyotiklerdir[1]. Ancak ilk olarak 1996 yılında "vancomycin-intermediate" *S. aureus* (VISA) suşları tanımlanmasından kısa bir süre sonra 1997 yılında Hiramatsu ve ark.[2], heterojen-VISA (hVISA) olarak adlandırılan yeni bir vankomisin direnç tipi tanımlamışlardır. "Mu3" olarak adlandırılan ilk hVISA izolatından sonra birçok ülkeden değişen oranlarda olmak üzere hVISA suşları bildirilmiştir. Stafilokoklarda gözlenen bu direnç gelişimini 2002 yılında Michigan'da bir diyaliz hastasında vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA) izolatı tanımlanması takip etmiştir[2-4]. VRSA da bakteriler vankomisine karşı çok yüksek MİK değerlerine sahip olduğundan, rutin duyarlılık testlerinde tespit edilebilmektedir. VISA/hVISA suşlarının ise laboratuvarlarda uygulanan rutin duyarlılık testleriyle saptanması güçtür. Vankomisin içeren beyin kalp infüzyon agar (BHIA), gradient test, makroyöntem gradient test ve PAP AUC (population analysis profile area under the curve, popülasyon analiz profili eğri altında kalan alan) gibi çeşitli tarama yöntemleri VISA/hVISA suşlarının saptanması amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. VISA/hVISA suşlarının tanımlanmasında popülasyon analiz profili (PAP AUC) altın standart yöntemdir [5-9].

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamızda Ocak 2008-Ağustos 2013 tarihleri arasında, İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilmiş çeşitli örneklerden izole edilip -80°C'de stoklanmış 52 adet MRSA suşu kullanıldı. Bu örnekler öncelikle *mecA, nuc* ve 16S genleri açısından moleküler olarak test edildi. *mecA, nuc* ve 16S genlerinin her üçü için pozitif olan suşlar metisilin dirençli *S. aureus* kabul edilerek bu suşlara vankomisin agar tarama, vankomisin mikrodilüsyon ve gradient testleri uygulandı. Vankomisin agar tarama da üreyen *S. aureus* suşlarına VISA ve h-VISA yönünden makro gradient test ve popülasyon analiz profili yapıldı.

Moleküler Yöntem

QIAsymphony (Almanya) cihazında otomatik DNA ekstraksiyonu yapıldı. Mutipleks polimerize zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile (mecA-1, mecA-2, nuc1, nuc2, LAB16SF ve LAB16SR primerleri kullanılarak) metisilin direnci, koagülaz genleri ve 16S bakteriyel DNA varlığı gösterildi.

Buyyon Mikrodilüsyon

Mikroplağın birden 12'ye kadar olan yatay kuyucuklarına 50'şer µl Mueller Hinton buyyon eklendi, 512 µg/ml konsantrasyonda vankomisinden (Liofilchem, Italya) 50 µl alınarak ilk 11 kuyucukta seri dilüsyon yapıldı. On ikinci kuyucuk pozitif kontrol olarak kullanıldı ve antibiyotik eklenmedi. On ml Mueller Hinton broth besiyerine 50 µl 0.5 McFarland bakteri süspansiyonu eklendi. Kısa bir süre vortekslediken sonra bu süspansiyondan 50'şer µl alınıp 12 kuyucuğa da ilave edildi. Mikroplağın üzeri steril bir plakla kapatıldıktan sonra 35°C'de 24 saat inkübe edildi. Her bir suşa ait üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) olarak değerlendirildi. Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) kriterlerine[9] göre vankomisin MİK değeri okundu. *S. aureus* için ≤2 µg/ml olanlar duyarlı, 4-8 µg/ml olanlar orta derecede duyarlı, ≥16 µg/ml olanlar da dirençli kabul edildi[9]. Kontrol suşu olarak *S. aureus* ATCC 29213 kullanıldı.

Gradient test

Kanlı agarda bir gece bekletilmiş kültürden üre-

yen taze kolonilerden alınarak 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlanmış bakteri süspansiyonu hazırlandı. Mueller Hinton agar yüzeyine yayıldı. Vankomisin gradient test stripleri (Liofilchem, İtalya) yerleştirildikten sonra 35°C'de 24 saat inkübe edildi. MİK değerleri belirlendi ve CLSI'nın önerdiği MİK değerleriyle karşılaştırıldı[10-12].

Vankomisin Agar Tarama

Bu yöntem, ABD Hastalıkların Kontrol Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) önerileri doğrultusunda 6 µg/ml vankomisin içeren beyin kalp infüzyon (BHI-V6 Oxoid) besiyerinde yapıldı. Bunun için 6 µg/ml vankomisin içeren beyin-kalp infüzyon (BHI) agar hazırlandı. Kanlı agarda bir gece bekletilmiş kültürden üreyen taze kolonilerden alınarak 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlanmış bakteri süspansiyonu hazırlandı. Süspansiyondan 10 µl alınıp 6 µg/ml vankomisin içeren beyin-kalp infüzyon agara ekildi, 35°C'de 24 ve 48 saat inkübe edildi. Eğer 24 saat sonra gözle görünür üreme varsa izolatlar potansiyel VISA olarak değerlendirildi. Eğer 48 saat içinde sayılabilir (1-30 koloni oluşturan ünite, CFU) üreme görülürse izolat olası hVISA olarak değerlendirildi. Kırk sekiz saat sonunda üreme görülmezse izolat vankomisine duyarlı olarak değerlendirildi. Kalite kontrol suşları olarak kendi hastanemizde izole edilen ve VanA içerdiği moleküler olarak tespit edilen vankomisine dirençli *Enterococcus* (VRE) ile vankomisine duyarlı köken olan *S. aureus* ATCC 29213 kullanıldı.

Makro Gradient Test Metodu

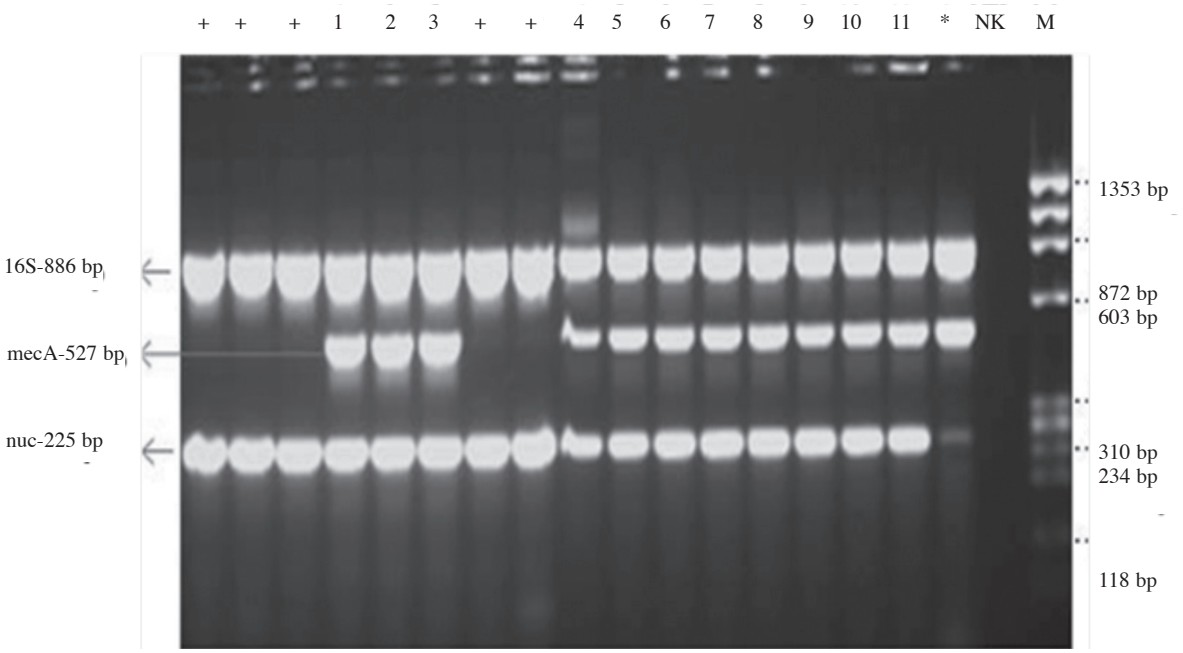
VISA tarama yöntemi olarak makro gradient test yöntemi kullanıldı. İki McFarland bulanıklıkta hazırlanan bakteri süspansiyonundan 200 µl alınarak 90 mm çapında BHI agar plaklarına yayıldı. Yaklaşık 10 dakika biyogüvenlik kabininde besiyeri yüzeyi kuruyuncaya kadar beklendi ve gradient test stripleri yerleştirildi. Plaklar 48 saat 35°C'de inkübe edildi ve MİK değeri 8 µg/ml ve üzeri olan suşlar VISA/hVISA kabul edildi[13].

Popülasyon Analiz Profili

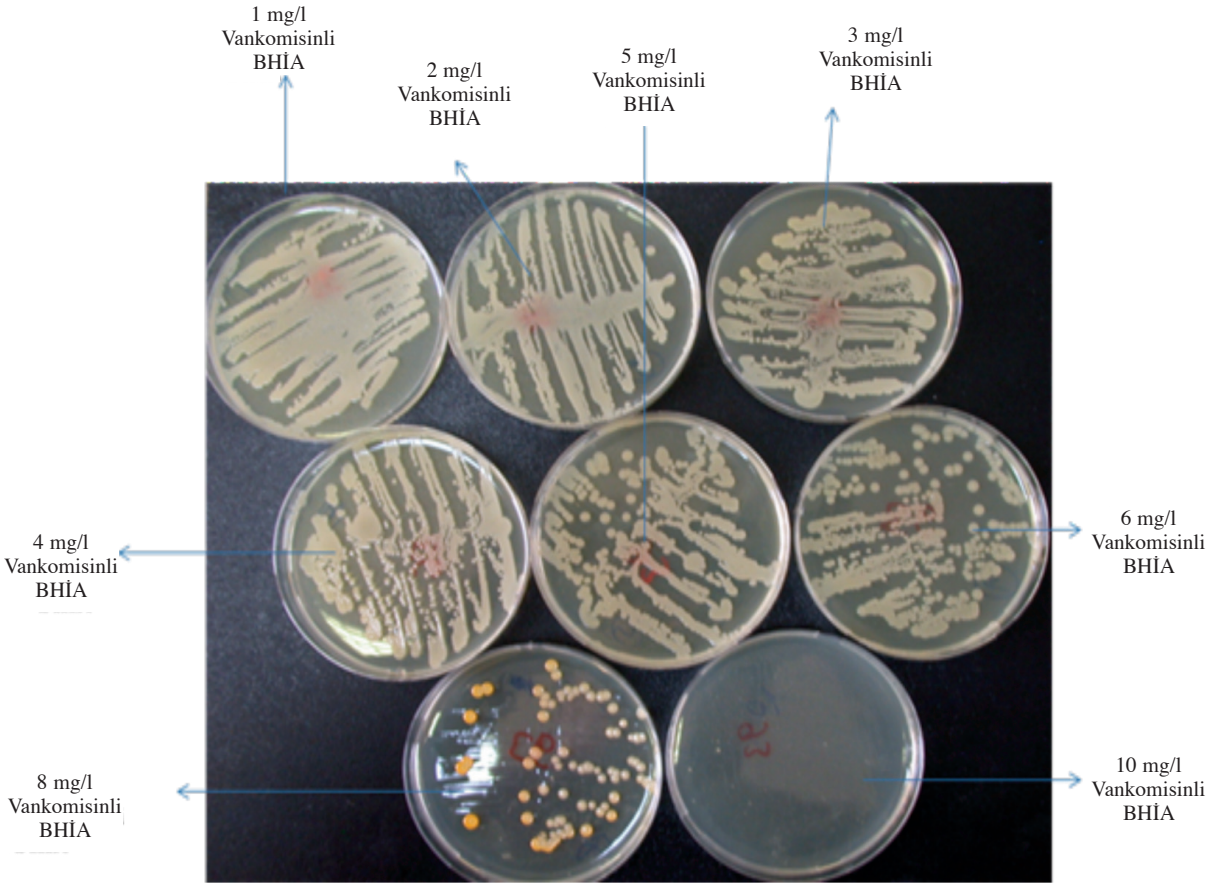
Daha önceden Wootton ve ark.'nın[13] tanımladığı şekilde yapılan bu yöntem, VISA ve h-VISA suşlarının belirlenmesinde altın standart olarak kabul edilmiştir. PAP-AUC yöntemi, BHI-V6 besiyerinde üreyen şüpheli hVISA/VISA izolatlarının duyarlılık düzeylerini doğrulamak amacıyla uygulandı. Şüpheli izolatların 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlanmış süspansiyonlarından ve 10 kat seri dilusyonlarından 50'şer µl, sırasıyla 1, 2, 4, 5, 6, 8 ve 10 µg/ml vankomisin içeren BHI agar besiyeri yüzeylerine yayıldı. Bakteriler, 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 (ABD) programıyla hesaplandı. Elde edilen değer, standart hVISA suşu olan Mu3 icin hesaplanan AUC değerine bölünerek bir oran elde edildi. Bu oran ≤0.90 ise vankomisine duyarlı stafilokok, 0.90-1.3 ise hVISA, ≥1.3 ise VISA olarak kabul edildi[14,15].

BULGULAR

Çalışmaya alınan 52 MRSA suşunun 21'i yara-abse, 15'i kan, dokuzu trakeal aspirat-balgam, üçü dren, ikisi parasentez ve ikisi diğer örnekler şeklindedir. Bu suşların servislere göre dağılımı 13'ü cerrahi servis-yoğun bakım, sekizi organ nakli servis-yoğun bakım, sekizi dâhili servis-yoğun bakım, altısı ortopedi servisi, altısı reanimasyon servisi, üçü yanık ünitesi, ikisi enfeksiyon servisi ve altısı diğer servisler şeklindedir.



Resim 1. 1-11. örneğin PZR görüntüleri.



Resim 2. Kırk sekiz no'lu örneğin 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 mg/l vankomisin içeren beyin-kalp infüzyon agarda 35°C'de 48 saat inkübasyon sonucu üreme görüntüleri.

PZR Sonuçları: Elli iki suşta sırasıyla 886 bp bölgede bir bant, 527 bp'lik bölgede bir bant ve 225 bp'lik bölgede bir bant gözlenmesiyle bu suşlar 16S (+), *mecA* (+), *nuc* (+) ve bu suşlar MRSA olarak değerlendirildi. PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri Resim 1'de gösterilmiştir.

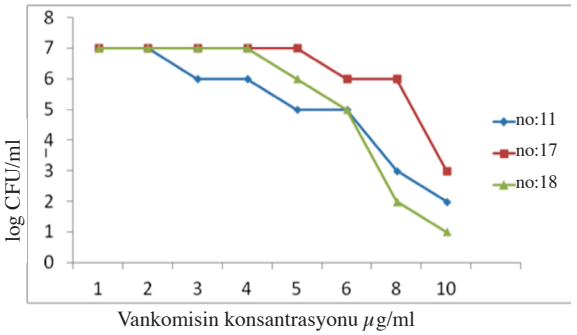
Gradient test ve buyyon mikrodilüsyon yöntemi sonuçları: Gradient test ve buyyon mikrodilüsyon sonuçları benzer şekilde idi. Tüm suşlar her iki yöntem ile vankomisine duyarlı olarak tespit edildi. Vankomisin MİK değerlerinde yıllar içinde bir artış (MIC creep) olmadığı görüldü.

Agar tarama sonuçları: Elli iki tane *mecA* (+) *S. aureus* suşa 6 µg/ml vankomisin içeren beyin kalp infuzyon agar (BHI-V6) tarama testi yapıldı. ilk 24 saatte sekiz örnekte (11., 17., 18., 24., 36., 37., 48., 49.), 48. saatte ilave bir (43. Örnekte) örnekte daha üreyerek toplamda dokuz örnekte 6 µg/ml vankomisinli agar taramada üreme gözlendi.

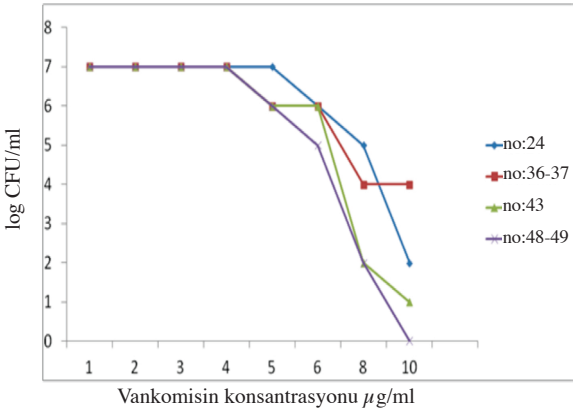
Makro Gradient test sonuçları: 6 µg/ml vankomisin içeren beyin kalp infüzyon tarama agarda üreyen dokuz suşa makro gradient test ve popülasyon analiz profili uygulandı. Makro gradient testte bu dokuz suştan beş tanesinin MİK değeri ≥8 µg/ml olarak değerlendirildi. Dört suşun MİK değeri ≤8 µg/ml olarak değerlendirildi.

PAP-AUC sonuçları: 6 µg/ml vankomisin içeren beyin kalp infüzyon tarama agarda üreyen dokuz suşa uygulanan popülasyon analiz profili sonucuna göre bu bakterilerin eğri altındaki alanlarının Mu3 suşununkine oranı 11. suş için 1.05; 17. suş için 1.29; 18. suş için 1.1; 24. suş için 1.26; 36. suş için 1.2; 37. suş için 1.2; 43. suş için 1.15; 48. suş için 1.1; 49. suş için 1.1 olarak belirlendi. Bu suşların eğri altında kalan alanları 0.90-1.3 aralığında idi ve bu dokuz suş (%17.30) hVISA olarak değerlendirildi.

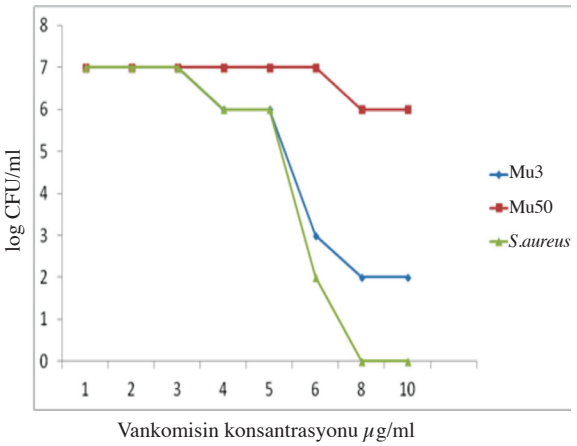
Popülasyon analizi yapılan bakterilerden 48. örneğin 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 mg/ml vankomisin içeren BHİA'daki üreme görüntüsü Resim 2'de gösterilmiştir. Agar taramada üreyen dokuz suşun PAP-AUC alan grafikleri Şekil 1, Şekil 2 ve Şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 1. 11, 17 ve 18 numaralı suşların PAP-AUC grafikleri.



Şekil 2. 24, 36, 37, 43, 48, 49 numaralı suşların PAP-AUC grafiği.



Şekil 3. Mu3 (hVISA), Mu50 (VISA), standart *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) suşlarına ait PAP-AUC grafiği.

TARTIŞMA

Stafilokoklarda vankomisine karşı azalmış duyarlılığın saptanmasında otomatize sistemler, agar dilüsyon, buyyon dilüsyon, popülasyon analizi profili ve makroyöntem gradient test gibi değişik yöntemler kullanılmaktadır[13]. CDC VISA taraması için 6 µg/ml vankomisin içeren BHI agar kullanılmasını önermektedir. Vankomisinli tarama besiyerlerinin duyarlılık ve özgüllükleri yüksek olmamasına rağmen, kolay yapılabilmeleri, hızlı ve ucuz olmaları nedeniyle laboratuvarlarda kullanılmaya devam edilmektedir[13].

hVISA suşları ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır. Hiramatsu ve ark.[14] Japonya'da 203 hastaneden, 1149 klinik MRSA izolatında VRSA prevalansına yönelik çalışmalarında populasyon analiziyle, 7 üniversite hastanesinde hVISA prevalansını %9.3, bir üniversite hastanesinde %20, üniversite olmayan hastanelerde ve kliniklerde ise %1.3 olarak bulmuşlardır.

Türkiye'de ilk hVISA suşu Gülay ve ark.[16] tarafından 1998 yılında rapor edilmiştir. Gülay ve ark.[16] Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde klinik örneklerden izole ettikleri 95 MRSA suşunda vankomisin direncini 4-8 µg/ml vankomisin içeren BHIA'da araştırmışlardır. Agar taramada üreyen beş suşa (%5.3) mikrodilüsyon yöntemi ile vankomisin çalışmışlar ve bu suşlarda vankomisine azalmış duyarlılık saptamışlardır (MİK: 8 µg/ml). Mirza ve ark.'nın[11] Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 2001-2011 yılları arasında çocuk hasta grubundan izole edilen 94 MRSA ile yaptıkları çalışmada, çalışmaya dâhil edilen MRSA izolatlarında vankomisin MİK değerlerinde yıllar içinde bir artış olmadığı (MIC creep), hem mikrodilüsyon hem de gradient test yöntemi ile izolatların tamamının vankomisine ve daptomisine duyarlı bulunduğu gösterilmiştir. PAP-AUC yöntemi ile 20 (%21) hVISA izolatı saptanmış, PAP-AUC yöntemi ile makrogradient test yöntem sonuçları karşılaştırıldığında makrogradient test yöntemin duyarlılığı %71.4, özgüllüğü ise %91.4 olarak tespit edilmiştir. hVISA izolatlarının %75'inde vankomisin MİK değeri 2 µg/ml olarak saptanmış, vankomisin MİK değeri 2 µg/ml olan izolatların ise %53.6'sını hVISA olarak tespit etmişlerdir.

Sancak ve ark.[12] 2005 yılında 256 MRSA suşunu 4 µg/ml vankomisin içeren BHIA'da taramışlar ve 145 suşun 48. saatte ürediğini saptamışlardır. Bu suşlara yapılan makrogradient test sonucu 46 (%17.9) suş hVISA olarak tespit edilmiş ve bu 46 suş popülasyon analiz profili ile doğrulanmıştır. Sancak ve ark.'nın[17], yedi farklı üniversite hastanesinden 2007-2010 yılları arasında yaptığı başka bir çalışmada, 175 tane MRSA kan örneğinde PAP-AUC ile hVISA oranını %13.7 (24/175) bulmuşlardır. Vankomisin MİK değeri 71 (%40.6) suşta 2 µg/ml bulunmuş. hVISA oranları MİK değeri ≥1 µg/ml olan izolatlarda daha yüksek oranda saptanmış, makrogradient test yönteminin duyarlılığı %58.3 özgüllüğü %92.1 olarak bulunmuştur. Mikrodilüsyon ve gradient test ile elde edilen MİK değerleri arasındaki yüzde uyumu hem vankomisin hem de daptomisin için yüksek bulunmuştur. MRSA izolatlarının tümünün daptomisine duyarlı olduğu saptanmış ve MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde glikopeptid grubu antibiyotiklere alternatif bir ilaç olabileceği vurgulanmıştır. hVISA tanımlanmasında tercih edilmesi gereken yöntemin PAP-AUC olduğu, ancak uygulanması pratik olmadığından, daha hızlı ve doğru sonuç veren yöntemlerin geliştirilmesine gereksinim olduğu vurgulanmıştır.

Çalışmamızda, 52 tane *mecA* pozitif *S. aureus* suşuna 6 µg/ml vankomisin içeren BHIA taraması yapılmış suşlardan sekiz tanesi 24. saatte, bir tanesi 48. saatte agar tarama besiyerinde üreyerek toplamda dokuz (%17.3) suş agar tarama ile hVISA şüpheli olarak tespit edilmiştir. Hem

mikrodilüsyon hem de gradient test yöntemi ile izolatların tamamı vankomisine duyarlı bulunmuştur. Altı tane suşun vankomisin MİK değeri 1 μg/ml olarak tespit edilmiş ve bu suşların beş tanesi PAP-AUC ile hVISA olarak tespit edilmiştir. Tarama pozitif olan suşlar ile yapılan makrogradient test yöntemi ile beş tane suşun vankomisin MİK değeri ≥8 μg/ml hVISA, dört tane suşun vankomisin MİK değeri ≤8 μg /ml olarak bulunmuş ve bu suşlar vankomisine duyarlı olarak tespit edilmiştir. Agar tarama pozitif olan dokuz suşa yapılan PAP-AUC sonuçlarına göre dokuz suşta (%17.3) hVISA olarak tespit edilmiştir.

Feng ve ark.'nın[18] 2013'te toplam 456 MRSA izolatı ile yaptıkları çalışmada, 105 izolat (%23) 6 μg/ml vankomisin içeren BHIA da üremiş ve bu suşlara yapılan PAP-AUC'de 21 suş (%4.6) hVISA olarak doğrulanmıştır. Riederer ve ark.'nın[19] 2011'de kan kültüründen izole edilen 457 MRSA suşu ile yaptıkları çalışmada, makrogradient test metodu ile yedi izolatı VISA (%1.4), 33 izolatı hVISA olarak tespit etmişlerdir. Makrogradient test metodunun sensitivitesini %75, spesifitesini %89 olarak tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada, hVISA/VISA izolatlarını tespit etmede 3 mg/L ve 4 mg/L vankomisin içeren BHIA tarama besiyerlerinin spesifite ve sensitivitelerini karşılaştırmışlar BHIA-4 için sensitivite %100, spesifite %94.6, BHIA-3 için sensitivite %27.5, spesifite %100 olarak bulmuşlardır.

Walsh ve ark.[20], agar dilusyon, buyyon mikrodilüsyon, gradient test (0.5 ve 2.0 McFarland inokulumlu), vankomisin agar tarama ve modifiye vankomisin agar tarama yöntemleri ve basitleştirilmiş popülasyon analizini içeren yedi farklı yöntemle 284 MRSA ve vankomisine duyarlılığı azalmış 45 stafilokok izolatında yöntemlerin, duyarlılık ve özgüllüğünü karşılaştırmışlardır. Standart PAP-AUC yöntemiyle karşılaştırdıkları çalışmalarında, 6 μg/ml vankomisin içeren BHI agar tarama yönteminin duyarlılığını %22, özgüllüğünü %97; 5 μg/ml vankomisin içeren Mueller Hinton agar tarama yönteminin duyarlılığını %20, özgüllüğünü %99; basitleştirilmiş popülasyon analizi yönteminin duyarlılığını %71, özgüllüğünü %88; 0.5 McFarland inokulumla yaptıkları gradient test için duyarlılığı %82 özgüllüğü %93; 2.0 McFarland inokulumla yaptıkları gradient test için duyarlılığı %96 ve özgüllüğü %97 olarak bulmuşlardır.

Vankomisin, MRSA enfeksiyonlarının parenteral tedavisinde primer seçeneklerden biridir. Ancak vankomisinin bakterisidal aktivitesinin yavaş oluşu, dirençli suşların ortaya çıkışı ve "MİK creep" fenomeni nedeniyle, etkinliği ile ilgili kaygılar olmaktadır. Vankomisine azalmış duyarlılığı olan MRSA enfeksiyonlarının geliştiği hastaların değerlendirildiği bir derlemede hastaların osteomyelit, derin doku enfeksiyonuyla ilişkili bakteriyemi, endokardit gibi ciddi enfeksiyonlarının bulunduğu, bu hastalarda diyabet, malignite, böbrek yetmezliği, immunsüpresyon ve cerrahi operasyon geçirilmesinin risk faktörü olduğu ve tüm hastaların VISA gelişmeden önce vankomisinle tedavi edildiği bu hastaların %76'sında tedavi başarısızlığı olduğu bildirilmiştir[21]. Çalışmamızda da, hVISA olarak tanımlanan suşların izole edildiği hastalar hastanemizin bilgisayar veri tabanından geriye yönelik incelendiğinde elde edilen verilere göre hastaların uzun süreli glikopeptid kullanım öyküsü olduğu ve bazılarının büyük cerrahi işlemlere maruz kaldıkları tespit edilmiştir.

VanA geni olmadan genetik mutasyonların olması ve hücre fizyolojisindeki değişiklikler sonucu vankomisinin hedefine ulaşmasını engelleyecek şekilde hücre duvarının kalınlaşması VISA suşlarının gelişmesine neden olmaktadır[22]. *S. aureus*'ta vankomisin direncinin gelişmesinde hücre duvar kalınlaşmasının yaygın olduğunun gösterildiği çok merkezli bir çalışmada, 16 klinik VRSA izolatı seri olarak antibiyotiksiz ortama pasajlanmış ve pasaj sonrası yapılan çalışmalarda, vankomisin MİK değerlerinin düş-

tüğü (MİK<4 mg/L) saptanmıştır. Bununla birlikte, populasyon analiziyle yapılan çalışmada, bir suş hariç 15 suşta hâlâ vankomisine dirençli alt popülasyonların bulunduğu gösterilmiştir[22].

Glikopeptid grubu antibiyotiklerin yalancı duyarlı olarak saptanmaları, glikopeptidlere azalmış duyarlılığı bulunan suşlarla gelişen enfeksiyonların tedavisinde başarısızlığa yol açabilmektedir. Özellikle vankomisin tedavisine yanıt vermeyen veya ilk başta düzelme gösterirken ve tedavi devam ederken aniden kötüleşen hastalarda, VISA ve h-VISA olasılığı göz önünde bulundurulmalı ve hastanelerde glikopeptid kullanımının yaygın olduğu ülkemizde bunların prevalansının tespit edilmesi için çalışmalar yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. **Sancak B.** MRSA direnç mekanizmaları: Dünyada ve Türkiye'de epidemiyolojisi. *ANKEM Derg* 2012; 26(Ek 2):E38-47.
2. **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; 40:135-6. https://doi.org/10.1093/jac/40.1.135
3. **Öncül O.** Vankomisin ve teikoplanin hikayesi. *ANKEM Derg* 2010; 24(Ek2):E101-9.
4. **Hota B, Blom DW, Lyle EA, Weinstein RA, Hayden MK.** Interventional evaluation of environmental contamination by vancomycin-resistant enterococci: failure of personnel, product, or procedure? *J Hosp Infect* 2009; 71:1 23-31. https://doi.org/10.1016/j.jhin.2008.10.030
5. **Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, et al.** The Staphylococci. In: Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. 24th Ed. New York: McGraw-Hill, 2007;224-32.
6. **Koneman EW, Allen SD, William MJ, Schereckenberger PC, Winn WC.** Gram-positive cocci, Part I: Staphylococci and related gram-positive cocci. Winn WC Jr et al (editors). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th ed. Lippincott Williams and Wilkins, 2006;623-71.
7. **Brooks GF.** Tıbbi Mikrobiyoloji. Çeviri Editörü: Osman Şadi Yenen. Nobel Tıp Kitabevleri 2010; 224-32.
8. **Kuşçu F, Öztürk DB, Gürbüz Y, Tütüncü EE, Şencan İ, Gül S.** Metisiline dirençli stafilokoklarda azalmış vankomisin duyarlılığının araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45:248-57.
9. **J van Hal S, Wehrhahn MC, Barbagiannakos T, et al.** Performance of various testing methodologies for detection of heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in bloodstream isolates. *J Clin Microbiol* 2011; 49:1489-94. https://doi.org/10.1128/JCM.02302-10
10. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Nineteenth Informational Supplement. Document M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.
11. **Mirza HC.** Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 2001-2011 yılları arasında çocuk hasta grubundan izole edilen MRSA suşlarından vankomisine orta düzeyde duyarlı *S. aureus* (VISA) ve heterojen VISA sıklığının araştırılması. 2.Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongre Kitabı, Antalya, 2013.
12. **Sancak B, Ercis S, Menemenlioğlu D, Çolakoğlu S, Hasçelik G.** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin in a Turkish university hospital. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56:519-23. https://doi.org/10.1093/jac/dki272
13. **Aktaş E, Mengeloğlu FZ, Külah C, Beğendik Cömert F.** Klinik örneklerden izole edilen MRSA suşlarında vankomisine karşı azalmış duyarlılığın araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44:339-41.
14. **Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, et al.** Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogenously resistant to vancomycin. *Lancet* 1997; 350(9092):1670-73. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)07324-8
15. **Willke A, Sayan M, Meriç M, Mutlu B.** Kan kültürlerinde üreyen stafilokoklarda metisilin direncinin gerçek zamanlı PCR ile erken tanısı. *Mikrobiyol Bul* 2012; 46:671-5.
16. **Gülay Z, Atay T, Yuluğ N.** *Staphylococcus aureus* suşlarında vankomisin direncinin araştırılması. *ANKEM Derg* 1998; 12:101.
17. **Sancak B, Yağcı S.** MRSA kan izolatlarında vankomisin ile daptomisin duyarlılığının araştırılması ve VISA-hVISA taranması. 1. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı, Antalya, 2011.
18. **Feng NN.** The incidence and risk factors for heterogeneous vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2013; 52:318-22.
19. **Riederer K, Shemes S, Chase P, Musta A, Mar A, Khatib R.** Detection of intermediately vancomycin susceptible and heterogeneous *Staphylococcus aureus* isolates: Comparison of Etest and agar screening methods. *J Clin Microbiol* 2011; 49:2147-50. https://doi.org/10.1128/JCM.01435-10
20. **Walsh TR, Bolmström A, Qwärnström A, et al.** Evaluation of current methods for detection of staphylococci with reduced susceptibility to glycopeptides. *J Clin Microbiol* 2001; 39:2439-44. https://doi.org/10.1128/JCM.39.7.2439-2444.2001
21. **Howden BP, Ward PB, Charles PGP, Korman TM et al.** Treatment outcomes for serious infections caused by methcillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced vancomycin susceptibility. *Clin Infect Dis* 2004; 38(4):521-8. https://doi.org/10.1086/381202
22. **Hiramatsu K.** Vancomycin resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infect Dis* 2001; 1(3):147-55. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00091-3