

**T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**METİSİLİNE DİRENÇLİ STAFİLOKOKLARDA GLİKOPEPTİD  
ANTİBİYOTİKLERE DUYARLILIK DURUMUNUN ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Hayati GÜNEŞ**

**MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI  
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Yrd. Doç. Dr. Emel SESLİ ÇETİN**

**Bu tez, Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
1669-TU-08 no'lu proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ISPARTA-2008**

## ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim boyunca benden hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen hocalarım; başta anabilim dalı başkanımız sayın Doç. Dr. Buket CİCİOĞLU ARIDOĞAN ve sayın Doç. Dr. Mustafa DEMİRCİ olmak üzere sayın Doç. Dr. Ali Kudret ADİLOĞLU, sayın Doç. Dr. Selçuk KAYA ile, uzmanlık tezi ve yaptığımız diğer araştırma çalışmalarında çok büyük bir sabır ve fedakarlık örneği göstererek bunları benim de öğrenmemde önemli paya sahip olan tez danışmanım sayın Yrd. Doç. Dr. Emel SESLİ ÇETİN'E teşekkürlerimi sunarım.

Uzun süre beraber çalıştığımız Dr. Süleyman ÖNAL, Dr. Hasan KESBİÇ, Dr. Nurettin GÖNÜLATEŞ, Dr. Mehmet Salih ARIKAN, Dr. İlker PAKBAŞ, Dr. Tülay TETİK, Dr. Tekin TAŞ, Dr. Ayşe AYNALI, Dr. Osman KILINÇ, Dr. Ayşe Gül ÖZSEVEN ve Dr. Hilmi DEMİRİN'e asistanlık eğitimim sırasında bana sağladıkları katkı ve verdikleri destekten dolayı teşekkür ederim.

Laboratuar çalışanlarından Cengiz KAYAER, Hakan DOĞANGÖNÜL ve Bediha OĞUZ başta olmak üzere tüm biyolog ve teknisyen arkadaşlara bana olan yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her zaman bana destek olan ve bugüne gelmem için hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan annem, babam ve kardeşlerime de şükranlarımı sunarım.

**İÇİNDEKİLER**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ÖNSÖZ.....</b>   | <b>i</b>  |
| <b>İÇİNDEKİLER.....</b>                                   | <b>ii</b> |
| <b>KISALTMALAR.....</b>                                   | <b>v</b>  |
| <b>ŞEKİL ve TABLO LİSTESİ.....</b>                        | <b>vi</b> |
| <b>1. GİRİŞ.....</b>                                      | <b>1</b>  |
| <b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>                             | <b>4</b>  |
| 2.1. Stafilokoklar.....                                   | 4         |
| 2.1.1. Tarihçe.....                                       | 4         |
| 2.1.2. Morfoloji, Boyanma ve Biyokimyasal Özellikler..... | 5         |
| 2.1.3. Hücre Yapısı.....                                  | 6         |
| 2.1.3.1. Genom.....                                       | 6         |
| 2.1.3.2. Hücre Duvarı.....                                | 6         |
| 2.1.3.2.a. Hücre Duvarı Peptidoglikan Sentezi.....        | 7         |
| 2.1.3.3. Kapsül.....                                      | 8         |
| 2.1.3.4. Yüzey Proteinleri.....                           | 8         |
| 2.1.4. Enzimler.....                                      | 8         |
| 2.1.4.a. Katalaz.....                                     | 8         |
| 2.1.4.b. Koagülaz.....                                    | 9         |
| 2.1.4.c. Hyalüronidaz.....                                | 9         |
| 2.1.4.d. Stafilokinaz.....                                | 9         |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.1.4.e. Lipaz.....   | 9         |
| 2.1.4.f. Deoksiribonükleaz (DNase).....   | 10        |
| 2.1.4.g. Penisilinaz ( $\beta$ -Laktamaz).....                                    | 10        |
| 2.1.5. Patogenez.....   | 10        |
| 2.1.6. Epidemiyoloji.....   | 11        |
| 2.1.7. Tedavi.....  | 11        |
| 2.2. Antibiyotik Direncinin Özellikleri.....                                      | 12        |
| 2.2.1. Stafilokoklarda Glikopeptid Dışı Antibiyotiklere Direnç.....               | 12        |
| 2.2.1.a. Aminoglikozidlere Direnç.....  | 12        |
| 2.2.1.b. Kloramfenikol Direnci.....   | 12        |
| 2.2.1.c. Makrolid, Linkozamid ve Streptogramin B (MLS <sub>B</sub> ) Direnci..... | 12        |
| 2.2.1.d. Tetrasiklin Direnci.....   | 13        |
| 2.2.1.e. Kinolon Grubu Antibiyotiklere Direnç.....                                | 13        |
| 2.2.1.f. $\beta$ -Laktamlara Direnç.....  | 13        |
| 2.2.2. Stafilokoklarda Glikopeptid Direnci.....                                   | 14        |
| 2.2.2.1. VISA, h-VISA ve VRSA .....   | 15        |
| 2.2.2.1.a. Hetero-VISA'nın Klinik ve Biyolojik Anlamı.....                        | 18        |
| 2.2.2.1.b. VISA İnfeksiyonunun Tedavisi.....                                      | 20        |
| 2.3. İnfeksiyon kontrol ölçütleri.....  | 20        |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>  | <b>22</b> |
| 3.1. Bakteri Suşları.....   | 22        |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.2. Mikrobiyolojik kültür ve identifikasyon işlemleri.....                 | 23        |
| 3.3. Vankomisin Agar Tarama.....  | 24        |
| 3.4. Standart E Test.....   | 24        |
| 3.5. Mikrodilüsyon.....   | 24        |
| 3.6. Populasyon Analiz Profili-Eğri Altında Kalan Alan (PAP-AUC) Oranı..... | 25        |
| <b>4. BULGULAR.....</b>   | <b>27</b> |
| <b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>  | <b>31</b> |
| <b>6. ÖZET.....</b>   | <b>43</b> |
| <b>7. SUMMARY.....</b>  | <b>44</b> |
| <b>8. KAYNAKLAR.....</b>  | <b>45</b> |

**KISALTMALAR**

|                 |   |
|-----------------|---|
| <b>KNS</b>      | : Koagülaz-Negatif Stafilokok                                   |
| <b>MRSA</b>     | : Metisiline Dirençli <i>S. aureus</i>                          |
| <b>MRKNS</b>    | : Metisiline dirençli koagülaz negatif stafilokok               |
| <b>MSSA</b>     | : Metisiline duyarlı <i>S. aureus</i>                           |
| <b>MSKNS</b>    | : Metisiline duyarlı koagülaz negatif stafilokok                |
| <b>PBP</b>      | : Penisilin Bağlayan Protein                                    |
| <b>PBP2a</b>    | : Penisilin Bağlayan Protein 2a veya 2'                         |
| <b>VISA</b>     | : Vankomisine Orta Derecede Dirençli <i>S. aureus</i>           |
| <b>HVISA</b>    | : Vankomisine Heterojen Orta Derecede Dirençli <i>S. aureus</i> |
| <b>GISA</b>     | : Glycopeptide İntermediate <i>S. aureus</i>                    |
| <b>VRSA</b>     | : Vankomisine Dirençli <i>S.aureus</i>                          |
| <b>BHI Agar</b> | : Beyin-Kalp İnfüzyon Agar                                      |
| <b>MİK</b>      | : Minimum İnhibitör Konsantrasyon                               |
| <b>TEM</b>      | : Transmisyon Elektron Mikroskopi                               |
| <b>YBÜ</b>      | : Yoğun Bakım Üniteleri   |
| <b>GlcNAc</b>   | : N-asetil glukozamin   |
| <b>MurNAc</b>   | : N-asetil muramik asit   |
| <b>CLSI</b>     | : Clinical and Laboratory Standards Institute                   |
| <b>CDC</b>      | : Center For Disease Control and Prevention                     |

## ŞEKİL, TABLO ve GRAFİK LİSTESİ

|   |    |
|---|----|
| Şekil 1. Mürein monomerin sentezi.....  | 7  |
| Şekil 2. $\beta$ -laktamların etki mekanizması.....   | 14 |
| Şekil 3. Vankomisin ve teikoplaninin etkisi.....  | 14 |
| Şekil 4. Mu 50'nin hücre duvarı kalınlaşması.....   | 17 |
| Tablo 1: Bakteri gruplarının gönderildiği kliniklere göre dağılımı.....   | 22 |
| Tablo 2: Bakteri gruplarının izole edildiği örneklerle göre dağılımı.....   | 23 |
| Tablo 3: Tarama agarda üreyen bakterilerin vankomisin ve teikoplanin MİK değerlerine göre dağılımı.....   | 27 |
| Tablo 4: Tarama agarda üremeyen bakterilerin E-test ve mikrodilüsyon yöntemiyle vankomisin ve teikoplanin MİK değerlerine göre dağılımı.....                                  | 28 |
| Tablo 5: Vankomisin 6 $\mu\text{g/ml}$ 'lik tarama agarda üreyen stafilocokların MİK <sub>50</sub> ve MİK <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ ) değerlerine göre dağılımı.....   | 29 |
| Tablo 6: Vankomisin 6 $\mu\text{g/ml}$ 'lik tarama agarda üremeyen stafilocokların MİK <sub>50</sub> ve MİK <sub>90</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ ) değerlerine göre dağılımı..... | 29 |
| Grafik 1: Bakteri 1'in (427) PAP-AUC alan grafiği.....  | 30 |
| Grafik 2: Bakteri 2'nin (575) PAP-AUC alan grafiği.....   | 30 |
| Grafik 3: Standart stafilocok suşunun (ATCC 25923) PAP-AUC alan grafiği.....  | 30 |
| Grafik 4: Mu 3 suşunun (hVISA) PAP-AUC alan grafiği.....  | 30 |
| Grafik 5: Mu 50 suşunun (VISA) PAP-AUC alan grafiği.....  | 30 |

## 1. GİRİŞ

Stafilokoklar, insan normal florasında bulunmakla birlikte ciddi infeksiyona da neden olabilen bakterilerdir. Doğada, tozda, hayvanların çıkartılarında da yaygın olarak bulunabilir ve insanların deri, burun boşluğu ve lezyonlarında üreyebilirler. Son zamanlarda gittikçe artan oranda hastane ve toplum kaynaklı infeksiyon etkeni olmaya başlamışlardır. Gram pozitif kok morfolojisinde, boyalı preparatlarda üzüm salkımı şeklinde görülen, kanlı agarda S tipi koloni oluşturan bakterilerdir. Deri, yumuşak doku, yara infeksiyonu ve besin zehirlenmesi gibi tablolardan osteomyelit, septik artrit, pnömoni ve endokardite uzanan geniş bir infeksiyon yelpazesine sahiptirler. Bu bakterilerden etken olarak en sık rastlanımı *S. aureus*'tur. Ondan sonra sırasıyla *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus* gelir. *S. aureus*'u diğerlerinden ayıran özellik koagülaz pozitifliğidir. Bu bakteri dışındakiler, genel olarak koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) olarak adlandırılırlar. *S. aureus* insanda hastalık etkeni olarak sık rastlanan, virülansı yüksek bir mikroorganizmadır. Penisilin tedaviye girdiği 1945'ten itibaren *S. aureus* suşlarında  $\beta$ -laktamaza bağlı penisilin direnci 5 yıl içinde % 50'ye çıkmıştır. Bugün bu direnç % 95'in üstündedir.

1960 yılında penisilina dayanıklı semisentetik penisilin olan metisilinin kullanıma girmesi ile birlikte bir yıl içinde metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları saptanmaya başlanmış ve 1980'li yıllardan sonra tüm dünyada hastane infeksiyonu etkenleri arasında önemli bir sorun olarak ortaya çıkmıştır. MRSA suşları tüm  $\beta$ -laktam antibiyotikle beraber  $\beta$ -laktam dışı antibiyotiklerin çoğuna da dirençli olduklarından, bu etkenlerle oluşan ağır infeksiyonların tedavisinde tek seçenek glikopeptid antibiyotiklerdir. Vankomisine dirençli koagülaz-negatif stafilokokların ve hemen ardından vankomisine dirençli enterokokların ortaya çıkmasından sonra, *S. aureus* suşlarında korkulan ve beklenen vankomisin direnci ile ilgili ilk bulgular Japonya'dan 1997 yılında gelmiş ve bunu ABD'de izole edilen suşlar takip etmiştir.

MRSA suşları, metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) suşlarında bulunmayan,  $\beta$ -laktam antibiyotiklere düşük afinite gösteren penisilin bağlayan protein 2a veya 2' (PBP2a) olarak adlandırılan bir protein üretmektedir. Bu protein, kromozomal bir gen olan *mecA* geni tarafından kodlanır. PBP2a proteini ve *mecA* genine sahip *S.*



*aureus* suşları metisiline intrinsek direnç gösterirler ve tüm  $\beta$ -laktam antibiyotiklere dirençlidirler. KNS türlerinin birçoğunda da metisilin direnci aynı *mecA* geni ve PBP2a proteini ile direnç gelişimi görülmektedir. Metisiline dirençli stafilocoklara hastanelerde yatan hastalarda, toplumdakilere oranla daha sık rastlanır. Uzun süreli hospitalizasyon, ileri yaş, altta yatan ciddi hastalıklar, önceden antibiyotik kullanımı ve en önemlisi girişimsel işlemler bu bakterilerle gelişen infeksiyonlar için başlıca risk faktörleridir. Ayrıca; özellikle yoğun bakım, cerrahi, periton diyalizi, hemodiyaliz ve HIV ile infekte hastaların tedavi edildiği ünitelerde MRSA burun portörlüğü, başlıca risk faktörü olarak bildirilmektedir.

Metisiline dirençli koagülaz negatif stafilocok (MRKNS) suşlarının etken olduğu infeksiyonların morbidite ve mortalitesinin yüksek olması ve yüksek ek maliyet başta MRSA olmak üzere, çoğul antimikrobiyal dirençli stafilocokların prevalansının hemen her ülkede izlenmesine ve konuya ilişkin çok merkezli çalışma programlarının düzenlenmesine neden olmuştur. Stafilocoklarda  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklere direnç gelişmesiyle beraber, diğer gruplardaki antibiyotiklere de direnç gelişmiş ve çoklu dirençli bakteriler ortaya çıkmaya başlamıştır. Bu da, daha önceden kullanılmış, ama yan etkilerinden dolayı terkedilmiş ilaçlar olan glikopeptidlerin (özellikle vankomisin) kullanımını gündeme getirmiştir. Klinikte en sık kullanılan glikopeptit antibiyotik vankomisindir. Bu antibiyotik, ilk olarak 1956 yılında klinik kullanıma girmiş ve MRSA izolatlarındaki artışla birlikte kullanımı hızla artmıştır. *S. aureus* suşlarında vankomisine direnç sorunu, dünyada ilk kez 1997 yılında Japonya'dan bildirilmiştir. Bu ilk suş ve kısa süre sonra ABD'den bildirilen suşlarda vankomisine orta derecede direnç (VISA) söz konusudur. Suşların vankomisin için minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin 8-16  $\mu\text{g/ml}$  arasında olduğu tespit edilmiştir. VISA izolatlarının çoğu teikoplanine de orta derecede dirençli olduğundan glycopeptide intermediate *S. aureus* (GISA) terimi de kullanılmaktadır. 2002 yılında ise ABD'den ilk vankomisine dirençli *S.aureus* (VRSA) suşu bildirilmiştir.

1997 yılında Japonya'da izole edilen bakteri Mu50 (VISA), aynı yıl izole edilen farklı bir direnç tipine sahip olan diğer bir bakteri Mu3 (hetero-VISA = h-VISA) olarak adlandırılmış; son olarak da ABD'de 2002 yılında 2 ve 2004 yılında 1

tane olarak bildirilen, vankomisine tamamen dirençli ve van A geni taşıyan üçüncü bir suş daha tanımlanmıştır.

Glikopeptid direnci konusunda tanımlanan bu üç tipten sonuncusunda bakteriler vankomisine karşı çok yüksek MİK değerlerine sahip olduğundan, rutin duyarlılık testlerinde tespit edilebilmektedir. Ancak diğer 2 türün rutin testlerde saptanması zor olduğu için bakteriler vankomisine duyarlı gibi görüldüğü halde tedavi genellikle başarısızlıkla sonuçlanmaktadır. Özellikle vankomisin tedavisine cevap vermeyen veya ilk başta düzelme gösterirken ve tedavi devam ederken aniden kötüleşen hastalarda, VISA ve h-VISA ihtimali göz önünde bulundurulmalı ve hastanelerde glikopeptid kullanımının yaygın olduğu ülkemizde bunların prevalansının tespit edilmesi için çalışmalar yapılmalıdır.

Bu çalışmada, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesinde yatan hastalardan izole edilen stafilokokların metisiline dirençli ve duyarlı olanlarından eşit sayıda bakteri alınıp, bunların vankomisin ve teikoplanin için MİK değerlerinin belirlenerek, metisiline dirençli olanlarda bu antibiyotikler için artmış MİK değerlerinin araştırılması ve metisiline dirençli suşlarda duyarlılara göre bu ilaçlar için MİK değerlerinde artma olup olmadığının tespit edilmesi; ayrıca *S. aureus*'larda VISA ve h-VISA varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Stafilocoklar

#### 2.1.1. Tarihçe

Stafilocokları ilk kez 1878'de Robert Koch tanımlamış, 1880'de Pasteur sıvı besiyerinde üretmiş ve 1881'de Alexander Ogston, fare ve kobaylar için patojen olduğunu vurgulamıştır. Rosenbach, 1884'te beyaz renkli kolonileri *Staphylococcus albus*, sarı-portakal renkli kolonileri ise *S. aureus* olarak isimlendirmiştir. Sonradan stafilocoklar, pek çok alt gruba ayrılmıştır. Ancak, infeksiyon etkeni olarak çoğunlukla *S. aureus* izole edildiği için çalışmalar daha çok bu bakteri üzerinde yoğunlaşmış ve bunun dışında kalan stafilocok alt grupları genel bir isimlendirmeyle KNS olarak adlandırılmışlardır. Stafilocoklara karşı 1936 yılından itibaren sülfonamidler ve 1940'lı yılların başlarından itibaren de penisilinler kullanılmaya başlanmış, ancak 1944'ten itibaren penisilinazın üretilmesiyle meydana gelen penisilin direnci gittikçe artarak 1966–67 yıllarında %80'e kadar ulaşmıştır (1). 1961 yılında metisilin kullanılmaya başlanmış ve kısa sürede bu antibiyotiğe de direnç gelişmiştir. MRSA suşları 1970'li yıllardan beri yaygın olarak tespit edilmeye başlanmış ve bu bakteriler; penisilinaza dirençli (antistafilocoksik) penisilinler olarak bilinen metisilin, nafsilin, oksasilin gibi ilaçlarla beraber başka ilaç gruplarına da direnç göstermeye başlamışlardır (2). 1980'li yılların başlarından itibaren hastanelerde sporadik MRSA suşlarının izolasyonu artmış ve 1982 yılının başından itibaren hastane infeksiyonu etkeni olan epidemik MRSA suşları ortaya çıkmıştır (3). Ayrıca, 1980'lerden itibaren KNS'ların da çok önemli nozokomiyal infeksiyonların etkeni olduğu; sepsis, endokardit ve osteomyelit gibi değişik tablolar yapabildiği gösterilmiştir (4). 1956 yılında kullanıma giren vankomisin, ilk yıllarda saf preparatlarının hazırlanamamış olmasından dolayı bir süre sonra terkedilmiş, ancak MRSA grubu bakterilerin yaygın hale gelmesiyle tekrar kullanılmaya başlanmış ve bu infeksiyonların başarıyla tedavi edilmesini sağlamıştır. Ancak stafilocoklar, bu ilaca karşı da direnç geliştirmeye başlamış ve vankomisine orta derecede dirençli ilk suş 1997'de Japonya'dan bildirilmiş; takip eden yıllarda ABD, Fransa, Kore, Güney Amerika, Brezilya ve İskoçya gibi pek çok ülkeden azalmış vankomisin duyarlılığını

bildiren çalışmalar rapor edilmiş; bu da stafilokoklarda vankomisin direncinin global bir sorun olduğuna işaret etmiştir. (5–9). 2002 ve 2004 yıllarında ABD’den bildirilen 3 VRSA suşu (MIC  $\geq$ 32  $\mu$ g/ml) da bu konudaki endişeleri iyice arttırmıştır. (10–12).

### 2.1.2. Morfoloji, Boyanma ve Biyokimyasal Özellikler

Stafilokoklar; hareketsiz, spor oluşturmeyen, katalaz pozitif, Gram pozitif koklardır. *S. aureus subs. anaerobius* ve *S. saccharolyticus* dışındaki türler fakültatif anaerobdur. Bu iki tür anaerob ortamlarda ürer ve fakültatif anaerob olan diğer türlerin aksine çoğunlukla katalaz negatiftirler. Stafilokokların, sporsuz olmalarına rağmen kuruluğa dayanıklılıkları fazladır. Kapsülsüzdürler ve en tipik üremeleri kanlı agardadır. Optimal üreme ısıları 30-37 <sup>0</sup>C ve pH değerleri de 7-7.5’tir (13). Kolonileri; yuvarlak, düzgün, kabarık, mat, S tipinde olup; *S. aureus* kökenlerinin çoğunda sarı pigment ve beta hemoliz görülür. Bu hemoliz; koyun, insan veya at kanlı agarda ortaya çıkabilir ve uzun süreli inkübasyonlarda daha belirgin hale gelir. *S. epidermidis* ve *S. saprophyticus*’un bazı kökenlerinde de sarı veya turuncu pigment ile hemoliz görülebilir. Bu organizmalar; mikroskopik olarak; tek tek, ikili, tetrat şeklinde veya kısa zincirler halinde dizilim gösterebilirler (13–16).

Stafilokoklar, % 10 ve daha az NaCl içeren ortamlarda üreyebilirler. Başta glikoz olmak üzere birçok karbonhidratı fermentatif olarak parçalar ve son ürün olarak laktik asit meydana getirirler. Gaz oluşturmazlar. Lizostafine duyarlı, lizozime dirençlidirler. Mannitole etkileri değişken olup özellikle *S. aureus* bu şekere etkilidir. Bu yüzden mannitol fermentasyonu bu bakteriyi diğerlerinden ayırmada kullanılan bir özelliktir (14). *S. saprophyticus* da novobiyosine dirençli olması ile diğer stafilokoklardan ayrılır (17).

*S. aureus*’u diğer stafilokoklardan ayırmak için koagülaz, mannitol fermentasyonu ve deoksiribonükleaz testleri kullanılır. Bu testlerin pozitif sonuç vermesi, bakterinin *S. aureus* olduğunu gösterir (15).

Stafilokoklar, genellikle insan ve hayvanların deri ve müköz membranlarında bulunurlar. *S. aureus*, normal insanların %10-40’ının ve hastane personeli ile yatan hastaların çoğunun burun mukozasında kolonize olabilir. *S. epidermidis*, *S. aureus*’un bulunmaması durumunda burun mukozasından soyutlanan stafilokokların % 90-100’ünü oluşturur. Ayrıca; aksiller, inguinal, perineal bölgeler ile ayak

parmaklarında ve daha az olarak derinin diğer kısımlarında da kolonize olur. *S. hominis* ve *S. haemolyticus* aksiller, inguinal ve perineal bölgede yerleşme eğilimindedirler. *S. saprophyticus* deriden çok ürogenital mukoza epiteline yapışma özelliği gösterdiğinden daha çok bu bölgelerde kolonize olmuştur (14).

### **2.1.3. Hücre Yapısı:**

#### **2.1.3.1. Genom:**

Bakteri genomu; profajlar, plazmidler ve 2800 baz çiftli sirküler bir kromozomdan oluşur. Antibiyotik direnci ve bakteri virülansından sorumlu olan genler bu kromozom veya ekstrakromozomal yapılar üzerinde bulunabilir (18).

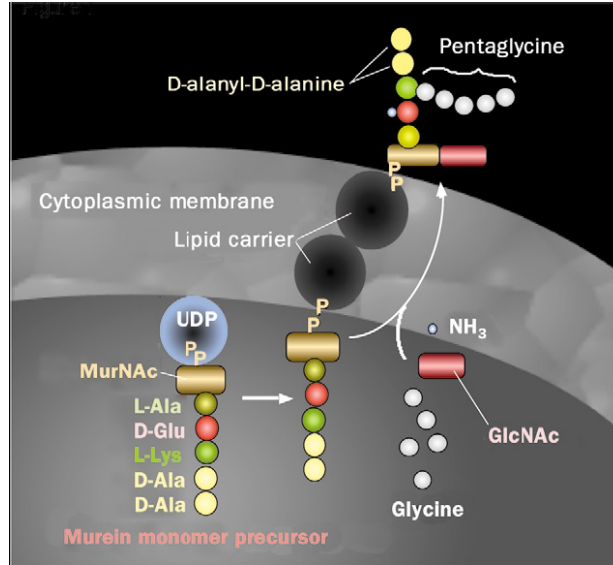
#### **2.1.3.2. Hücre Duvarı:**

Hücre duvarı kuru ağırlığının yaklaşık % 50'si peptidoglikan (mürein) tabaka tarafından oluşturulur. Stafilokoklar için vücudun önemli savunma mekanizmalarından biri olan lizozim (muramidaz) enziminin hedefi, hücre duvarındaki peptidoglikan tabakasıdır. Bu tabakayı oluşturan pentaglisin köprülerinin lizostafin enzimine özgül bir duyarlılık paterni olduğu için, bu enzim stafilokok alt gruplarını tanımlamak amacıyla da kullanılmaktadır (13, 18–19).

Hücre duvarında bulunan teikoik asit, mukozalarda bulunan özgül reseptörleri (fibronektin, fibrinojen, laminin, trombospondin, elastin, kollajen, vitronektin ve sialoprotein) ile birleşerek stafilokokların infeksiyon 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. (13, 18–21).

### 2.1.3.2.a. Hücre Duvarı Peptidoglikan Sentezi

Yüksek ozmotik basınca sahip olan *S. aureus*'un düşük basınçlı ortamlarda üreyebilmesi ve rüptüre olmaması için peptidoglikan tabakasına ihtiyaç vardır. Peptidoglikanın üretilmesi için monomerik komponent (mürein monomer) hücre içinde sentezlenmeli ve sitoplazmik membranda bulunan lipid taşıyıcılar tarafından hücre dışına taşınmalıdır (Şekil 1).



Şekil 1. Mürein monomerin sentezi. Mürein monomer, 2 amino şeker (N-asetil muramik asit [MurNAc] ve N-asetil glukozamin [GlcNAc]) ile 10 aminoasitten oluşur. Mürein monomerin prekürsörü MurNAc ve ana peptidler (L-alanin, D-glutamik asit, L-lizin ile 2 D-alanin)'den oluşur. Bu yapı, sitoplazmada sentezlenir ve sitoplazmik membrandaki lipid taşıyıcıya bağlanır. Sonra, sitoplazmik membranın dışına doğru ilerlerken GlcNAc ile beraber 5 glisin bu yapıya eklenir ve matür mürein monomer haline gelmesi için izoglutamik asidine bir  $\text{NH}_3$  grubu bağlanır (22).

Sitoplazmik membranda bulunan glikoziltransferaz ve transpeptidaz adlı 2 enzim mürein monomeri peptidoglikanın devasa yapısına monte eder. Glikoziltransferaz, yeni oluşan peptidoglikan zincirlerini üretmek için mürein monomerlerini amino şeker parçalarının bulunduğu yerden polimerize eder. Sonra da penisilin bağlayan protein (PBP; transpeptidaz olarak da bilinir), yeni sentezlenmiş peptidoglikanı *S. aureus*'un daha önceden sentezlenmiş olan peptidoglikan tabakalarına bağlar. Bu aşamada PBP, mürein monomerin D-alanil-D-alanin rezidülerini tanır, iki D-alanini birbirinden ayırır, sondan bir önceki D-alanini önceden sentezlenmiş olan peptidoglikan tabakalarından dışa doğru çıkıntı yaptırarak pentaglisin zincirinin ucuna bağlar. Peptidler arasında köprü formasyonu oluştuğunda tamamlanmış peptidoglikandan mürein monomerin terminal D-alanini

kopar. Bununla beraber, PBP'ler tarafından işlenmeyen % 20 oranında D-alanil-D-alanin rezidüsünün de kaldığı bilinmektedir.

### **2.1.3.3. Kapsül**

Birçok *S. aureus* kökeninde polisakkarit yapıda bir mikrokapsül vardır. Bu yapı, bakteriyi fagositozdan korur, mitojenle karşılaşmasından sonraki mononükleer hücrelerin proliferasyonunu inhibe eder ve konak hücreleri ile sentetik materyallere yapışmasını sağlar. Bugüne kadar tanımlanan 11 kapsüler serotip içinde insan infeksiyonlarının % 75'inden sorumlu olanlar tip 8 ve 5'tir (18–20, 23).

### **2.1.3.4. Yüzey Proteinleri**

Protein A, elastin, kollajen ve fibronektin bağlayan proteinler ile clumping faktör, kimyasal yapıları ve hücre duvar yerleşimleri birbirine benzeyen stafilokoksik yüzey proteinleridir. Bu proteinler bakterilerin konak dokularında kolonize olmasında en önemli faktörlerdir. Bunların prototipi protein A'dır. Stafilokoklarda; üreme sırasında ortama salınan serbest, hücreye bağlı ve hücre dışına salgılanan olmak üzere 3 tip protein A bulunmuştur. Bu proteinin en önemli özelliği bazı immünglobulinlerin (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>, IgG<sub>4</sub>) Fc reseptörleri ile birleşebilmesidir. Bu nedenle üreme sırasında ortama salınan serbest protein A, immünglobulinlerin Fc reseptörlerine bağlanarak antikora bağlı fagositozdan, ayrıca hücre dışına salgılanan protein A da aynı reseptörlere bağlanarak komplemana bağlı vücut savunmasından bakteriyi korumaktadır. (4, 19, 24).

### **2.1.4. Enzimler:**

#### **2.1.4.a. Katalaz**

Bakteri, fagositler tarafından hücre içine alındıktan sonra, oluşturulan toksik hidrojen peroksidi yıkarak su ve oksijene dönüşümünü katalizleyen enzimdir. Tüm stafilokoklar tarafından üretilir ve stafilokokların streptokoklardan ayırımında kullanılır. Bakteriler, bu enzim sayesinde fagositlerin içinde öldürülmeye karşı direnç kazanır (25).

#### 2.1.4.b. Koagülaz

Ekstrasellüler bir proenzimdir. Koagülaz reaktif faktör ile birleşerek aktif duruma geçer ve plazmayı pıhtılaştırır. *S. aureus*'un diğer stafilocoklardan ayırımını sağlar. Filtrelerden geçebilen, ısıya dirençli bir enzimdir. Koagülaz pozitif stafilocokların üzerinde oluşan kalın fibrin tabakasının mikroorganizmayı fagositoza karşı koruyarak patojenliğe katkı yaptığı bildirilmiştir. *S. aureus* suşlarında iki tip koagülaz bulunur: Bunlar; fibrinojeni fibrine direkt olarak dönüştüren bağlı koagülaz ve bu dönüşümü serumdaki koagülaz reaktif faktör yardımıyla yapabilen serbest koagülazdır. Serbest koagülaz protein yapısındadır ve proteolitik enzimlerle kolaylıkla inaktive edilir. Bağlı koagülaz stafilocokların kümeleşmelerini de sağlar. Bu özelliklere sahip olan stafilocoklar, girdikleri organizmada fibrin bir zırh ile kaplanarak fagositoza karşı korundukları gibi aynı zamanda serumun bakterisit etkisini de önlediklerinden patojenlik kazanmış olurlar. Koagülaz enzimi lamda ve tüpte koagülaz olmak üzere 2 şekilde araştırılmaktadır. Lam deneyi ile kültür süzüntülerinde bağlı koagülaz ortaya konurken tüp deneyi ile kültür süzüntülerinde de bulunabilen serbest koagülaz tespit edilmektedir (4, 26–28). Her iki test için de EDTA'lı tavşan plazmasının kullanılması önerilmektedir. *S. aureus* identifikasyonu için tüp koagülaz testi referans yöntem olarak kabul edilmektedir (19).

#### 2.1.4.c. Hyalüronidaz

'Yayılma faktörü' olarak da bilinir. *S. aureus* suşlarının %90'dan fazlası tarafından salgılanır. Hyalüronik asidi hidrolize ederek infeksiyonun yayılımını kolaylaştırır (4).

#### 2.1.4.d. Stafilokinaz

'Fibrinolizin' olarak da bilinir. Isıya dirençlidir. Plazminojeni plazmine çevirir. Fibrinolitik etki bu madde aracılığıyla oluşur ve fibrini parçalayarak organizmanın yayılmasına yardımcı olur (17, 26).

#### 2.1.4.e. Lipaz

*S. aureus* suşlarının tümü ve KNS'lerin 1/3'ü lipaz enzimi salgırlar. Bu enzim, yağları hidrolize ederek vücudun lipid içeren bölgelerinde bakterilerin



yaşamısını ve yüzeysel dokuları invaze ederek fronkül ve karbonkül gibi infeksiyonları oluşturmasını sağlar (13, 19–20).

#### **2.1.4.f. Deoksiribonükleaz (DNase)**

*S. aureus* ların % 90-96'sında bulunan ısıya dirençli bir fosfodiesterazdır (4).

#### **2.1.4.g. Penisilinaz ( $\beta$ -Laktamaz)**

Penisilin grubu antibiyotiklerdeki  $\beta$ -laktam halkasının hidroksil grubunu parçalayarak etkisiz hale getirir. Bunun sonucunda bakteriler hücre duvarı sentezini inhibe eden  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklere karşı dirençli hale gelirler. Bu enzimin salgılanmasını sağlayan genler, plazmid ve transpozonlarla aktarılır (26, 29).

#### **2.1.5. Patogenez**

Stafilokoksik infeksiyonlar; daha önceden kolonize olmuş hastalarda infeksiyon oluşması şeklinde, ya da geçici el kolonizasyonu olan sağlık personelinin hastalara teması ile ortaya çıkabilmektedir. Bu infeksiyonların patogenezinde rol oynayan mekanizmalar; bakterinin konağa yapışması (adherans), anatomik bariyerlerden girişi, fagositik hücrelerin inaktivasyonu, konağın hümmoral savunmasının baskılanması ve toksinlerin salgılanması şeklinde özetlenebilir (30). İnfeksiyonu etkileyen faktörler arasında insanın bağışıklık sisteminin durumu, mikroorganizmanın sayı ve virülansı, deri ve mukoza bütünlüğünün bozulması sayılabilir. Travmatik ve dekübit yaralarla yanıklar hazırlayıcı faktörler olabildiği gibi, damar içi protez ve kateter uygulamaları ile bakteriyemi gelişebilir.

Burunda stafilokok taşıyanlar önemli infeksiyon kaynağıdır. Bakteri, hava yolu ve temasla da bulaşabilir (4). *S. aureus*, infekte ettiği bölgede hızla kolonize olabilen bir bakteridir. Aynı zamanda deri ve mukozadaki minör çatlaklardan invaze olmasını ve konak savunma mekanizmalarının çoğundan kendini korumasını sağlayan biyokimyasal mekanizmalara da sahiptir. Bundan dolayı dolaşım sistemine girdiğinde, bakteriyel endokardit ve yaygın metastatik abselere neden olabilmektedir (31).

İnsanlardaki stafilokok infeksiyonlarında *S. aureus* öncelikli patojen olarak yer alır. Bundan başka deri ve mukozaların normal flora bakterileri olarak kabul edilen *S.*

*epidermidis* ve *S. saprophyticus* gibi KNS'lar da infeksiyon yaparlar (14). Bu bakteriler fırsatçıdır ve konak organizmanın uygun koşullarında infeksiyon oluştururlar. Bu grup içinde en sık (%70–80) izole edilen tür olan *S. epidermidis*'in oluşturduğu infeksiyonlar, genellikle yabancı cisimlerin varlığı ile ilişkilidir. Bu da bakterinin yabancı cisimlerin üzerine yapışma ve bu yüzeyler üzerinde biyofilm oluşturma yeteneği ile açıklanmaktadır (32).

### 2.1.6. Epidemiyoloji

*S. aureus*'un doğal kaynağı insandır. Yenidoğan döneminde *S. aureus* kökenleri; göbek çevresi, perianal bölge, deri ve bazen de gastrointestinal sistemde kolonize olurlar. Bundan sonraki dönemde ise daha çok burunda kolonize olurlar. Sağlıklı erişkinlerde kolonizasyon oranı, % 10-20'si kalıcı olmak üzere % 30–50 arasında değişmektedir. İnterlökin–2 tedavisi görenler, AIDS'liler, atopik dermatitliler, cerrahi operasyon geçirmiş hastalar ile hemodiyaliz hastaları, intravenöz uyuşturucu kullananlar ve Tip I diyabetlilerde genel populasyona göre taşıyıcılık oranı yüksektir (13).

Bakterinin etken olduğu hastane infeksiyonlarında en önemli kaynak, hastalar veya hastane personelinin burun taşıyıcılığıdır. *S. aureus*; başta burun olmak üzere aksiller bölge, vajen, farinks veya yaralı deri bölgelerinde infeksiyon oluşturmadan kolonize olabilir. Bu şekilde burun mukozası veya deride kolonize olan bakteri, küçük bir travma sonrası kana veya derin dokulara yayılır ve virülans faktörleri ile konak savunma mekanizmalarının etkilerine bağlı olarak ciddiyeti değişen infeksiyonlar oluşturur. Her ne kadar infeksiyonlar direkt invazyonla oluşanlar ve toksin etkisiyle oluşanlar olarak 2 gruba ayrılrsa da bu 2 mekanizmanın beraber bulunabileceği her zaman akılda tutulmalıdır. Çok benign görünen bir deri infeksiyonunun bakteriyemiye bağlı metastatik infeksiyonlara, sepsise veya toksik şok sendromuna yol açabileceği unutulmamalıdır (10, 13, 19, 26, 33).

### 2.1.7. Tedavi

Uygun antibiyotik seçimi, ancak antibiyotik duyarlılık testi yapıldıktan sonra yapılabilir. Ağır infeksiyonlarda yüksek dozlarda ve uzun süre antibiyotik kullanılması gerekebilir. Abse varsa drenaj yapılmalıdır. Özellikle *S. aureus*

suşlarında abse oluşumu daha çok görülmektedir. Metisiline dirençli stafilokoklar için seçilecek en etkili ilaç vankomisindir. Özellikle osteomyelit, pnömoni, perikardit, menenjit, akciğer absesi gibi ağır stafilokokal infeksiyonlarda hayat kurtarıcıdır(4). Glikopeptid grubundan olan ve tedavide kullanılan diğer ilaç da teikoplanindir.

## **2.2. Antibiyotik Direncinin Özellikleri**

Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç gelişimi, infeksiyon hastalıklarının tedavisinde başarısızlıklara neden olmaktadır. Direnç gelişiminde en önemli faktörler, antibiyotiklerin endikasyonları dışında yaygın bir şekilde, uygun olmayan doz ve sürelerde kullanımlarıdır. Bu ilaçların yetersiz doz ve sürede kullanılması, bakteri kolonizasyonunu arttırmakta ve dirençli suşların oluşumuna neden olmaktadır. Bir antibiyotiğe karşı direnç gelişmesi, aynı sınıftan diğer ilaçlarda da bu soruna yol açmakta ve çoklu direnç problemine yol açmaktadır.

### **2.2.1. Stafilokoklarda Glikopeptid Dışı Antibiyotiklere Direnç**

Stafilokoklarda bugüne kadar bilinen antibiyotik dirençleri şunlardır:

#### **2.2.1.a. Aminoglikozidlere Direnç**

İlaç molekülündeki amino grubunu asetilleyen asetiltransferazlar, hidroksil grubunu fosforile eden fosfotransferazlar veya hidroksil grubunu adenile eden nükleotidiltransferazlar aracılığıyla olur. (34)

#### **2.2.1.b. Kloramfenikol Direnci**

Stafilokoklar, kloramfenikol asetiltransferaz enzimini plazmid veya kromozom kontrolünde sentezleyerek ilacı asetile edip ribozomların 50S alt birimine bağlanmasına engel olur. (35)

#### **2.2.1.c. Makrolid, Linkozamid ve Streptogramin B (MLS<sub>B</sub>) Direnci**

Erm geni tarafından kodlanan metilaz enzimleriyle 23S RNA'nın değişikliğe uğratılarak MLS<sub>B</sub> grubu ilaçların ribozomlara bağlanmasının engellenmesi en önemli mekanizmadır (35). Bu ilaçların enzimatik olarak değiştirilmesi ve pompa mekanizması (msrA, mefA pompa sistemleri) ile bunlara geçirgenliğin azalması

şeklinde direnç de tanımlanmıştır. Bu son mekanizma daha çok *S. epidermidis*'te rastlanan, plazmid tarafından kodlanan, yapısal veya indüklenebilen bir direnç tipidir.(36).

#### **2.2.1.d. Tetrasiklin Direnci**

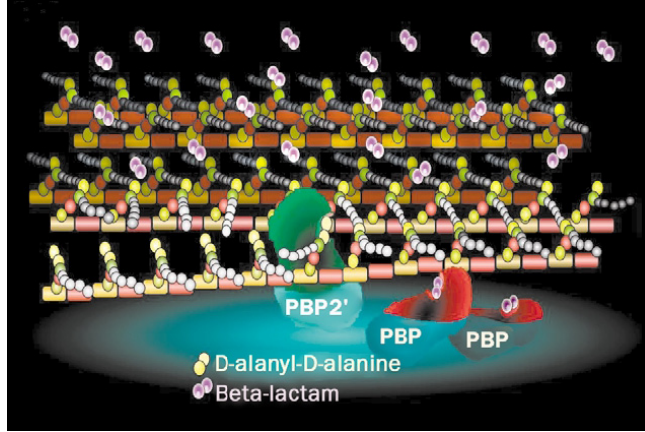
En önemli direnç mekanizması, ilacın dışarı pompalanmasıdır. Bu olay da plazmid, kromozom veya sıklıkla transpozonlarda bulunan tetrasiklin direnç geni (tet A-G, tet K,L) tarafından üretilen özgül bir membran proteinine bağlıdır. Bakteri, ilaçla ilk temas ettiğinde duyarlı olduğu halde temasın devam etmesi durumunda indüklenme sonucu enzim salgılanmasının artması nedeniyle çok kısa zamanda dirençli hale gelebilir (36–37).

#### **2.2.1.e. Kinolon Grubu Antibiyotiklere Direnç**

Kinolonlar, DNA giraz ve topoizomeraz IV ile etkileşime girerek DNA sentezini durdururlar. Stafilokoklar, asıl olarak topoizomeraz IV'ü etkilerler (38) .

#### **2.2.1.f. $\beta$ -Laktamlara Direnç**

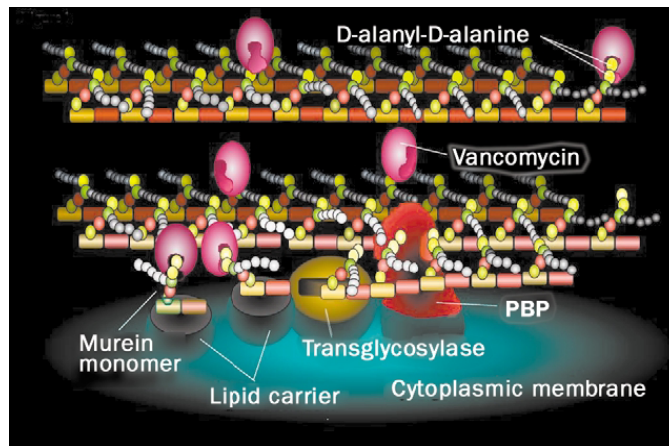
$\beta$ -laktamaz enzimine bağlıdır. Bu ilaçların  $\beta$ -laktam halkası hidrolize edilir. Bu enzimin 200'den fazla türü bilinmektedir. Genel olarak penisilinaz ve sefalosporinazlar olarak ikiye ayrılır (39). PBP, penisilin gibi  $\beta$ -laktam antibiyotiklerin hedefidir.  $\beta$ -laktam molekülü, yapısal analogu olduğu D-alanil-D-alanin bağlanma bölgelerinden stafilokokların PBP'lerine kovalent olarak bağlanır (Şekil 2). Bu da PBP'yi inaktive ederek peptidoglikan ağdan hücre rüptürüne sebep olup peptidoglikan sentezinin karşılıklı köprüler oluşturma aşamasını inhibe eder. Fakat, stafilokoklardan  $\beta$ -laktam grubuna direnç geliştirmiş bakteriler olan MRSA ve MRKNS, bu direnci çoğunlukla PBP2'(veya PBP2a) olarak dizayn edilmiş ve  $\beta$ -laktamlara bağlanma afinitesi çok düşük olan tek bir PBP sentezleyerek gerçekleştirirler (Şekil 2) (40–42). Sonuç olarak PBP2',  $\beta$ -laktamların varlığında da peptidoglikan sentezini devam ettirebilir. Bu tek PBP2' geni, lateral gen transferi yoluyla şu anda bilinmeyen bir bakteriden *S. aureus*'un aldığı, mobil bir genetik eleman tarafından taşınan ve mecA olarak adlandırılan eksojen bir SCC mec geni tarafından kodlanır (43).



Şekil 2  $\beta$ -laktamların etki mekanizması:  $\beta$ -laktam, D-alanil-D-alanin residülerinin yapısal analogudur. *S. aureus*'un PBP'lerini inaktive eder, fakat PBP 2'ye yüksek afiniteyle bağlanamaz. Bu yüzden MRSA,  $\beta$ -laktamların varlığında peptidoglikan sentezine devam edebilir. Halbuki MSSA bunu yapamaz. (22)

### 2.2.2. Stafilokoklarda Glikopeptid Direnci

Glikopeptid antibiyotikler, peptidoglikan sentezinin son aşamasını, yani hücre duvarı sentezini inhibe ederler. Glikopeptid paketi, yeni oluşan peptidoglikanla birleşmeye hazır mürein monomerin D-alanil-D-alanin rezidülerine bağlanarak D-alanil-D-alanin terminalini gizler. Kütleleri nedeniyle bağlı glikopeptidler glikoziltransferaz ve transpeptidaz aktivitelerini engeller, böylece peptidoglikan uzaması durur ve bakterinin hücre duvarı sentezi bozulur (44). (Şekil 3). Bu temel mekanizma dışında RNA sentezinin inhibisyonuyla plazma membran fonksiyonlarını ve hücre duvarında fosfolipid siklusunu bozarak bakterisidal etki de gösterirler. (1, 45).



Şekil 3. Vankomisin ve teikoplaninin etkisi. İlaç, mürein monomerin D-alanil-D-alanin rezidülerine bağlanır. Vankomisine bağlanmış mürein monomer, glikoziltransferaz için substrat olarak görev yapmaz.(22)

Glikopeptid antibiyotikler birbirine kimyasal yapı açısından çok yakın iki üyeden oluşur. Vankomisin gerçek bir glikopeptid iken, teikoplanin ise bir lipoglikopeptiddir. Her ikisi de antimikrobiyal aktivitelerini mürein monomerin D-alanil-D-alanin rezidülerine bağlanarak gösterirler (44). Glikopeptid molekülleri hedef moleküllere bağlanmak için 20 kadar peptidoglikan tabakayı geçmek zorundadırlar. Peptidoglikan tabakalarında çok fazla D-alanil-D-alanin hedefleri bulunduğundan, pek çok glikopeptid molekülü peptidoglikan tabakalarına takılır. Bu da, glikopeptidlerin terapötik etkilerindeki yetersizliğin bir nedenidir. Örneğin, hastadaki infekte dokuda çok sayıda *S. aureus* varsa pek çok glikopeptid molekülü bunların hücre duvarına adsorbe edilecek ve ilaçların buradaki konsantrasyonları terapötik eşik için gerekli olan miktardan daha düşük olacaktır. Bundan dolayı glikopeptid antibiyotiklere duyarlılığın doğru olarak tespit edilmesi diğer ilaçlarınkinden daha zordur.

#### 2.2.2.1. VISA, VRSA ve h-VISA

1980'lerden sonra stafilokoklarda artan oranlarda metisilin direnci görülmesiyle birlikte vankomisin ve teikoplanin, stafilokokların neden olduğu infeksiyonların tedavisinde sıklıkla kullanılır hale gelmiştir. Artmış oranlarda kullanım zaman içinde glikopeptid antibiyotiklere de direnç gelişebileceği korkusunu akla getirmiş, nitekim 1996'da Japonya'dan 'vankomisine duyarlılığı azalmış' suş Hiramatsu ve ark. tarafından bildirilmiştir (46). Vankomisin için MIC değeri 8 µg/ml olan bu suş Mu50 olarak adlandırılmış, vankomisine azalmış duyarlılığı olan stafilokoklar 'VISA' olarak tanımlanmaya başlanmıştır. Ardından 1997 yılında yine Hiramatsu ve ark. vankomisine yeni bir direnç tipi bildirmişlerdir. Mu3 adı verilen bu suşun vankomisin için MİK değerleri duyarlı sınırlar içinde olmasına rağmen topluluğun içindeki 1/10<sup>5-6</sup> bakterinin vankomisinin 4-9 µg/ml konsantrasyonlarında üreyebildiği, yani vankomisine orta derecede duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Bu suşlar da h-VISA olarak tanımlanmıştır (47). Klinik önemi tartışmalı olsa da h-VISA ile ilişkili vankomisin tedavisi başarısızlıkları bildirilmiştir. (47-49).

İlk VRSA (vancomycin-resistant *S. aureus*) suşu Temmuz 2002'de ABD'de, Michigan'dan bildirilmiştir. Diyabetik bir hastanın diyaliz kateterinin ucundan ve kronik ayak ülserinden izole edilmiş olup vankomisin MİK değeri >128 µg/ml olarak

bulunmuştur. Bu şuştaki direncin yüksek seviyeli ve van A orijnlı olduğu, suşun enterokokal vankomisin direnç genlerini kazandığı tespit edilmiştir. Nitekim aynı hastanın ayak ülserinden glikopeptid dirençli *E. faecalis* izolasyonu da yapılmıştır (50).

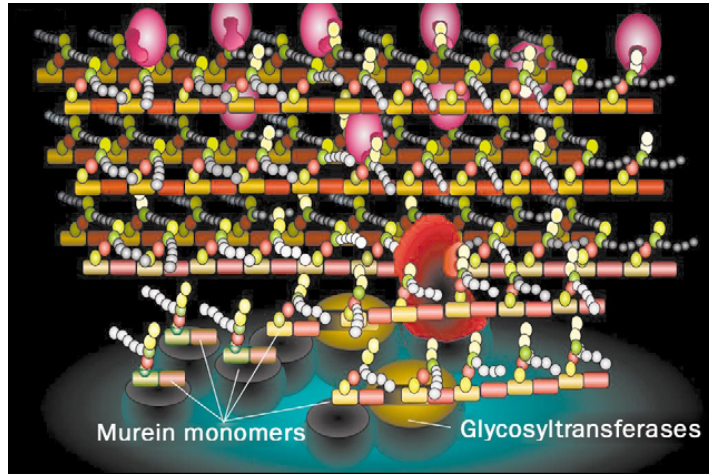
Vankomisin ve teikoplaninin her ikisi de antimikrobiyal aktivitelerini mürein monomerin D-alanil-D-alanin rezidülerine bağlanarak gösterirler. Bu yüzden, her iki antibiyotik için de ortak bir direnç mekanizması beklenir. Gerçekten de tüm VISA suşları teikoplanine de orta derecede direnç göstermişlerdir. (MIC değerleri >8 µg/ml bulunmuştur). VISA suşlarında (MIC 8–32 µg/ml) olduğu gibi hücre duvar kalınlığı da teikoplanin direncine katkıda bulunmuştur ve hücre duvar kalınlığı azaldığında direnç de azalmıştır. Bununla beraber, VISA suşlarından vankomisine duyarlı hale dönenlerin yaklaşık yarısında orta derecede teikoplanin direnci devam etmiştir (MIC 8–16 µg/ml). Bu bulgu, teikoplanin direnci için hücre duvar kalınlığından başka mekanizmaların rol oynayabileceği düşüncesini desteklemektedir.

Bu düşüncüyü destekleyen bir başka olay ise *S. aureus*'taki glikopeptid direncinin tarihi seyridir (51). *S. aureus*, vankomisinden önce teikoplanine direnç kazanmıştır (52–53). Ölçülen MIC değerlerine göre teikoplanine dirençli olduğu halde vankomisine halen duyarlı olan birkaç MRSA suşu bulunmuştur. Bununla beraber, teikoplanine direnç kazanılması, sıklıkla vankomisine dirençte hafif bir artışla beraberdir. Gerçekte, h-VISA suşları, bu gruba uymaktadır.

Shlaes ve ark., teikoplanine dirençli bir mutant *S. aureus* suşunda (MIC 16 µg/ml), aynı bakterinin ana klinik suşuna göre aşırı miktarda PBP2 sentezlendiğini tespit etmişlerdir (54). PBP2'nin aşırı üretimi, teikoplanine dirençli olan Mu50 ve Mu3'te de gözlenmiştir (55). Bir VSSA suşunda PBP2'nin deneysel olarak fazla miktarda üretilmesi, vankomisin MIC değerinde 1 µg/ml artış sağlarken (1 µg/ml'den 2 µg/ml'ye) teikoplanin değerleri anlamlı derecede yükselmiştir (2 µg/ml'den 8 µg/ml'ye) (55). Bu bulgu, iki glikopeptid arasındaki farka tekrar dikkatleri çekmektedir. Teikoplanin, vankomisine göre transpeptidasyon inhibisyonuna, vankomisin de transglikozilasyona daha meyilli olabilir.

İlk klinik VISA suşu olan Mu50 ile vankomisin direncinin mekanizması genişçe çalışılmıştır. (55). Mu50 suşunda yapılan biyokimyasal ve transmisyon

elektron mikroskopi (TEM) bulguları, bakterinin artmış miktarda peptidoglikan sentezlediğini göstermiştir. Hücre duvarında daha fazla mürein monomerleri ve tabakalar olabileceği düşünülmüştür. Bunların bir sonucu olarak daha fazla sayıda vankomisin molekülü peptidoglikan sentezinin meydana geldiği sitoplazmik membrana ulaşmadan peptidoglikan tabakalarına takılmaktadır. Bu yüzden Mu50'de artmış olan tüm mürein monomerlerini doyurmak için daha yüksek konsantrasyonlarda vankomisine ihtiyaç duyulacaktır (Şekil 4).



Şekil 4. Mu 50'nin hücre duvarı kalınlaşması. Mu 50'nin direnci, vankomisini yakalama mekanizması bulunan 30–40 tabaka peptidoglikandan oluşur. Var olan mürein monomerleri artar ve daha fazla monomer, yeni sentezlenmeye başlayan peptidoglikan zincirlerine eklenir. Tamamlanmış peptidoglikan tabakalarındaki D-alanil-D-alanin rezidüleri de artar. Bu tabakalarda daha fazla vankomisin molekülü tutulur ve sitoplazmik membrana ulaşması gerekenden daha az miktarda antibiyotik ulaşır (22).

Hücre duvarının kalınlaşması, şimdiye kadar değişik ülkelerden izole edilen tüm VISA klinik suşlarının direncinin temel mekanizmasıdır. TEM ile yapılan ölçümlerde 7 ülkeden izole edilen 16 VISA suşunun hücre duvarı kalınlığı vankomisine duyarlı olanlarınkinden anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bu suşlardan biri dışındakilerin ilaçsız kültür ortamlarında yapılan 10-84 günlük seri pasajlardan sonra da vankomisine dirençli alt gruplar içerdiği populasyon analiziyle belirlenmiştir. Bunların tamamında bu pasajlardan sonra VSSA'lerden ayırt edilemeyecek derecede hücre duvar kalınlığı azalmıştır. Bununla beraber vankomisinin tekrar kullanımıyla bu bakteriler hücre duvar kalınlıklarını arttırarak vankomisine tekrar dirençli hale gelmişlerdir. Test edilen bütün VISA suşlarında hücre duvarı kalınlaşmasıyla vankomisin direnci arasında iyi bir korelasyon bulunmuş, yapılan daha ileri çalışmalar da hücre duvarı kalınlaşmasının vankomisin direncine katkı sağlayan majör olay olduğunu ortaya koymuştur (56).



Teorik olarak hücre duvarı peptidoglikan tabakalarının kalınlaşması için 2 farklı yol vardır. Birisi, Mu50'de görüldüğü gibi aşırı miktarda peptidoglikan üretimidir. Diğeri ise peptidoglikan döngüsünün azalmasıdır. Yeni peptidoglikan tabakaları daima sitoplazmik membranın yüzeyinde üretilir. Bunlar, kendilerinden önce sentezlenmiş tabakaların yerine geçer ve en sonunda parçalanarak hücre yüzeyinden dışarıya atılırlar. Otolitik enzimler (peptidoglikanı hidrolize edenler) bu parçalama olayında rol oynarlar. Bu şekilde peşpeşe devam eden olayların sonucunda peptidoglikan tabakalarındaki D-alanil-D-alanin oranı artar. Gerçekten de Mu50'de bir ünite saflaştırılmış peptidoglikanda VSSA suşlarında bulunanın 2–4 katı D-alanil-D-alanin rezidüsü bulunmuştur (57). Bu şu anlama gelir: Hücre duvar kalınlığı 1,5 kat artmış olan bir Mu50 hücresi, MSSA'ya göre 3–6 kat daha fazla vankomisin molekülünü tutar. Yapılan bazı deneylerde peptidoglikan çapraz bağlarındaki azalma tek başına glikopeptid direncine sebep olmazken, bakteri kalınlaşmış hücre duvarına sahipse peptidoglikan çapraz bağlarındaki azalmanın direnç gelişimine katkı sağladığı gösterilmiştir (58). Özetle, hücre duvarının kalınlaşması, vankomisin direnci için bir ön şart olarak düşünülmüştür.

Ayrıca, amid grubu eklenmemiş mürein monomerinin normal olana nazaran vankomisine bağlanma afinitesinde azalma gözlenmiştir (57). Bu nedenle, anormal mürein monomerlerinin üretiminin de Mu50'nin vankomisin direncine katkıda bulunduğu ileri sürülmektedir (58).

Vankomisin direncinin genetik temeli henüz tam olarak açığa kavuşturulmuş değildir. Şu anda net olarak bilinen bir şey, *mecA* geni taşıyan SCCmec kromozomlarının vankomisin direnci için gerekli olmadığıdır. Mu50, Mu3 ve Japonya'dan izole edilen h-VISA suşlarından bu bölgelerin çıkarılması, vankomisin direncinin seviyesi ve paternini değiştirmemiştir (59). Son zamanlarda izole edilen vankomisin dirençli, metisilin duyarlı suş da, vankomisin direncinin MRSA ile sınırlı olmadığına dair yeni bir bilgi daha sağlamıştır (60).

#### **2.2.2.1.a. Hetero-VISA'nın Klinik ve Biyolojik Anlamı**

h-VISA suşlarının klinik önemi halen tartışmalıdır. h-VISA'nın bulunması, MRSA infeksiyonlarına karşı vankomisinin terapötik etkisi potansiyelinde azalmanın anlamlı bir göstergesi olabilir (22). Fakat h-VISA'nın klinik anlamını

değerlendirmek zordur. Çünkü hem h-VISA'nın bildirildiği çok az sayıda vaka bulunmaktadır, hem de mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulanan rutin duyarlılık testleriyle h-VISA tespit edilememektedir. Bu olayın araştırılması için daha yoğun bir şekilde kontrollü klinik çalışmaların yapılması gerekmektedir. Mikrodilüsyon ve disk difüzyon gibi rutin duyarlılık testleri VSSA ve h-VISA ayırımını tam olarak ortaya koyamamaktadır. (61). Mikrodilüsyon yöntemi ile vankomisin için duyarlı olarak değerlendirilen MİK düzeyleri tespit edilen bazı *S. aureus* suşları,  $10^{-6}$  veya daha fazla oranda VISA içerebilirler (62). Bu suşlar, Mu3 ile ifade edilir. Mu3 vankomisine orta derecede dirençli (MIC  $\geq 8$   $\mu\text{g/ml}$ ) hücreler de bulunduran heterojenöz bir hücre popülasyonuna sahiptir. Bundan dolayı h-VISA olarak adlandırılmıştır (31). Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standartlarına göre yapılan mikrodilüsyon ve disk difüzyon gibi standart konvansiyonel metotlarda  $5 \times 10^5$  cfu /ml gibi düşük inokülüm dansitesi kullanıldığı için bu testlerle tüm popülasyonun  $1/10^{5-6}$ 'sını içeren h-VISA alt gruplarını tespit etmek güç iken  $10^{7-9}$ CFU bakteriyi analiz eden popülasyon analizi h-VISA tespiti için standart metod olarak kabul edilmektedir (63). Çünkü h-VISA'nın VISA için prekürsör olduğu (64) ve vankomisin tedavisine klinik yanıtızsızlıktan sorumlu bu suşların (65) sağlık çalışanlarının elleri ile klonal yayılımı bildirilmiştir (66). Bu nedenle antibiyotik dirençleri takip edilirken heterojen direnç, sadece hastaya uygulanan tedavinin etkinliğini ölçmek için değil, aynı zamanda ortaya çıkan direnç eğilimlerini belirlemek için de önemlidir ve bu olayın konvansiyonel duyarlılık testleri ile tespit edilememesi, klinik ve epidemiyolojik bir bakış açısıyla bakıldığında ihmal edilmesi için yeterli neden değildir

Konuya biyolojik açıdan bakıldığında; h-VISA durumu, *S. aureus*'un vankomisin basıncına karşı hayatta kalmasını sağlayan başarılı bir ekolojik kazanç gibi görünmektedir. Vankomisin, h-VISA popülasyonunun %99.9'unu baskılasa da kalan popülasyon 4  $\mu\text{g/ml}$  vankomisin konsantrasyonunda yaşamaya ve üremeye devam eder. İnfekte dokuların çoğunda daha yüksek konsantrasyonda vankomisin bulunur. Bazı bakteri alt grupları 9  $\mu\text{g/ml}$  vankomisin konsantrasyonunda bile üreyebilirler. Bu VISA bakterileri, vankomisin basıncına karşı hayatta kalmalarını sağlayan hücre duvarı kalınlaştırılması için daha fazla enerji harcarlar. Vankomisin basıncı ortadan kaldırıldığında ise VISA'lar, enerji depolamak için h-VISA

durumuna geçerler. *S aureus*, başarılı bir insan paraziti olarak hüküm sürmek için etkili bir hayatta kalma mekanizmasını seçmiş gibi görünmektedir (22).

#### **2.2.2.1.b. VISA İnfeksiyonunun Tedavisi:**

VISA ile oluşan infeksiyonlarda tedavi seçenekleri konusunda da yeterli veri henüz yoktur. Birçok köken kotrimoksazole ve tetrasiklinlere duyarlıdır. Vankomisin bakterisidal aktivitesini arttıracak tek bir ilaç yoksa da uygulanabilecek birkaç tane kombinasyon tedavisi bulunmaktadır. Bazı hayvan çalışmalarında VISA infeksiyonlarının tedavisinde nafsilin ve vankomisin kombinasyonunun sinerjik etkisi ile başarılı olduğu gösterilmiştir. Benzer sinerjik etkiler vankomisin ve  $\beta$ -laktam antibiyotikler arasında da saptanmıştır (67). Bu bakterilerle oluşan infeksiyonların henüz çok yaygın olmaması nedeniyle kinupristin-dalfopristin ve linezolidin etkinliği konusunda çok fazla bilgi yoktur. Bir çalışmada her iki ilacın üç VISA kökenine de in vitro olarak çok aktif oldukları bulunmuşsa da, bir klinik izolat kinupristin-dalfopristine dirençli olarak saptanmıştır (68). Şimdiye kadar izole tüm VISA kökenleri in vitro olarak linezolide duyarlı bulunmuşlardır. Linezolid, h-VISA ve VISA'da ampisilin/sulbaktamla kombine edildiğinde sinerjistik veya aditif etki göstermektedir (69). Linezolidin tedavide kullanıldığı 2 hasta vardır. Bunlardan birinde tek ilaç olarak uygulanmış, diğerinde ise trimetoprim-sulfametoksazol ve doksisisiklin ile kombine edilerek verilmiştir. Her iki olguda da mikrobiyolojik başarı sağlansa da, sadece biri yaşamıştır (68, 70–72). Ayrıca vankomisin, fusidik asit ve kloramfenikol, vankomisin, rifampisin ve kotrimoksazolden oluşan 3'lü tedavi gibi çeşitli kombinasyonların tedavide başarılı olduğunu bildiren yayınlar da bulunmaktadır. (22, 73–75). Kinolon grubundan yeni bir antibiyotik olan DU-6859a, levofloksasin, siprofloksasin, sparfloksasin ve tosufloksasine dirençli olan Mu3 ve Mu50'ye karşı 0.5 ve 1  $\mu\text{g/ml}$  MIC değerine sahiptir (76).

**2.2.2.1.b. İnfeksiyon kontrol ölçütleri;** Center For Disease Control and Prevention (CDC), vankomisine azalmış duyarlılık gösteren stafilokokal infeksiyonlarının kontrolü için, glikopeptidlere tam direnç gelişimine karşı özel bir rehber geliştirmiştir. Öneriler, glikopeptid direncinden ziyade vankomisin direncine gönderme yapar. Çünkü, teikoplanin ABD'de yoktur (77). Ayrıca bu rehberler

KNS'lerde glikopeptid direncini de kapsar. Bu rehberlerin temel bileşenleri şunlardır:

1. Glikopeptidleri de kapsayan bütün antimikrobiyal ajanların ihtiyatlı kullanımıyla glikopeptid dirençli stafilokokların oluşumunu önleme.
2. Stafilokokların laboratuvarında doğru identifikasyonu, glikopeptid dirençli stafilokokların ortaya çıkması için uygun (MİK'e dayalı) duyarlılık test metodlarının kullanılması.
3. Glikopeptid-dirençli stafilokoklara bağlı infeksiyonların tedavisi için yeni antistafilokokal ajanların uygun kullanımlarını gözönüne alarak klinik önerilere erişim.
4. Toplum sağlığı otoriteleriyle bağlantılı olarak infeksiyon kontrol takımları tarafından tam vaktinde ve uygun uyarılarla glikopeptid dirençli stafilokokun yayılımını engelleme (78).

VISA direnç mekanizmasının yapısı-hücre duvarı peptidoglikanının fazla miktarda yapılması ve birikimi-glikopeptid selektif basıncının çok güçlü olmadığı bir ortamda bunun yaygın olarak ortaya çıkmayacağını göstermektedir. Eğer bir hastane glikopeptid kullanımını kısıtlarsa VISA'nın yaygın hale gelmeyeceği düşünülmektedir. Fakat bu durum da problemi tam olarak çözememektedir. Çünkü h-VISA, glikopeptid basıncı olmadan da yayılma kapasitesine sahiptir. Bu yüzden antibiyotik kullanımının  $\beta$ -laktam laktam antibiyotikleri de içerecek şekilde genişletilmesi gerekmektedir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Bakteri Suşları

Çalışmamızda Nisan 2007-Nisan 2008 tarihleri arasında Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilmiş çeşitli örneklerden izole edilmiş 60'ar adet MRSA, MSSA, MRKNS ve MSKNS suşu, gelen örnek ve gönderen klinik ayırt edilmeksizin rastgele olarak seçilmiştir. Bakteri gruplarının gönderildiği klinikler ve izole edildikleri örnekler sırasıyla Tablo 1 ve 2'de gösterilmiştir. Bunlara vankomisin agar tarama, vankomisin ile teikoplanin mikrodilüsyon ve standart E testleri uygulanmıştır. Vankomisin tarama agarda üreyen *S. aureus* suşları VISA ve h-VISA yönünden değerlendirmeye alınmıştır.

Tablo 1: Bakteri gruplarının gönderildiği kliniklere göre dağılımı

|      | MRSA<br>n=60 | MSSA<br>n=60 | MRKNS<br>n=60 | MSKNS<br>n=60 | Toplam<br>n=240 |
|------|--------------|--------------|---------------|---------------|-----------------|
| GH   | 3            | 2            | 4             | 3             | 12              |
| Ped  | 4            | 4            | 9             | 9             | 26              |
| YBÜ  | 20           | 4            | 15            | 7             | 46              |
| İç H | 1            | 12           | 10            | 11            | 34              |
| GC   | 2            | 3            | 5             | 3             | 13              |
| Nrş  | 5            | 1            | 1             | 2             | 9               |
| Nör  | 5            | 3            | 6             | 9             | 23              |
| Pls  | 6            | 1            | 1             | -             | 8               |
| KVC  | -            | 1            | 2             | 2             | 5               |
| Krd  | -            | 1            | 1             | 3             | 5               |
| KD   | -            | 3            | 1             | 1             | 5               |
| Onk  | 2            | 2            | 4             | -             | 8               |
| Üro  | -            | 1            | 1             | 2             | 4               |
| Ort  | 10           | 9            | -             | 4             | 23              |
| Acil | 2            | 3            | -             | 1             | 6               |
| FTR  | -            | -            | -             | 1             | 1               |
| KBB  | -            | 4            | -             | 1             | 5               |
| Derm | -            | 4            | -             | 1             | 5               |
| Göz  | -            | 2            | -             | -             | 2               |

GH: Göğüs Hastalıkları, Ped: Pediatri, YBÜ: Yoğun Bakım Ünitesi, İç H: İç Hastalıkları, GC: Genel Cerrahi, Nrş: Nöroşirurji, Nör: Nöroloji, Pls: Plastik Cerrahi, KVC: Kardiyovasküler Cerrahi, Krd: Kardiyoloji, KD: Kadın Hastalıkları ve Doğum, Onk: Onkoloji, Üro: Üroloji. FTR: Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon, KBB: Kulak Burun ve Boğaz Hastalıkları, Acil: Acil servis, Derm: Dermatoloji, Göz: Göz Hastalıkları, Ort: Ortopedi.

Bakterilerin izole edildiği örneklerin en fazla sayıda gönderildiği klinik 46 adetle YBÜ olmuştur. Aynı zamanda gönderilen örneklerden MRSA ve MRKNS'nin

en fazla izole edildiği klinik olmuştur (sırasıyla 20 ve 15 adet). Bu kliniği 34 örnekle iç hastalıkları, 26 örnekle pediatri ve 23'er örnekle de nöroloji ve ortopedi klinikleri izlemiştir. Bu 5 anabilim dalından gönderilen materyaller, toplam sayının % 63.3'üne denk gelmektedir.

Tablo 2: Bakteri gruplarının izole edildiği örneklere göre dağılımı

|         | MRSA n=60 | MSSA n=60 | MRKNS n=60 | MSKNS n=60 | Toplam n=240 |
|---------|-----------|-----------|------------|------------|--------------|
| İdrar   | 4         | 9         | 9          | 11         | 33           |
| Kan     | 20        | 13        | 47         | 34         | 114          |
| Yara    | 18        | 28        | 4          | 9          | 59           |
| SVS     | 4         | 1         | -          | 2          | 7            |
| Kateter | 1         | 1         | -          | 4          | 6            |
| Balgam  | 1         | 5         | -          | -          | 6            |
| Tr. Asp | 12        | 2         | -          | -          | 14           |
| Vajen   | -         | 1         | -          | -          | 1            |

SVS: Steril vücut sıvıları

Çalışmamızda kullandığımız stafilocokların en fazla izole edildiği örnekler sırasıyla kan, yara ve idrar kültürleri olmuştur. Bakterilerin % 85.8'i (toplam 206 adet) bu 3 örnekten izole edilmiştir. MSSA, MRKNS ve MSKNS grupları, sıralamalar değişmekle beraber en fazla bu 3 örnekten izole edilmiştir. Ancak MRSA grubunda kan ve yaradan sonra bakterilerin en fazla izole edildiği örnek trakeal aspirat olmuştur.

### 3.2. Mikrobiyolojik kültür ve identifikasyon işlemleri

Laboratuara gönderilen örneklerden yapılan kültürlerde üreyen stafilocok şüpheli kolonilerden öncelikle Gram boyası yapılmıştır. Gram boyamada üzüm salkımı şeklinde kümeler oluşturmuş Gram pozitif koklar lama yayılarak üzerlerine % 3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damlatılarak gaz kabarcığı oluşturan bakteriler stafilocok olarak kabul edilmiş, *S. aureus*'u diğer stafilocoklardan ayırmak için tüp koagülaz testi uygulanmıştır. Stafilocok suşu olduğuna karar verilen Gram pozitif, katalaz pozitif kolonilerden alınıp tavşan plazmasına eklenerek etüve kaldırılıp inkübasyona tabi tutulmuş, 24 saatlik inkübasyondan sonra pıhtı oluşturan bakteriler *S. aureus*, diğerleri KNS olarak kabul edilmiştir. Elde edilen suşlar belli bir sayıya ulaşıncaya kadar gliserollü LB sıvı besiyerinde -80 °C'de saklanmış, sayı tamamlandığında suşlar çıkarılarak kanlı besiyerine tekrar ekim yapıp canlandırılmaları sağlanmıştır.

Bu suşların metisilin duyarlılığını tespit etmek için CLSI'nin önerilerine göre disk difüzyon yöntemiyle sefoksitin diski (30 µg) kullanılmıştır. (79). Saf kolonilerden sıvı besiyerinde 0,5 McFarland standart bulanıklığında bakteri solüsyonu hazırlanarak Mueller-Hinton besiyerine ekim yapılarak üzerine 30 µg sefoksitin diski yerleştirilip 35 °C'de 24 saat normal atmosfer şartlarında inkübe edilmiştir. Sefoksitin diski çevresindeki inhibisyon zonu  $\leq 21$  mm. olan *S. aureus*'lar dirençli,  $\geq 22$  mm. olanlar duyarlı;  $\leq 24$  mm. olan KNS'ler dirençli,  $\geq 25$  mm. olanlar duyarlı kabul edilmiştir.

### 3.3. Vankomisin Agar Tarama

Kanlı agarda bir gece bekletilmiş taze kolonilerden alınan ve 0,5 McFarland bulanıklığına ayarlanmış bakterilerden 10 µl'lik süspansiyon 4 µg/ml vankomisin içeren beyin-kalp infüzyon (BHI) agara ekilerek 24. ve 48. saatlerde büyüteçle incelenerek üreme olup olmadığı araştırılmıştır. Aynı bakteriler 6 µg/ml vankomisin içeren besiyerine de ekilerek 2 farklı konsantrasyonda agar tarama plağında değerlendirilmiştir. Bu besiyerlerinde üreyen *S. aureus* suşları VISA ve h-VISA yönünden araştırılmış, şüpheli VISA ya da h-VISA olarak değerlendirilen suşlar 9 gün süreyle vankomisin içermeyen besiyerinde bekletildikten sonra diğer incelemeler yapılmıştır.

### 3.4. Standart E Test

Kanlı agar besiyerinde bir gece bekletilmiş kolonilerden Mueller-Hinton broth içine 0,5 McFarland yoğunlukta bakteri konulduktan sonra bu süspansiyondan 200 µl. alınarak BHI agar besiyerine yüzeyel ekim yapılmıştır. Yaklaşık 10 dakikalık kuruma süresinin ardından vankomisin ve teikoplanin (0,016–256) E test stripleri yerleştirilerek 35 °C'de 24 saat inkübe edilmiş ve MIC değerleri belirlenmiştir.

### 3.5. Mikrodilüsyon

Kanlı agar besiyerinde bir gece bekletilmiş kolonilerden Mueller-Hinton broth içine 0,5 McFarland yoğunlukta bakteri solüsyonu elde edilmiştir. Mueller-Hinton brotta vankomisin ve teikoplaninin 256 µg/ml'lik solüsyonları hazırlanmıştır. Mikrodilüsyon için U tabanlı plate'ler kullanılmıştır. Mikrodilüsyon şu şekilde yapılmıştır:

1. Mikroplağın 1'den 12'ye kadar olan yatay kuyucuklarına 100'er µl. Mueller-Hinton broth eklenmiştir.

2. Her bir antibiyotik için hazırlanan çözeltiden 100 µl. alınarak ilk kuyucuklara konulmuştur. Birinci kuyucuklardan 100 µl. alınıp ikincilere, oradan aynı miktar alınıp üçüncülere ve bu şekilde 11. kuyucuğa kadar dilüsyonlar yapılmıştır. 12. kuyucuk pozitif kontrol olarak kullanılmış ve buna antibiyotik eklenmemiştir. Böylece ilk 10 kuyucuğa vankomisin ve teikoplaninin 0,25–128 µg/ml'lik konsantrasyonları eklenmiştir.

3. Daha önceden hazırlanmış olan  $10^7$  CFU/ml. bakteri süspansiyonlarından 100'er µl alınıp 11. kuyucuk hariç tüm kuyucuklara ilave edilmiştir. 11. kuyucuk negatif kontrol olarak kabul edilip bakteri eklenmemiştir.

4. Mikroplağın üzeri steril bir plakla kapatıldıktan sonra 35 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir.

5. Her bir suşa ait üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon MİK olarak değerlendirilmiştir.

Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) kriterlerine göre vankomisin MİK değeri *S. aureus*'ta  $\leq 2$  µg/ml olanlar duyarlı, 4–8 µg/ml olanlar orta derecede duyarlı,  $\geq 16$  µg/ml olanlar da dirençli; KNS'ler için  $\leq 4$  µg/ml olanlar duyarlı, 8–16 µg/ml olanlar orta derecede duyarlı,  $\geq 32$  µg/ml olanlar da dirençli kabul edilmiştir. Teikoplanin için ise  $\leq 8$  µg/ml olanlar duyarlı, 16 µg/ml olanlar orta derecede duyarlı,  $\geq 32$  µg/ml olanlar da dirençli olarak değerlendirilmiştir (79).

Mikrodilüsyon ve E testleri ile yapılan MİK değeri belirlenmesinden sonra tarama agarda üreyen ve üremeyen *S. aureus* ve KNS'lerde ayrı ayrı olarak metisiline duyarlı suşlarla dirençli suşlar arasında MİK değeri yönünden anlamlı bir farkın olup olmadığı istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

### 3.6. Populasyon Analiz Profili-Eğri Altında Kalan Alan (PAP-AUC) Oranı

Bu oran daha önceden Wootton ve arkadaşlarının tanımladığı şekilde belirlenmiş (80) ve bu yöntem, VISA ve h-VISA suşlarının belirlenmesinde altın standart olarak kabul edilmiştir. Vankomisin tarama agarda üreyen *S. aureus* kolonileri 24 saat 37 °C'de beyin-kalp infüzyon sıvı besiyerinde inkübe edilmiştir.



Buradan alınan 0,5 McFarland yoğunluğundaki bakteri süspansiyonu 1 µg/ml ile 16 µg/ml vankomisin içeren BHI agara ekilmiştir. 37 °C'de 48 saat inkübasyon sonrası oluşan koloniler sayılmış ve bunlara karşılık gelen vankomisin konsantrasyonları grafik üzerinde çizilmiştir. Ardından, vankomisin konsantrasyonlarına uygun koloni sayılarının logaritmik grafiği yapılarak her suş için eğri altında kalan alan hesaplanmıştır. Kontrol suşları olarak Mu3, Mu50 ve ATCC 25923 (*S. aureus subs. aureus*) kullanılmıştır. Daha sonra her bir suşun PAP-AUC değeri Mu3 kontrol suşunun PAP-AUC değerine oranlanmıştır. Bu işlem sonucunda  $\leq 0,90$  bulunanlar VSSA, 0,90–1,3 arasındakiler h-VISA ve  $\geq 1,3$  olanlar da VISA olarak kabul edilmiştir (81).

#### 4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen izolatlardan 22 adet MRKNS, 17 adet MSKNS ve 2 adet de MRSA 4µg/ml vankomisin içeren BHI agarda 24. saatte üremiştir. MSSA grubu bakterilerden hiçbiri bu besiyerinde ürememiştir. Çalışılan bakteri gruplarından hiçbirinde 48. saatte üreme gözlenmemiştir. Aynı bakteriler 6 µg/ml vankomisin içeren BHI agara da ekilmiş ve 4 µg/ml vankomisin içeren BHI agarda üreyen 41 izolatın 38'inin bu besiyerinde de ürediği tespit edilmiştir. 4 µg/ml vankomisin içeren BHI agarda üreyen 2 MSKNS ve 1 MRKNS izolatı ise 6 µg/ml vankomisin içeren BHI agarda ürememiştir. Vankomisin tarama agarda üreyen bakterilerin mikrodilüsyon ve E test yöntemi ile belirlenmiş MİK değerleri tablo 3'te gösterilmiştir. 4 µg/ml'lik tarama agarda üreyip 6 µg/ml'lik agarda üremeyen 3 bakterinin vankomisin MİK değerleri E test ve mikrodilüsyon yöntemleriyle duyarlı olarak kabul edilen 4 µg/ml olarak belirlendiğinden ve CLSI tarafından da tarama agar olarak 6 µg/ml vankomisinli agar önerildiğinden bu bakteriler de tarama agarda üremeyenler grubuna dahil edilmiştir.

Tablo 3: Tarama agarda üreyen bakterilerin vankomisin ve teikoplanin MİK değerlerine göre dağılımı

| Yöntem             | E-test     |       |             |       |     | Mikrodilüsyon |    |             |    |     |
|--------------------|------------|-------|-------------|-------|-----|---------------|----|-------------|----|-----|
|                    | Vankomisin |       | Teikoplanin |       |     | Vankomisin    |    | Teikoplanin |    |     |
| MİK değeri (µg/ml) | 6-8        | 12-16 | ≤8          | 12-24 | ≥32 | 8             | 16 | ≤8          | 16 | ≥32 |
| MRSA n=2           | 2          | -     | -           | 2     | -   | 2             | -  | -           | 2  | -   |
| MRKNS n=21         | 16         | 5     | 6           | 9     | 6   | 16            | 5  | 6           | 7  | 8   |
| MSKNS n=15         | 12         | 3     | 11          | 3     | 1   | 12            | 3  | 11          | 2  | 2   |
| Toplam n=38        | 30         | 8     | 17          | 14    | 7   | 30            | 8  | 17          | 11 | 10  |

Vankomisin agar tarama besiyerinde üreme gözlenen suşların hepsinde E-test ve mikrodilüsyon yöntemi ile vankomisin için orta derecede duyarlı sınırlarda MİK değerleri tespit edilmiştir. Diğer taraftan bu suşların teikoplanin için tespit edilen MİK değerleri değerlendirildiğinde, vankomisin agar tarama besiyerinde üreme gözlenen 21 MRKNS'nin 6'sında, 15 MSKNS'nin de 11'inde E-test ve mikrodilüsyon yöntemi ile duyarlı sınırlarda MİK değerleri tespit edilmiştir. Ayrıca tarama agarda üremiş olan MRKNS'lerin teikoplanin için E test yöntemi ile 9'u orta derecede duyarlı sınırlarda, 6'sı dirençli sınırda MİK değeri gösterirken

mikrodilüsyon yöntemi ile 7'si orta derecede duyarlı, 8'i dirençli MİK değerlerine sahip olarak tespit edilmiştir. Ek olarak MSKNS'lerin de E test yöntemi ile 3'ü orta derecede duyarlı sınırlarda, 1'i dirençli sınırdaki MİK değeri gösterirken mikrodilüsyon yöntemi ile 2'si orta derecede duyarlı, 2'si dirençli MİK değerlerine sahip olarak tespit edilmiştir. Kısacası, vankomisin agar tarama besiyerinde üreme gösteren stafilocok suşlarının vankomisin için MİK değerleri E-test ve mikrodilüsyon yöntemi ile uyumlu bulunurken, bu suşların mikrodilüsyon ve E-test yöntemi ile teikoplanin için tespit edilen MİK değeri sınırlarında farklılıklar gözlemlendiği tespit edilmiştir.

Bunların dışında kalan bakterilere de MİK değerlerini belirlemek için aynı testler uygulanmıştır. Daha önce de belirtildiği gibi MSSA grubu bakterilerin hiçbiri tarama agarda ürememiştir. Tarama agarda üremeyen bakterilerin MİK değerleri de Tablo 4'te sunulmuştur.

Tablo 4: Tarama agarda üremeyen bakterilerin E-test ve mikrodilüsyon yöntemiyle vankomisin ve teikoplanin MİK değerlerine göre dağılımı.

| Yöntem              | E-test     |     |             |     |       | Mikrodilüsyon |    |             |     |    |
|---------------------|------------|-----|-------------|-----|-------|---------------|----|-------------|-----|----|
|                     | Vankomisin |     | Teikoplanin |     |       | Vankomisin    |    | Teikoplanin |     |    |
| MİK değeri ( µg/ml) | 1-2        | 3-4 | 0.19-2      | 3-8 | 12-16 | 1-2           | 4  | 0.25-2      | 4-8 | 16 |
| MRSA n=58           | 16         | 42  | 9           | 42  | 7     | 16            | 42 | 9           | 42  | 7  |
| MSSA n=60           | 45         | 15  | 57          | 3   | -     | 45            | 15 | 57          | 3   | -  |
| MRKNS n=39          | 8          | 31  | 16          | 23  | -     | 8             | 31 | 16          | 23  | -  |
| MSKNS n=45          | 37         | 8   | 40          | 3   | 2-    | 37            | 8  | 40          | 5   | -  |
| Toplam n=199        | 106        | 93  | 122         | 70  | 7     | 106           | 93 | 122         | 70  | 7  |

Vankomisin agar tarama besiyerinde üreme göstermeyen 58 MRSA suşunun 42'sinin, 60 MSSA suşunun da 15'inin E-test ve mikrodilüsyon yöntemleri ile vankomisin için MİK değerlerinin orta derecede duyarlılık sınırlarında olduğu tespit edilmiştir. Vankomisin agar tarama besiyerinde üreme gözlenmeyen suşların 7 MRSA suşu hariç hepsinde E-test ve mikrodilüsyon yöntemi ile teikoplanin için de duyarlı sınırlarda MİK düzeyleri tespit edilmiştir. Metisiline duyarlılık durumlarına göre karşılaştırıldığında ise metisilin direnci gözlenen suşlarda duyarlı gruplara göre MİK düzeylerinin daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ayrıca bu grupta mikrodilüsyon ve E-test yöntemleri ile tespit edilen değerler birbiri ile uyumlu bulunmuştur.

Metisiline duyarlı bakterilerle dirençliler arasında glikopeptid MİK değerlerini karşılaştırmak için vankomisin tarama agarda üreyen bakterilerle üremeyen

bakterilerin  $MİK_{50}$  ve  $MİK_{90}$  değerleri ayrı ayrı hesaplanarak karşılaştırılmıştır. Tarama agarda üreyen ve üremeyen bakterilerin  $MİK_{50}$  ve  $MİK_{90}$  değerleri de Tablo 5 ve 6'da sunulmuştur.

Tablo 5: Vankomisin 6  $\mu\text{g/ml}$ 'lik tarama agarda üreyen stafilocokların  $MİK_{50}$  ve  $MİK_{90}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) değerlerine göre dağılımı

|            | Vankomisin |            | Teikoplanin |            |
|------------|------------|------------|-------------|------------|
|            | $MİK_{50}$ | $MİK_{90}$ | $MİK_{50}$  | $MİK_{90}$ |
| MRSA n=2   | 6          | 8          | 16          | 16         |
| MRKNS n=21 | 6          | 12         | 16          | 32         |
| MSKNS n=15 | 8          | 12         | 12          | 24         |

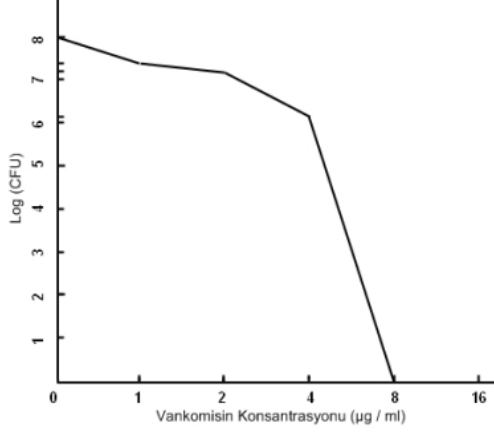
Daha önceden de belirtildiği gibi MSSA grubundan hiçbir bakteri bu tarama agarda ürememiştir. KNS grubunun değerlerine bakıldığında da metisiline dirençli olanlarda duyarlılardan daha yüksek veya en azından eşit değerlerin bulunduğu gözlenmektedir.

Tablo 6: Vankomisin 6  $\mu\text{g/ml}$ 'lik tarama agarda üremeyen stafilocokların  $MİK_{50}$  ve  $MİK_{90}$  ( $\mu\text{g/ml}$ ) değerlerine göre dağılımı.

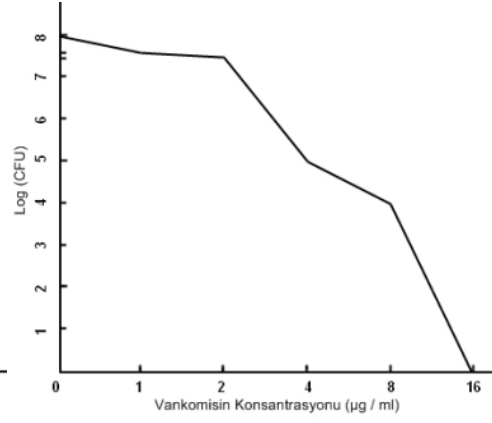
|            | Vankomisin |            | Teikoplanin |            |
|------------|------------|------------|-------------|------------|
|            | $MİK_{50}$ | $MİK_{90}$ | $MİK_{50}$  | $MİK_{90}$ |
| MRSA n=58  | 3          | 4          | 4           | 12         |
| MSSA n=60  | 2          | 3          | 1           | 1.5        |
| MRKNS n=39 | 3          | 4          | 4           | 8          |
| MSKNS n=45 | 2          | 3          | 1           | 3          |

Tarama agarda üremeyen stafilocoklar incelendiğinde S. aureus grubunda da, KNS grubunda da metisiline dirençli olanlarda duyarlı olanlara göre daha yüksek  $MİK_{50}$  ve  $MİK_{90}$  değerleri gözlenmiştir.

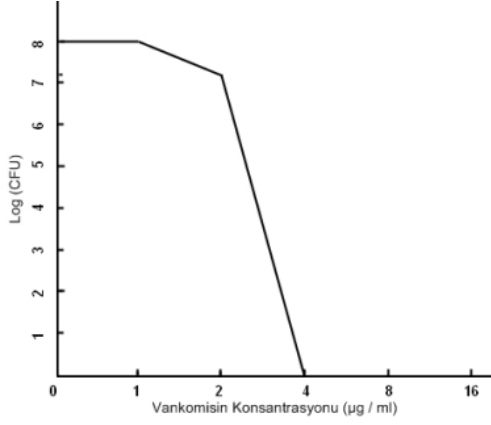
Vankomisin tarama agarda üreyen 2 MRSA izolatına uygulanan populasyon analizi sonucunda bu bakterilerin eğri altındaki alanlarının  $Mu_3$  şuşununkine oranı 1. bakteri için (427) 1.01, ikinci bakteri (575) için ise 1.05 olarak belirlenmiş olup bu bakterilerin h-VISA olduklarına karar verilmiştir. Populasyon analizi yapılan bakterilerin PAP-AUC alan grafikleri aşağıda gösterilmiştir



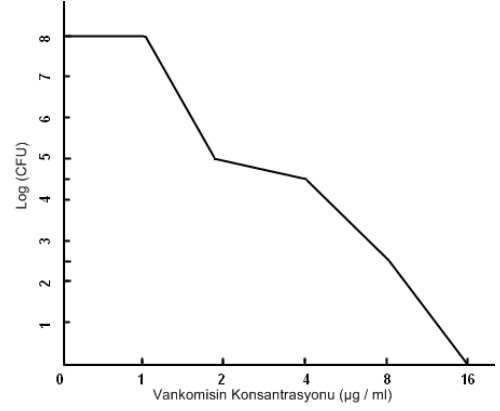
Grafik 1: Bakteri 1'in (427) PAP-AUC alan grafiği.



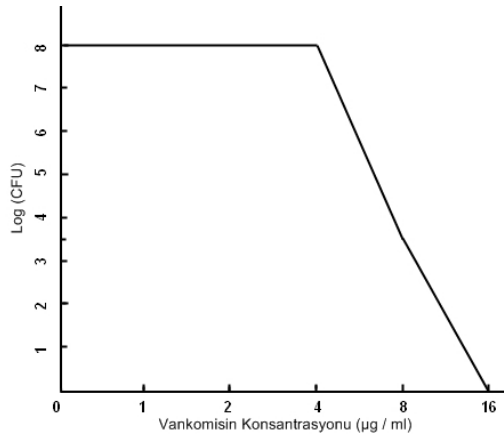
Grafik 2: Bakteri 2'nin (575) PAP-AUC alan grafiği.



Grafik 3: Standart stafilokok suşunun (ATCC 25923) PAP-AUC alan grafiği.



Grafik 4: Mu 3 suşunun (h-VISA) PAP-AUC alan grafiği



Grafik 5: Mu 50 suşunun (VISA) PAP-AUC alan grafiği.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tıp dünyasında sağlanan gelişmeler sonucu, bir taraftan insanoğlunun yaşam kalitesi artıp yaşam süresi uzarken, diğer taraftan tanı ve tedavi amacıyla uygulanan girişimler, yoğun antibiyotik kullanımı gibi faktörlerin faturası karşımıza "hastane infeksiyonları" ve "antibiyotiklere dirençli bakteriler" olarak çıkmaktadır.

Son zamanlarda hem toplum, hem de hastane kaynaklı *S. aureus* infeksiyonları sürekli artmakta ve aynı zamanda bu bakterilerdeki çoklu ilaç direnci nedeniyle oluşturdukları hastalıkların tedavisi giderek güçleşmektedir. Birçok araştırmada *S. aureus*'un nozokomiyal pnömoni ve cerrahi alan infeksiyonlarının en sık, kan ile ilişkili infeksiyonların ise ikinci sıklıkta etkeni olduğu gösterilmiştir (18). Bu sık görülen stafilokoksik infeksiyonların tedavisi amacıyla penisilinler geliştirilmiş, ancak kısa süre sonra *S. aureus* kökenlerinde yüksek düzey penisilin direnci ortaya çıkmıştır. (82). Ardından klinik kullanıma sunulan antistafilokoksik penisilinlere (metisilin, nafsilin, oksasilin), makrolidlere, tetrasiklinlere ve aminoglikozidlere de direnç gelişmesi ve bu dirençli kökenlerin yayılmasıyla birlikte stafilokoksik infeksiyonların tedavisi tüm dünyada önemli bir sorun haline gelmiştir. CDC verilerine göre 1987–1997 arasında yoğun bakım ünitelerinde ortaya çıkan stafilokok infeksiyonları içinde MRSA infeksiyonlarının oranı % 20'lerden % 45'lere ulaşmıştır MRSA kökenlerinin çoğunun makrolidler, linkozamidler, kloramfenikol, tetrasiklinler, kinolonlar ve aminoglikozitlere de dirençli olabilecekleri bilinmektedir. Buna bağlı olarak metisiline dirençli bir stafilokok infeksiyonunda kullanılabilecek antibiyotikler birçok kez sadece glikopeptidler ile sınırlı kalmaktadır. Nitekim metisiline dirençli kökenler içinde sadece vankomisine duyarlı kökenlerin oranı da bu 10 yılda % 22,8'den % 56,2'ye yükselmiştir (18). Bu durum dirençle savaşı neredeyse hastanın altta yatan sorununa çare bulmaktan daha ön plana geçirmekte, bu da çeşitli maddi ve manevi olumsuzluklarla sonuçlanmaktadır (83).

MRSA, ülkemizde de hastane infeksiyonu etkenleri içinde ilk sıralarda yer almakta ve yıllar içinde görülme sıklığında artış saptanmaktadır. (84). Başta YBÜ olmak üzere hastanelerin bazı bölümleri stafilokok ve özellikle MRSA infeksiyonları açısından daha yüksek risk altındadır. 65 yaşın üstünde, hastanede uzun süre yatan, operasyon geçiren ya da çok sayıda invaziv girişim uygulanan, açık cilt lezyonları

bulunan ve geniş spektrumlu/uzun süre antibiyotik tedavisine maruz kalan hastalar, hem endojen floranın hem de ortam bakterilerinin tehdidi altındadır. Bu koşullar dirençli bakteri suşlarının seçilmesine yol açarken, MRSA infeksiyon ve kolonizasyonunu da ön plana çıkarmaktadır.

Son yıllarda stafilokok türlerinde giderek artan oranda glikopeptid direncinin bildirilmeye başlanması; stafilokok infeksiyonlarındaki son seçenek antibiyotikler olan vankomisin ve teikoplanin kullanımının kısıtlanmasının önemine bir kez daha dikkatleri çekmiştir. (85). Stafilocoklar, metisiline direnç kazanmaları için gerekli gen mutasyonunu 10 yılda oluşturdukları halde, enterokokların vankomisini yenmesi için sadece 2 yıl yetmiştir (86). Üstelik enterokokların sahip oldukları, vankomisine karşı direnç sağlayan genleri plazmidler aracılığı ile diğer türlere, örneğin stafilokoklara aktarmaları olasılığı vardır. Vankomisine dirençli enterokok (VRE) örneği, hem uygunsuz antibiyotik kullanımının oldukça tehlikeli mikroorganizmaların üremesine neden olabileceğini, hem de bu olgu karşısında hekimin tıpkı penisilin öncesi çağdaki gibi çaresiz kalabileceğini göstermesi bakımından çok önemlidir (86).

Glikopeptid antibiyotiklerin uygun olmayan doz ve sürelerde kullanılması, bu ilaçlara direnç gelişmesine katkıda bulunan en önemli faktörler olmuşlardır (87). Glikopeptidlerin bu şekilde kullanımı, tam direnç oluşturmaya bile dirençli alt grupların oluşmasına katkıda bulunmuştur (7, 88–89). Ayrıca yetersiz doz nedeniyle düşük doku konsantrasyonu, diabetes mellitus, bağışıklık sisteminin baskılanması, maligniteler, son dönem böbrek yetmezliği, infeksiyon saptanmasından sekiz hafta önce geçirilmiş cerrahi müdahaleler, endokardit, abse, ortopedik cihaz infeksiyonu gibi bakteriyel yükün yüksek olduğu durumlar da bu faktörler arasında sayılmıştır. (22, 74, 80–94).

Günümüzde dek *S. aureus* kökenlerinde üç farklı vankomisin direnci tanımlanmıştır. Bunlardan ikisi yukarıda anlatılan VISA ve h-VISA suşlarında saptanan, vankomisine homojen ve heterojen orta derecede dirençtir. Üçüncü direnç tipi ise günümüze dek sadece 3 *S. aureus* kökeninde saptanan ve enterokoklarda vankomisin direncine neden olan *vanA* genine bağlı olan dirençtir. Vankomisine tam direnç gösteren bu üç bakterideki (MİK > 32 µg/ml) mekanizma, yüksek düzeyde

glikopeptid direncine neden olmaktadır ve bu kökenler de VRSA olarak adlandırılmaktadır (18). Glikopeptid direncini sorgulayan çalışmaların çoğunun vankomisin ile yapılmış olması, sadece vankomisini ilgilendiren bir direnç tehdidinin olduğu anlamına gelmez. Bu direnç, teikoplanine karşı da olabilir. Ancak her iki direncin de aynı suşta olma zorunluluğu yoktur. Suşlar, yalnız bir antibiyotiğe karşı direnç içerebildiği gibi, her iki antibiyotiğe karşı da direnç içerebilirler. Örneğin, Fransa'da 2000–2001 tarihinde 18 şehirdeki 24 hastaneden izole edilmiş 89 adet MRSA suşunu kapsayan çalışma, hem vankomisin hem de teikoplanin içeren besiyerleri kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışmada teikoplanine orta duyarlı ve dirençli 38 izolat bulunmuştur. Bunlardan da heterojenite ve orta duyarlılık içerenler 30 tanedir. Yine tüm bu suşlar içinde toplam 40 tanesi vankomisine karşı azalmış dirence sahiptir. Hem vankomisin hem de teikoplanine karşı azalmış dirence sahip 21 izolat bulunmuştur (95). İstanbul Üniversitesi'nde yapılan ve yoğun bakımdan izole edilen 63 *S. aureus* ve 57 KNS'den oluşan 120 bakteri izolatının incelendiği bir çalışmada da bakterilerin hiçbirinde vankomisine direnç gözlenmediği, ancak 6 KNS suşunun teikoplanine dirençli olduğu; suşların tamamı için *S.aureus*'larda vankomisin ile teikoplanin MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri 2 µg/ml olmasına rağmen bu suşlarda 4 µg/ml; teikoplanin MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerlerinin ise *S. aureus*'lar için 3/8 µg/ml, KNS'ler içinse 4/8 µg/ml olarak belirlenmesine rağmen bu izolatlarda 256 µg/ml olduğu bildirilmiştir. (96). Bizim çalışmamızda, tarama agarda üremeyen bakteriler için E-test ve mikrodilüsyon ile belirlenen MİK değerleri birbiriyle uyumluyken vankomisin agar tarama besiyerinde üreme gözlenen izolatlardan KNS'lerin mikrodilüsyon ve E-test yöntemi ile belirlenen teikoplanin MİK değerleri arasında farklılıklar gözlenmiştir. Bu farklılıklar, E-test sisteminin bir derece daha hassas olmasından kaynaklanmaktadır. CLSI kriterlerine göre uygulanan mikrodilüsyonda elde edilen değerlerde 16 µg/ml değeri orta derecede duyarlı grubundayken ≥32 µg/ml değeri dirençli olarak kabul edilmektedir. E-test sisteminde ise 16 µg/ml ile 32 µg/ml değerleri arasında 24 µg/ml değeri bulunmaktadır. Bu MİK değerine sahip olan bakteriler, mikrodilüsyonda 16 µg/ml'lik teikoplanin konsantrasyonunda ürediklerinden bir üst değer olan 32 µg/ml değeri bunlar için MİK olarak kabul edilmekte ve dirençli grubunda kabul edilmektedirler. Ancak E-



test sistemi ile yapılan MİK belirlenmesinde bu bakterilerin MİK değerleri 24 µg/ml olarak kabul edildiğinden orta derecede duyarlı grubunda yer almaktadırlar.

Eğer MRSA'ya karşı etkisiz olan geniş spektrumlu sefalosporinlerin kullanımı azaltılırsa hastanede MRSA oranı azaltılabilir. MRSA miktarının azaltılması ise VISA ve h-VISA'nın azaltılması için yapılacak en önemli tedbir olarak ileri sürülmektedir (22). Bizim çalışmamızda da bir derece daha hassas olduğu için E-test sistemiyle yaptığımız değerlendirmeye göre elde ettiğimiz MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri incelendiğinde de tarama agarda üreyen bakterilerde metisiline dirençli olanlar, duyarlı olanlara göre genellikle daha yüksek MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerlerine sahip olarak bulunmuştur. Her ne kadar MSKNS'lerdeki MİK<sub>50</sub> değeri MRKNS'lerdekinden fazla görülüyorsa da tarama agarda üreyen MRKNS'lerin MSKNS'lerden daha fazla olduğu unutulmamalıdır. Ayrıca Tablo 3 incelendiğinde daha düşük MİK değerine sahip bakterilerin bulunduğu aralıkta MSKNS'lerin oranının MRKNS'lere göre daha yüksek olduğu görülecektir.

Ülkemizde çeşitli hastanelerde izole edilmiş stafilokoklarda vankomisin direncinin araştırıldığı birçok çalışma yapılmıştır. Gülay ve ark. (97) Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde klinik örneklerden izole ettikleri 95 MRSA suşunun vankomisin direncini araştırdıkları çalışmada, mikrodilüsyon yöntemi ile suşların 5'inde (%5.3) vankomisine azalmış duyarlılık (MİK: 8 µg/ml) saptamışlardır. Aktaş ve ark. (98) da 100 stafilokok suşunda agar dilüsyon yöntemi ile yaptıkları çalışmada vankomisine direnç saptamamışlardır. Sünbül ve ark. (99) 102 stafilokok suşunu değerlendirdikleri çalışmada vankomisin MİK aralığını 0.25–2 µg/ml olarak bulmuşlardır.

Bizim çalışmamızda incelenen tüm suşlar değerlendirildiğinde, vankomisin için 145'inin MİK değerleri duyarlı aralıkta iken, 95'inin MİK değerinin orta derecede duyarlı aralıkta olduğu tespit edilmiştir. Tarama agarda üreyen toplam bakteri sayısından daha fazla sayıda bakterinin vankomisin MİK değerlerinin orta derecede duyarlı bulunmasının nedeni, bu besiyerinde üreyemeyen bakterilerden *S. aureus* grubunda bulunanların bir kısmının orta derecede duyarlı grubunda bulunmasıdır. Tablo 4 incelendiğinde 58 MRSA'dan 42'sinin ve 60 MSSA'dan da 15'inin 3–4 µg/ml aralığında ürediği görülecektir. Bu değerler *S. aureus*'lar için

CLSI kriterlerine göre orta derecede duyarlı grubuna girmektedir. (79) Çalışmamızda incelenen suşların hiçbirinde vankomisin için dirençli düzeyde MİK değeri tespit edilmezken, 7 suşda teikoplanin için direnç düzeyinde MİK değeri tespit edilmiştir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz çarpıcı sonuçlardan biri de KNS grubundaki bakterilerin her iki antibiyotiğe de *S. aureus* 'lara göre daha yüksek oranda azalmış duyarlılık saptanmasıdır. MSSA grubu bakteriler hiçbir tarama agarda üremezken, 6 µg/ml'lik tarama agarda üreyen 38 izolattan 21'inin MRKNS, 15'inin MSKNS ve 2'sinin de MRSA grubundan olduğu gözlenmiştir.

Fitch ve ark. MRSA suşlarının teikoplanin direncini agar dilüsyon yöntemiyle araştırdıkları çalışmada bir klinik örnekte teikoplanine azalmış duyarlılık (MİK: 16 µg/ml) saptamışlardır. (100) Nourse ve ark. kan kültüründen izole ettikleri *S. epidermidis* suşunda E-test ile teikoplanine azalmış duyarlılık (MİK: 24 µg/ml) saptamışlardır (101). Sieradzki ve ark. çalışmaya aldıkları 41 MRKNS suşunun 28'inde tüpte dilüsyon yöntemiyle teikoplanine azalmış duyarlılık (MİK: 16 µg/ml) tespit etmişlerdir (102) Watanakunakorn, teikoplanin direncini araştırdığı çalışmasında 90 *S. aureus* suşunda %1 oranında teikoplanine azalmış duyarlılık (MİK: 16 µg/ml) saptamıştır (103). Sloos ve ark. da 91 KNS izolatu ile yaptıkları çalışmalarında %2 oranında teikoplanine azalmış duyarlılık (MİK: 16 µg/ml) saptamışlardır (104). Çalışmamızda ise E test yöntemiyle 21 stafilokok suşunda (% 8.75), mikrodilüsyon yöntemiyle de 18 suşta (%7.5) teikoplanine orta derecede duyarlılık ve her 2 yöntemle de 7 suşta (% 2.9) teikoplanine direnç (MİK:≥32 µg/ml) saptanmıştır. Çalışmamızda elde edilen değerler yukarıdaki çalışmalara göre daha yüksek bulunmuştur. Teikoplanine dirençli suşlar incelendiğinde bunların yoğun antibiyotik tedavisi uygulanan bölümlerden gönderilen örneklerden izole edildiği gözlenmiştir. Bu suşların 5 tanesi nöroloji, YBÜ ve iç hastalıkları (geriatri) kliniklerinden (sırasıyla 2, 2 ve 1 adet) gönderilen kan kültürlerinden izole edilmiştir. Diğer 2 örnek ve gönderildikleri klinikler ise sırasıyla şöyledir: Onkoloji-idrar ve KVC-yara kültürleri.

Stafilokok suşlarının teikoplanin direncinin araştırıldığı 1990–2000 yılları arasında yapılan 26 çalışma, ülkemizde stafilokoklarda teikoplanin direncinin %2–6 arasında değiştiğini ve orta duyarlılığın da %1–3 arasında olduğunu göstermektedir

(105). Çalışmamızda belirlenen teikoplanin direnci (%2.9), Türkiye genelindeki teikoplanine direnç oranları ile benzerlik göstermektedir. Orta duyarlılık ise bu değerlerin üzerindedir. Bu değerlerin yüksekliği, teikoplanin kullanımının artmasına ve bu ilaca karşı stafilokokların daha hızlı direnç geliştirmesine bağlı olabilir. Çalışmamızda da görüldüğü gibi teikoplanine direncin artışı, teikoplaninin etkinliğinin vankomisininden daha az olduğunu ve bu antibiyotiğin de kullanımının kontrol altına alınması gerektiğini düşündürmüştür.

VRSA kökenlerinde glikopeptid direnci, bu bakterilerin yüksek MİK'leri nedeniyle, her zaman rutin laboratuvar duyarlılık testleri ile saptanamamaktadır. VISA kökenlerinde de vankomisin duyarlılığının belirlenmesi genellikle çok sorunlu değildir. Örneğin, Michigan ve New Jersey'de izole edilen suşların MİK değerleri (MİK 8 µg/ml) sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile 35°C'de 24 saatlik inkübasyonun ardından belirlenebilmiştir (7). Ancak, New York'ta saptanan suşun MİK değerleri ise sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile 4 µg/ml, E test ile de 6 µg/ml olarak saptanmıştır (89). Bu nedenle tek bir MİK belirleme yönteminin VISA kökenlerinin vankomisin direncini saptamada yetersiz kalabileceği söylenmektedir. Bir *S. aureus* kökeninde VISA adlandırmasının yapılabilmesi için CDC'nin kriterleri 24 saat inkübe edilen ve  $10^6$  CFU/ml yoğunluğundaki inokulumun kullanıldığı sıvı mikrodilüsyon ile vankomisin MİK'lerinin 8–16 µg/ml, E-test yöntemi ile  $\geq 6$  µg/ml olması ve 6 µg/ml vankomisin içeren BHI agar plaklarında 24 saat içinde üreyebilmesi şeklindedir. CDC ayrıca stafilokok kökenlerinde vankomisin duyarlılığının belirlenmesi için disk difüzyonun uygun bir yöntem olmadığını ve herhangi bir *S. aureus* kökeninde vankomisin için MİK değeri 4 µg/ml bulunduğu takdirde CDC'ye gönderilmesi gerektiğini de vurgulamaktadır (79). h-VISA'yı ise popülasyon içindeki bakterilerin büyük bir çoğunluğunun duyarlı sınırları içinde olması nedeniyle rutin laboratuvar testleri ile saptamak genellikle mümkün değildir. Örneğin bu tip direncin prototipi olan Mu3'ün standart mikrodilüsyon yöntemi ile vankomisin MİK değerleri 1–2 µg/ml olarak saptanmaktadır (106). Ayrıca CLSI'nin standart duyarlılık testlerinde kullanılmasının önerdiği inokulum dansitesi  $5 \times 10^5$  CFU/ml'dir. Ancak özellikle h-VISA subpopülasyonlarında dirençli bakterilerin oranı  $10^5$ - $10^6$  CFU/ml arasında değişmekte ve bu nedenle dirençli bakteriler örnekleme yanlışlığı nedeniyle belirlenmemektedir. Bundan dolayı günümüzde bu

konu ile ilgili çalışmaların çoğu h-VISA'nın doğru bir şekilde belirlenebilmesine odaklanmıştır.

Günümüze dek yapılan çalışmalar ve CDC önerileri, vankomisin için MİK değeri 4–8 µg/ml olan stafilocokların disk difüzyon yöntemi ve otomatize sistemlerle güvenilir bir biçimde tanımlanamadığını ortaya koymaktadır. Bu çalışmada da glikopeptid direncinin araştırılmasında bu iki yöntem kullanılmamıştır CLSI önerileri doğrultusunda 30 µg'lık vankomisin diskleri kullanılarak vankomisin direncinin araştırılması, VISA ve h-VISA'yı saptamada yetersiz kalabilmektedir. Bu nedenle CLSI önerileri içinde yer alsa da disk difüzyonun stafilocokların glikopeptid duyarlılıklarının rutin test edilmesinde kullanımı önerilmemektedir. VISA ve h-VISA kökenlerini saptayan yöntemler 6 µg/ml vankomisin içeren beyin-kalp infüzyon agar tarama ve sıvı mikrodilüsyon, agar dilüsyon ve E-test gibi otomatize olmayan MİK saptama yöntemleridir. Bunlar dışında popülasyon çalışmaları, popülasyon analiz profilleri, makrodilüsyon E-test, popülasyon analiz profili-eğri altında kalan alan oranı gibi yöntemler de bu amaçla kullanılmaktadır (77, 107). Bu çalışmada da ilk olarak CDC'nin önerileri doğrultusunda hazırlanan agar tarama yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem ile dirençli saptanan bakterilerin mikrodilüsyon standart E-test ve popülasyon analiz profili-eğri altında kalan alan (PAP-AUC) oranı yöntemleri de ile doğrulamaları yapılmıştır.

Vankomisin direncinin belirlenebilmesi için agar tarama yöntemi ilk kez Hiramatsu ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır Bu yöntemde 4 µg/ml vankomisin içeren BHI agar plaklarına 10 µl kuşkulu bakteri süspansiyonu inoküle edilmiş ve 24 saat içinde üreyen bakteriler VISA, 48 saat içinde üreyenler ise h-VISA olarak kabul edilmiştir. Bu yöntem klinik laboratuvarlarda h-VISA'ların saptanması için uygun bir yöntem olmakla beraber teorik olarak bazı sınırlamaları vardır ve daha az heterojenlik derecesine sahip h-VISA kökenlerinin saptanamayabileceği ifade edilmektedir. Bu nedenle, şüpheli klinik *S. aureus* kökenlerinin tam popülasyon analizi ile doğrulanması gerektiği ileri sürülmektedir (51). Tarama testleri konusunda yapılan bir başka çalışmada 2, 4 ve 6 µg/ml vankomisin içeren besiyerleri karşılaştırılmıştır ve 6 µg/ml vankomisin içeren BHI agarın tarama için daha uygun olduğu belirtilmiştir.(77). Bizim çalışmamızda da 6 µg/ml vankomisin içeren plakların MİK değeri 6–8 µg/ml olan kökenleri,

duyarlılardan ayırmada daha etkili olduğu gösterilmiştir. Çalışmanın sonucuna göre 6 µg/ml vankomisin içeren BHI agar besiyerinin tarama için uygun olduğu görülmüştür. Günümüzde CDC'nin önerisi de glikopeptidlere azalmış duyarlılık gösteren *S. aureus* kökenlerinin araştırılmasında 6 µg/ml vankomisin içeren BHI agar besiyerinin kullanımı ve 48 saatlik inkübasyon sonunda üreyen bakterilerin VISA ve h-VISA yönünden araştırılmasıdır. (107). Çalışmamızda da 120 *S. aureus* suşundan 2'si BHI agarda 24 saat sonunda üremiş ve bunların yapılan PAP-AUC değerlendirmeleri sonucunda h-VISA oldukları belirlenmiştir..

Yapılan bazı çalışmalarda E-test yönteminin glikopeptidlere azalmış duyarlılık gösteren stafilkokların saptanmasında hızlı ve uygun bir test olduğu belirtilmiş ve makrodilüsyon yönteminin hızlı ve daha az yanlış negatif sonuç vermesi nedeniyle tarama için uygun olduğu gösterilmiştir (108). Fakat daha kesin sonuç için modifiye popülasyon analiz profili yönteminin kullanılmasını önerilmiştir. Standart E-test ve makrodilüsyon E-test yöntemlerinin Mu3 ve Mu50 kökenlerini tanımlama etkinliğini araştıran bir çalışmada standart E-test yönteminin h-VISA olan Mu3'ü belirleyemediği, buna karşılık VISA olan Mu50'yi tanımlayabildiği, 2 MacFarland bulanıklıkla hazırlanan bakteri süspansiyonunun kullanıldığı makrodilüsyon E-test yönteminin ise her iki kökeni doğru bir şekilde saptayabildiği görülmüştür (80). Bu çalışmada agar taramada üreyen bakteriler kuşku VISA/h-VISA olarak kabul edilmiş, bunların MİK değerlerini belirlemek için standart E-test yöntemiyle beraber mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. Vankomisin tarama agarda üreyen birinci bakterinin (427 no'lu bakteri) vankomisin MiK değeri standart E-test yöntemi ile 6 µg/ml, mikrodilüsyon yöntemi ile 8 µg/ml; ikinci bakterinin (575 no'lu bakteri) vankomisin MiK değeri ise standart E-test yöntemi ve mikrodilüsyon ile 8 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bu değerlere dayanılarak bakterilerin VISA/h-VISA yönünden araştırılmalarına karar verilmiştir.

Wootton ve arkadaşları (80) tarafından tanımlanan PAP-AUC oranı yönteminin tekrarlanabilirliği ve etkinliği birçok çalışmada ortaya konulmuştur. Bu yöntemin Mu3 ve Mu50 kökenlerini tanımlamadaki etkinliği %100 olarak bulunmuştur. Bu nedenlerle günümüzde PAP-AUC yöntemi birçok araştırmacı tarafından VISA ve h-VISA kökenlerinin tanımlanmasında altın standart olarak kabul edilmektedir (109). Bu çalışmada da PAP-AUC yöntemi referans yöntem olarak değerlendirilmiş ve agar

taramada üreyen ve kuşkulu h-VISA/VISA olarak kabul edilen bakterilerin doğrulanmasında bakteri 427 'nin Mu3'e oranı 1.01 ve bakteri 575'inki de 1.05 olarak hesaplanmıştır. Sonuçta her iki bakterinin de h-VISA oldukları kabul edilmiştir..

Günümüzde birçok ülkede bu VISA ve h-VISA direnç tiplerine sahip kökenlerin oranı, direncin rutin yöntemlerle saptanamaması nedeniyle tam olarak bilinmemektedir. VISA kökenlerinin vankomisin için MİK değeri 8 µg/ml'dir. Günümüzde bu MİK değerlerine sahip klinik *S. aureus* izolatları ile oluşan infeksiyonlar heterojen dirençlilere göre daha nadirdir ve Japonya, ABD, İngiltere, Fransa, Almanya ve Hong Kong'dan az sayıda olgu bildirilmektedir. Heterojen direnç fenotipine sahip stafilkoklarla oluşan infeksiyonlar ise daha yaygındır ve Japonya ile ABD dışında İspanya, İskoçya, Almanya ve Yunanistan gibi Avrupa ülkelerinden de bildirilmektedir (108). Ancak günümüzde birçok batılı ülkede bile saptama güçlükleri nedeni ile h-VISA'nın prevalansı tam olarak bilinmemektedir.

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yapılan ve farklı yöntemlerin kullanıldığı bir çalışmada h-VISA oranı % 17,96 bulunmuş, VISA kökeni saptanamamıştır (110). Yunanistan'da yapılan bir çalışmada ise 99 *S. aureus* kökeni içinde sadece 1 adet h-VISA saptanmıştır (111). Fransa'dan bu oran % 0,6–2,9 arasındadır. Belçika'da yapılan bir çalışmada ise incelenen 1000'den fazla MRSA arasında sadece bir VISA ve beş h-VISA saptanmıştır. Güney ve Kuzey Amerika ülkelerinin katıldığı altı yıllık bir VISA tarama çalışmasında ise toplam 427 MRSA kökeni içinde Brezilya'dan 1, Arjantin'den 2 ve ABD' den de 9 h-VISA kökeni bildirilmiştir (73). Asya ülkelerinde yapılan çalışmalarda ise h-VISA oranları ülkelere göre Japonya'da %8,2, Hindistan'da %6,3, Güney Kore'de %6,1, Filipinler'de %3,6, Vietnam'da %2,4, Singapur'da %2,3 ve Tayland'da da %2,1 olarak bulunmuş, Çin, Endonezya, Suudi Arabistan, Sri Lanka ve Tayvan'da h-VISA kökeni saptanamamıştır (112). Ülkemizde Ege Üniversitesi'nde VISA'lar için oran %1,3, h-VISA ve VRSA'lar için ise %0 iken (113), Ankara'da (110) h-VISA oranı %17,96 bulunmuş, VISA ve VRSA kökeni saptanamamıştır. Bu çalışmada incelenen 120 *S. aureus* kökeninde 2 adet h-VISA saptanmış, h-VISA oranı Süleyman Demirel Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi için % 1.7 olarak hesaplanmış, VISA ve VRSA bulunamamıştır. Benzer şekilde dünyadan bildirilen prevalans oranları da,

bölgeler arasında büyük farklılıklar göstermektedir. Bunun nedenlerinden biri tarama ve tanı için kullanılan yöntemlerin çalışmalar arasında farklılıklar olmasıdır.

Ancak, hücre duvarı kalınlaşmasına bağlı gelişen VISA kökenlerinden çok, vanA geni nedeniyle ortaya çıkan vankomisine yüksek düzeyde dirençli *S. aureus* kökenlerinin dünyaya yayılma açısından daha tehlikeli oldukları söylenmektedir. VISA kökenlerindeki direnç mekanizmasında bu kadar yüksek düzeyde vankomisin MİK değeri (32 µg/ml) saptanamamaktadır. Bunun nedeni, bakterilerin enerji tüketimleridir. Yüksek miktarda peptidoglikan tabakanın üretilmesi için çok fazla enerji gereksinimi olmakta, bu da VISA kökenlerinin bir süre sonra bazı biyolojik sınırlamalara girmek zorunda kalmalarına yol açmakta ve direnç belli bir düzeyde kalmaktadır. VanA genine bağlı direnç ise dünyada kolaylıkla yayılmış olan enterokoklarda olduğu gibi, ekolojik ve epidemiyolojik olarak oldukça avantajlıdır. Aynı zamanda vanA operonunun sadece glikopeptidlerin ortamda bulunduğu durumlarda indüklenmesi; ortamda antibiyotik yok iken aktive olmaması da önemli enerji tasarrufu sağlamaktadır (108–109).

VISA kökenleri ile oluşan infeksiyonların tedavisinde glikopeptid antibiyotiklerin kullanımı ve tedavi başarısı konusu da henüz tam olarak netleşmemiştir. VISA'nın etken olduğu bazı infeksiyonlarda vankomisin ile tedavi başarısızlığı kanıtlanmış olmasına karşın, h-VISA'nın klinik önemi ise henüz tam açık değildir. Bazı çalışmalarda h-VISA kökenleri ile oluşan infeksiyonlarda tedavi başarısızlığı ve yüksek mortalite oranları bildirilse de, birçok çalışmada da h-VISA ile vankomisin tedavisi başarısızlığı arasında bir ilişki bulunamamıştır. Ancak VISA ve h-VISA arasında, uzun süre glikopeptidlere maruz kalma sonucu h-VISA kökenlerinin VISA'ya dönüşmesi gibi önemli bir ilişki bulunmaktadır (22).

Sonuç olarak, MRSA'ların etken olduğu toplum ve hastane kökenli infeksiyonların artışı ve MRSA kökenlerinin birçok antibiyotiğe dirençli olmaları nedeniyle, bu bakteriler ile oluşan infeksiyonlarda tek tedavi seçeneği olarak çoğu kez glikopeptid antibiyotikler kalmaktadır. Glikopeptid antibiyotiklerin yoğun bir biçimde kullanılmaları sonucu, *S. aureus* kökenlerinde glikopeptidlere karşı direnç görülmeye başlanmıştır. Bu dirence neden olan mekanizmalardan bazılarının rutin laboratuvar yöntemleri ile saptanamaması, bu direncin anlaşılabilmesi ve nedeni

konusunda birçok çalışma yapılmasına neden olmuştur. Tüm bunlara karşın henüz stafilocoklarda azalmış glikopeptid direncinin taranması ve doğrulanması için kullanılacak ve tüm dünyada kabul görmüş bir yöntem geliştirilememiştir. Vankomisin tarama agar, standart E test ve altın standart olarak kabul edilen PAP-AUC oranının hesaplandığı bu çalışmada, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde vankomisine azalmış duyarlılık gösteren *S. aureus* kökenlerinin % 1.7 oranında olduğu belirlenmiştir. Tarama agarda üreyen *S. aureus*'ların E-test ve mikrodilüsyon ile de belirlenen MİK değerleriyle desteklendiği ve en sonunda altın standart olarak kabul edilen PAP-AUC oranının kullanılmasıyla kesinleştirildiği bu oran şu an için çok yüksek görünmese de bu konuda her zaman dikkatli ve uyanık olmamız gerekmektedir.

4 µg/ml vankomisin içeren tarama agarda üreyen bakterilerden 3 tanesinin 6 µg/ml vankomisin içeren agarda ürememesi ve bunların MİK değerlerinin de duyarlı grubunda bulunması, ayrıca 6 µg/ml vankomisin içeren tarama agarda üreyen bakterilerin hepsinin vankomisine orta derecede duyarlı grubunda bulunması, elde ettiğimiz bu bulguların CLSI'nin önerileri doğrultusunda yapılan çalışmalarda beklenenlerle uyumlu olduğunu göstermiştir.

Stafilocoklarda azalmış glikopeptid direncinin taranması ve doğrulanması için kullanılacak ve tüm dünyada kabul görmüş bir yöntemin geliştirilebilmesi için direncin moleküler ve biyolojik mekanizmalarının tam olarak aydınlatılmasına gereksinim vardır. Bu geliştirilene kadar da, başta glikopeptid tedavisine yanıt vermeyen ya da VISA gelişimi için risk taşıyan hastalardan izole edilenler olmak üzere, tüm *S. aureus*'larda bu direncin varlığı konusunda dikkatli olunması gerektiği önerilebilir. Direnci saptadıktan sonra izolasyon ve korunma da çok önemlidir. Direnci saptamadaki amaç, hastayı uygun şekilde tedavi etmek olmasının yanısıra 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 gerekir.

Önce Japonya, takiben Amerika, İngiltere, Yunanistan gibi birçok ülkede, son yıllarda stafilocok suşlarında özellikle metisiline dirençli *S. aureus* suşlarında vankomisine azalmış duyarlılığın görülmesi (111, 114–116) bunun dünyayı



ilgilendiren bir problem olduğunu göstermiştir. Bu yüzden, ülkemizde direnç probleminin yaygınlaşmaması için gereken önlemler üzerinde önemle durulmalıdır.

Ülkemizde antibiyotik kullanımında ciddi sorunlar yaşandığı bir gerçektir. Özellikle geniş spektrumlu antibiyotiklerin akılcı olmayan kullanımları antibiyotiklere direnç gelişiminde başlıca faktördür. Zamanla toplum içinde dirençli kökenlerin oluşturduğu infeksiyonların artması, sağaltımın hem maliyetini artırmakta, hem de zorlaşmasına neden olmaktadır. 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.

## 6. ÖZET

Stafilokoklar, hastane ve toplum kökenli infeksiyonların en önemli etkenlerindedir. Önceleri sadece *S. aureus* hastane infeksiyonu etkeni olarak kabul edilirken, günümüzde KNS'lerin önemi de artmaya başlamıştır.

Çalışmamızda, hastanemiz Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na Nisan 2007-Nisan 2008 tarihleri arasında gönderilen çeşitli örneklerden izole edilen 60'ar adet MRSA, MSSA, MRKNS ve MSKNS suşu kullanılmıştır. Tüm bakteriler 4 ve 6 µg/ml vankomisin içeren BHI agara ekilmiştir. MSSA grubu bakterilerden hiçbiri bu tarama agarlarda ürememiştir. 4 µg/ml vankomisinli agarda MRSA'lardan 2, MRKNS'lerden 22, MSKNS'lerden ise 17 bakteri üremiştir. 6 µg/ml vankomisinli agarda ise bunlardan 2 MSKNS ve 1 MRKNS dışındaki bakteriler üremiştir. Tüm bakterilerin mikrodilüsyon ve E test yöntemi ile vankomisin ve teikoplanin MİK değerleri belirlenmiştir. *S. aureus*'lardan tarama agarda 24. saatte üreyen 2 suş şüpheli VISA/h-VISA olarak kabul edilmiş ve bunların h-VISA oldukları PAP-AUC yöntemiyle doğrulanmıştır.

Tarama agarda üreyen bakterilerin büyük bir çoğunluğunun KNS'lerden oluşması, bu bakterilerin hastane infeksiyonu etkeni olarak önemini bir kez daha ortaya koymuştur. VISA ve h-VISA suşları rutin disk difüzyon yöntemleriyle tespit edilememektedir. Bu bakterilerin tespiti için tarama agar ve PAP-AUC oranı gibi yöntemler gerekmektedir. Her ne kadar elimizde VISA ve h-VISA infeksiyonlarından kaynaklanan artmış mortalite ile ilgili kontrollü klinik çalışma yoksa da; hekimler, MRSA infeksiyonlarının tedavisinde vankomisine yeterli cevabın alınmadığı durumların vankomisine karşı heterojen dirençten kaynaklanmış olabileceğini akılda tutmalıdırlar.

Ülkemizde VISA ve h-VISA oranı tam olarak bilinmemektedir. Bunun tam olarak ortaya konması ve hastane infeksiyonu etkeni olarak bunların öneminin tam olarak belirlenmesi için daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** Stafilokok, glikopeptid duyarlılığı, VISA, h-VISA.

## 7. SUMMARY

Staphylococci are among the most important agents for hospital and community-acquired infections. While, *S. aureus* was accepted as the only agent for hospital-acquired infections in the past; nowadays, importance of CNS have begun to increase.

In our study, a total of 240 strains (60 MRSA, 60 MSSA, 60 MRCNS and 60 MSCNS) isolated from various clinical specimens sent to our Microbiology and Clinical Microbiology Laboratory between April 2007-April 2008, were studied. All bacteria were inoculated on to Brain Heart Infusion agar supplemented with 4 µg/ml and 6 µg/ml vancomycin. None of MSSA have grown on these screen agar plates. Two of 60 MRSA, 22 of 60 MRCNS and 17 of 60 MSCNS isolates have grown on screen agar that included 4 µg/ml vancomycin. On the other hand, all this bacteria except three strains (2 MSCNS and 1 MRCNS) have grown on screen agar that included 6 µg/ml vancomycin. All bacteria's vancomycin and teicoplanin MIC values were determined by microdilution and E-test methods. Two *S. aureus* isolates that grew on screen agar were accepted as possible VISA/h-VISA and these strains were confirmed as h-VISA by PAP-AUC method.

The finding that most of the bacteria that grew on screen agar plates were CNS has emphasized the importance of these bacteria as hospital-acquired infection agents. VISA and h-VISA strains can not be detected by routine disc diffusion methods. Methods like screen agar and PAP-AUC ratio are needed for detecting them. Although there have been no data from controlled clinical studies which document the increased mortality from h-VISA and VISA infections, clinicians should bear in mind that an inadequate response to vancomycin in the treatment of MRSA infections could be due to heteroresistance to vancomycin

The prevalences of VISA and h-VISA are not clear enough in our country. More studies must be performed to clarify these rates and to determine the of importance these strains.

**Key Words:** Staphylococcus, glycopeptide susceptibility, VISA, h-VISA.

## 8. KAYNAKLAR

1. Bulger RJ, Sherris JC: Decreased incidence of antibiotic resistance among *Staphylococcus aureus*. *Ann Intern Med* 1968; 69: 1099–1108.
2. Ayliffe GAJ. The progressive intercontinental spread of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 1997; 24 (Suppl 1): 74–79.
3. Duckwort GJ, Lothian JL, Willams JD: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: report of an outbreak in a London teaching hospital. *J Hosp Infect* 11: 1-15 (1988).
4. Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1. Baskı. İzmir: Güneş Kitabevi 1999; 339–45.
5. Ploy MC, Grelaud C, Martin C, de Lumley L, Denis F. First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. *Lancet* 1998; **351**: 1212.
6. Kim M-N, Pai CH, Woo JH, Ryu JS, Hiramatsu K. Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in Korea. *J Clin Microbiol* 2000;**38**: 3879–81.
7. Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, et al. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* 1999; 340: 493–501.
8. Hood J, Edwards GFS, Cosgrove B, Curran E, Morrison D, Gemmell CG. Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* at a Scottish hospital. *J Infect* 2000; **40**: A11.
9. Rotun SS, McMath V, Schoonmaker DJ, et al. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin isolated from a patient with fatal bacteremia. *Emerg Infect Dis* 1999; **5**: 147–9.
10. Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin—United States, Morb. Mortal. Wkly. Rep 2002; 51: 565–67.
11. Centers for Disease Control and Prevention. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*—Pennsylvania, Morb. Mortal. Wkly. Rep. 2002; 51: 902.
12. Centers for Disease Control and Prevention. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*—New York, Morb. Mortal. Wkly. Rep. 2004; 53: 322–23.
13. Waldvogel FA. *Staphylococcus aureus* (including staphylococcal toxic shock). In: Mandel GL, Bennet JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 5th. ed. New York: Churchill Livingstone, 2000; 2070–92.
14. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 4. Baskı. İzmir: Barış Yayınları 2004; 495–96.
15. 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.
16. Kloos WE, Schleifer KH. *Staphylococcus auricularis* sp. nov.: an inhabitant of the human external ear. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1983; 33: 9–14.
17. Hajek V, Meugnier H, Bes M et al. *Staphylococcus saprophyticus* subs. *bovis* subs. *nov.* isolated from bovine nostrils. *Int. J Syst. Bacteriol.* 1996; 46: 792–96.

18. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *New England Journal of Medicine* 1998; 339(5): 520–31.
19. Koneman EW, Allen SO, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 5th. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997; 539–76.
20. Shulman ST. Staphylococci, Staphylococcal disease, and toxic shock syndrome. *In: Shulman ST, Phair JP, Peterson LR, Warren JR (eds). The Biologic and Clinical Basis of Infectious Disease 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders, 1997; 505–14.*
21. Arda, M. Temel mikrobiyoloji ders notları 2006, , Mikrobiyoloji Kulübü Arama Siteleri Linkleri, <http://www.mikrobiyoloji.org/docgoster.asp?dosya=110013100>
22. Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance *Lancet Infectious Diseases* 2001; 1: 147–55.
23. Tünger A. *Staphylococcus aureus*: Mikrobiyoloji, Patogenez ve Epidemiyoloji. *In: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S (eds) Gram Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Ankara. Bilimsel Tıp Yayınevi,2004: 9–22.*
24. Levinson W, Jawetz E. *Medical Microbiology and Immunology*, 6th. ed. Singapore: Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2000; 85–95.
25. Batıkutlu S. Çeşitli klinik materyallerden izole edilen *S. aureus* suşlarında metisilin direnci ve E-test ile Vankomisin MIC değerlerinin araştırılması. *Uzmanlık Tezi. S.B. Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2006: 12*
26. Bilgehan, H. Klinik mikrobiyoloji özel bakteriyoloji ve bakteri enfeksiyonları Bornova: Barış Yayınları 1994; 188–211
27. Unat EK. Tıp bakteriyolojisi ve virolojisi. *Dergah Tıp Yayınları. İstanbul.1982; 428–45.*
28. Baird D, Collee JG, Marmion SP, Simmons A. (eds.). *Staphylococcus*: cluster-forming Gram-positive cocci, *Practical Medical Microbiology* 1996; 245–62.
29. Bouvet A, Fournier JM, Audurier A, Branger C, Orsoni A, Girerd C. Epidemiological markers for epidemic strain and isolates in an outbreak of nosocomial oxacillin-resistant *S. aureus*, *Journal of Clinical Microbiology*. 1990; 28: 1338.
30. Cohen ML. *Staphylococcus aureus*: Biology mechanisms of virulence, epidemiology. *J. Pediatr*:1986(108): 796–99.
31. Sheagren JN. *S. aureus*: The persistent pathogen. *N Engl J Med*: 1984 (310): 1368.
32. Kayser FH, Bienz KH, Eckert J, Zinkernagel RM. *Medizine Mikrobiologie verstehen, lernen, nahschlagen Georg Thieme Verlag 1998.*
33. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Staphylococcus and Related Organisms. In: Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA (eds). Medical Microbiology 3rd ed. St Louis: Mosby- Year Book Inc. 1998; 175–89.*
34. Öztürk R. Antimikrobik ilaçlara karşı direnç gelişme mekanizmaları ve günümüzde direnç durumu. İstanbul: İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi sempozyum dizisi No:31. Kasım 2002; 83–100).
35. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S. *Antibiyotikler. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi 2003; 31–41*
36. Kayaalp SO. *Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 10.baskı. Ankara: Hacettepe-Taş 2002; 182–327.*

37. Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* 1994; 264: 382–8.
38. Acar JF, Goldstein FW. Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones. *Clin Infect Dis* 1997; 24(Suppl 1):567–73
39. Gür D. Temel tıptan kliniği; beta-laktamazlar. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2002;33(2):102–9.
40. Reynolds PE, Brown DFJ. Penicillin-binding proteins of betalactam-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. *FEBS Lett* 1985;192: 28–32.
41. Utsui Y, Yokota T. Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin- and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28: 397–403.
42. Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 1984; 158: 513–16.
43. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, *Staphylococcus* Cassette Chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1549–55.
44. Jehl F, Chomarat M, Weber M, Gerard A. Antibiyotik Duyarlılık Testinden Reçeteye. Çev: Söyletir G, Bal Ç, Gür D, Wilke Topçu A. 2. Baskı İstanbul: Bio Merieux Yayınları Mart 2003; 78–83.
45. Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M. Asya Mikrobiyoloji. 4. Baskı. İzmir: Asya Tıp Kitabevi 2005; 54
46. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1997; 40: 135–36.
47. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, Fukuchi Y, Kobayashi I. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 1997; 350: 1670–73.
48. Bert FJ, Clarissou F, Durand D, Delefosse C, Chauvet P, Lefebvre N, et al. Prevalence, molecular epidemiology, and clinical significance of heterogeneous glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* in liver transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41: 5147–52.
49. Wang SSY, Ho PL, Woo PCY, and Yuen KY. Bacteremia caused by staphylococci with inducible vancomycin heteroresistance. *Clin. Infect. Dis.* 1999; 29: 760–67.
50. CDSC. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin-United States. *MMWR* 2002;51 (26): 565–7.
51. Hiramatsu K. Vancomycin resistance in staphylococci. *Drug Resistance Updates* 1998; 1: 135–50
52. Kaatz GW, Seo SM, Dorman NJ, Lerner SA. Emergence of teicoplanin resistance during therapy of *Staphylococcus aureus* endocarditis *J Infect Dis* 1990; 162: 103–08.
53. Brunet G, Vedal G, Dreyfus F, et al. Failure of teicoplanin therapy in two neutropenic patients with staphylococcal septicaemia who recovered after administration of vancomycin. *Eur J Clin Microb Infect Dis* 1990; 9: 145–47.
54. Shlaes DM, Shlaes JH, Vincent S, Etter L, Fey PD, Goering RV. Teicoplanin-resistant *Staphylococcus aureus* expresses a novel membrane protein and increases

expression of penicillin-binding protein 2 complex. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 2432–437.

55. Hanaki H, Kuwahara-Arai K, Boyle-Vavra S, Daum RS, Labischinski H, Hiramatsu K. Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50. *Antimicrob Chemother* 1998; 42: 199–209.

56. Cui L, Ma X, Sato K, Okuma K, Tenover FC, Mamizuka EM et al Cell Wall Thickening Is a Common Feature of Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal Of Clinical Microbiology*. Jan. 2003; 5–14.

57. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1997; 40: 135–36.

58. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, Fukuchi Y, Kobayashi I. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 1997; 350: 1670–73.

59. Bert FJ, Clarissou F, Durand D, Delefosse C, Chauvet P, Lefebvre N, et al.. Prevalence, molecular epidemiology, and clinical significance of heterogeneous glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* in liver transplant recipients. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41: 5147–52.

60. Moore MR, Perdreau-Remington F, and Chambers HF. Vancomycin treatment failure associated with heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a patient with endocarditis and in the rabbit model of endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47: 1262–66.

61. Wang SSY, Ho PL, Woo PCY, and Yuen KY. Bacteremia caused by staphylococci with inducible vancomycin heteroresistance. *Clin. Infect. Dis.* 1999; 29: 760–67.

62. CDSC. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin-United States. *MMWR* 2002;51 (26): 565-7.

63. Hanaki H, Hiramatsu K. Detection methods of glycopeptide resistant *Staphylococcus aureus* I: Susceptibility testing. In: Gillespie SH, ed. Antibiotic resistance methods and protocol Totowa, New Jersey: Humana Press, 2001: 85–92.

64. Guerin F, Buu-Hoi A, Mainardi JL, Kac G, Colardelle N, Vaupre S, et al.: Outbreak of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* with reduced Susceptibility to Glycopeptides in a Parisian Hospital. *J Clin Microbiol* 2000, 38: 2985–88.

65. Liu C, Chambers HF. *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin: Epidemiology, clinical significance, and critical assessment of diagnostic methods. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3040–45.

66. Mulligan ME, Murray-Leisure KA, Ribner BS, Standiford HC, John JF, Korvick JA, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a consensus review of the microbiology, pathogenesis, and epidemiology with implications for prevention and management. *Am J Med* 1993, 94: 313–28.

67. Aritaka N, Hanaki H, Cui L, Hiramatsu K. Combination effect of vancomycin and betalactams against a *Staphylococcus aureus* strain, Mu3, with heterogeneous resistance to vancomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2001; 45 (4): 1292–94.

68. Srinivasan A, Dick JD, Perl TM. Vancomycin resistance in staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews* 2002; 15 (3): 430–438.

69. Kato D, Ito T, Imai D, Hiramatsu K. In vitro synergy between linezolid and sulbactam/ampicillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates including those with reduced susceptibility to vancomycin. 40th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2000; Abstract no. 2297.
70. Fridkin SK. Vancomycin-intermediate and -resistant *Staphylococcus aureus*: What the infectious disease specialist needs to know. *Clinical Infectious Diseases* 2001; 32 (1): 108–15
71. Tsiodras S, Gold HS, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Wennersten C, Venkataraman L, et al. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2001; 358 (9277): 207–208.
72. Rybak MJ, Hershberger E, Moldovan T, Grucz RG. In vitro activities of daptomycin, vancomycin, linezolid, and quinupristin-dalfopristin against Staphylococci and Enterococci, including vancomycin- intermediate and -resistant strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2000; 44 (4): 1062–66.
73. Ruef C. Epidemiology and clinical impact of glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *Infection* 2004; 32: 315–27.
74. Howden BP, Ward PB, Charles PG, Korman TM, Fuller A, du Cros P, et al. Treatment outcomes for serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced vancomycin susceptibility. *Clinical Infectious Diseases* 2004; 38 (4): 521–28.
75. Heym B, Le Moal M, Armand-Lefevre L, Nicolas-Chanoine MR. Multilocus sequence typing (MLST) shows that the 'Iberian' clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* has spread to France and acquired reduced susceptibility to teicoplanin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2002; 50 (3): 323–29.
76. Tanaka M, Wada N, Mori-Kurosaka S, Chiba M, Sato K, Hiramatsu K. In-vitro activity of DU-6859a against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates with reduced susceptibilities to vancomycin. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 552–53.
77. Tenover FC, Lancaster MV, Hill BC, Steward CD, Stocker SA, Hancock GA, et al. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. *J Clin Microbiol* 1998;36(4): 1020–7.
78. Chadwick PR, Wooster SL. Glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Infect* 2000; 40(3): 211–7.
79. Clinical and Laboratory Standards Institute. Antimikrobik Duyarlılık Testleri İçin Uygulama Standartları 17.Bilgi eki Ocak 2007.
80. Wootton M, Howe RA, Hillman R, Walsh TR, Bennett PM, MacGowan AP. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2001; 47: 399–403.
81. Van Griethuysen A, Van 'T Veen A, Buiting A, Walsh T, And Kluytmans J. High Percentage Of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Isolates With Reduced Susceptibility To Glycopeptides In The Netherlands. *Journal Of Clinical Microbiology*, June 2003; 2487–91.
82. Spink WW, Ferris V. Quantitative action of penicillin inhibitor from penicillin resistant strains of staphylococci. *Science* 1945; 102:221.



83. Kloos WE, Bannerman TL. Staphylococcus and Micrococcus. In: Murray PR, Baran EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC, Yolker RH, eds. Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. Washington DC: ASM Pres, 1995: 282–98.
84. Arslan H, Tunçbilek S, Nazlıer S: Nosokomial enfeksiyon etkeni olarak izole edilen stafilocoklarda glikopeptid antibiyotiklerin etkinliği. 8. Türk Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Program ve Özet Kitabı Antalya: 1997; 784.
85. Yakupoğulları Y, Gündüz A, Özcan M, Doğan M, Seyrek A, Yılmaz M. *Staphylococcus aureus* suşlarının siprofloksasin, ofloksasin, levofloksasin ve moksifloksasin duyarlılıkları. *Fırat Tıp Dergisi*. 2006(11); 1: 45–47.
86. Çalangu, S. Hastane Enfeksiyonlarının Önemi. In: Günaydın M, Esen Ş, Seriş A, Leblebicioğlu, H. *SİMAD Yayınları* 2002; 1: 193–99.
87. Chesneau O, Morvan A, Solh NE. Retrospective screening for heterogeneous vancomycin resistance in diverse *Staphylococcus aureus* clones disseminated in French hospitals. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45 (6): 887–90.
88. Nichols R L . Postoperative infections in the age of drug-resistant Gram positive bacteria. *Am J Med* 1998; 29;104(5A):11–16.
89. Sieradzki K, Roberts RB, Haber SW, Tomasz A. The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *N Engl J Med* 1999;340(7): 517–23.
90. Ariza J, Pujol M, Cabo C, Pena C, Fernandez N, Linares J, Ayats J, Gudiol F. Vancomycin in surgical infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin. *Lancet* 1999; 353: 1587–88.
91. Bert F, Clarissou J, Durand F, Delefosse D, Chauvet C, Lefebvre P, et al. Prevalence, molecular epidemiology, and clinical significance of heterogeneous glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* in liver transplant recipients. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41 (11): 5147–52.
92. Moore MR, Perdreau-Remington F, Chambers RF. Vancomycin treatment failure associated with heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a patient with endocarditis and in the rabbit model of endocarditis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003; 47 (4): 1262–66.
93. Wong SS, Ho PL, Woo PC, Yuen KY. Bacteremia caused by staphylococci with inducible vancomycin heteroresistance. *Clinical Infectious Diseases* 1999; 29 (4): 760–767.
94. Charles PG, Ward PB, Johnson PD, Howden BP, Grayson ML. Clinical features associated with bacteremia due to heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases* 2004; 38: 448–51.
95. El Solh N, Davi M, Morvan A, Damon HA, Marty N, GISA group, et al. Characteristics of French methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolate with decreased susceptibility or resistance to glycopeptides. *J Antimicrob Chemother* 2003;52 (4): 691-4.
96. Kucukates E. *In vitro* activity of vancomycin and teicoplanin in intensive care units *The National Medical Journal Of India* 2004 (17); 2: 117.
97. Gülay Z, Atay T, Yuluğ N. *Staphylococcus aureus* suşlarında vankomisin direncinin araştırılması. *ANKEM Derg* 1998; 12:101.
98. Aktaş Z, Şalcıoğlu M, Akbulut K, Bal Ç, Anğ Ö. Stafilocoklarda fusidik asit, vankomisin ve teikoplanin etkinliğinin agar dilüsyon yöntemi ile karşılaştırılması. 4.

Antimikrobik Kemoterapi Günleri Program ve Özet Kitabı (Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No:37) İstanbul 1999; 5: 209.

**99.** Sünbül M, Eroğlu C, Çınar T, Saniç A, Leblebicioğlu H. Stafilocok suşlarının vankomisin ve teikoplanine duyarlılıkları. *ANKEM Derg* 1998; 12: 77–80.

**100.** Fitch L, Johnson PA. Reduced susceptibility to teicoplanin in a methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41: 578.

**101.** Nourse C, Kaufmann M, Byrne M, Byrne C, Moylett E, Murphy H, et al. Clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* with reduced susceptibilities to teicoplanin in a paediatric hospital in Ireland. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42: 118–19.

**102.** Sieradzki K, Villari P, Tomasz A. Decreased susceptibilities to teicoplanin and vancomycin among coagulase-negative methicillin-resistant clinical isolates of staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 100–107.

**103.** Watanakunakorn C. In vitro selection of resistance of *Staphylococcus aureus* to teicoplanin and vancomycin. *J Antimicrob Chemother* 1990; 25: 69-72.

**104.** Sloos HJ, Klundert MAJ, Dijkshoorn L, Soven APC. Changing susceptibilities of coagulase- negative staphylococci to teicoplanin in a teaching hospital. *J Antimicrob Chemother* 1998 (42): 787–91.

**105.** Güleröğlü S. Metisiline Dirençli Stafilocoklarda Vankomisin, Teikoplanin ve Fusidik asit Direncinin Mikrodilüsyon Yöntemi İle Araştırılması. İstanbul 2001; 48.

**106.** Tenover FC, Biddle JW, Lancaster MY. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases* 2001; 7 (2): 327–331.

**107.** VISA/VRSA-Vancomycin-Intermediate/Resistant *Staphylococcus aureus* Laboratory Detection; <http://www.cdc.gov/ncidod/hip/Lab/FactSheet/vrsa.htm>.

**108.** Geisel R, Schmitz FJ, Fluit AC, Labischinski H. Emergence, mechanism, and clinical implications of reduced glycopeptide susceptibility in *Staphylococcus aureus*. *European Journal Of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2001; 20: 685-697.

**109.** Walsh TR, Bolmström A, Qwamström A, Ho P, Wootton M, Howe RA, et al. Evaluation of current methods for detection of staphylococci with reduced susceptibility to glycopeptides. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39 (7): 2439–44.

**110.** Sancak B, Ercis S, Menemenlioğlu D, Çolakoğlu ş, Hasçelik G. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yatan hastalardan izole edilen metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* izolatlarında orta düzeyde vankomisin direnci prevalansı. XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi. 19–23 Eylül 2004, Kuşadası. *Kongre Kitabı*, s: 261, Bildiri no: 5-6.

**111.** Kantzanou M, Tassios PT, Tseleni-Kotsoyili A, Legakis NJ, Vatopoulos AC. Reduced susceptibility to vancomycin of nosocomial isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1999; 43 (5): 729–731.

**112.** Song JH, Hiramatsu K, Suh N, Ko KS, Ito T, Kapi M, Kiem S, et al. Emergence in Asian countries of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004; 48 (12): 4926–28.

**113.** YaygınYE. Metisiline Dirençli *Staphylococcus Aureus* Kökenlerinde Vankomisin Direncinin Araştırılması. İzmir 2005; 22.

**114.** Altun B, Kocagöz S, Uzun Ö, Akova M, Ünal S. Türkiye'deki stafilocokların fusidik asit ve diğer dört antibiyotik ile birlikte direnç durumunun karşılaştırılması. 28.Türk Mikrobiyoloji Kongresi Özet Kitabı. Antalya 1998; 12–164.

**115.** Hiramatsu K, Hanaki H, Ina T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40: 135.

**116.** Johnson AL, Uttley AHC, Woodford N, George RC. Resistance to vancomycin and teicoplanin: an emerging clinical problem. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3: 280–91.