



T. C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**METİSİLİNE DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
İZOLATLARINDA hVISA ORANLARININ BELİRLENMESİ İÇİN
İKİ FARKLI YÖNTEMİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Nesrin SAKARYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Dr.Öğr.Üyesi Deniz GAZEL

Gaziantep
2021

T. C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**METİSİLİNE DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*
İZOLATLARINDA hVISA ORANLARININ BELİRLENMESİ İÇİN
İKİ FARKLI YÖNTEMİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Nesrin SAKARYA

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Dr.Öğr.Üyesi Deniz GAZEL

Gaziantep
2021

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Savunma Tarihi: 16/12/2021

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Doç.Dr. Davut Sinan KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir “Yüksek Lisans” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof.Dr. Tekin KARSLIĞİL

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Dr.Öğr.Üyesi Deniz GAZEL

Tez Danışmanı

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

İmzası

Dr. Öğretim Üyesi : Deniz GAZEL

Dr. Öğretim Üyesi : Hadiye DEMİRBAKAN

Prof. Dr. : Yasemin ZER

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışının olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışının olmadığı beyan ederim.

16/12/2021

Nesrin SAKARYA

TEŞEKKÜR

Tez dönemim boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan destek ilgi ve katkılarını esirgemedi yardımcı olan tez danışmanım, kıymetli hocam Dr. Öğretim Üyesi Deniz GAZEL'e,

Tezimin örnek toplama ve değerlendirme aşamasında ilgi ve desteklerini esirgemeyen Dr. Öğretim Üyesi Hadiye DEMİRBAKAN'a

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübe lerinden yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Tekin KARSLIGİL, Prof. Dr. Fahriye EKŞİ, Prof. Dr. Yasemin ZER,

Tezimin bioistatistik kısmında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Seval KUL'a hVISA standart suşu temininde yardımcı olan Prof. Dr. Barış OTLU'ya Tezimin mikrobiyoloji laboratuvarında her aşamasında destek ve yardımlarını maddi manevi esirgemeyen, bana çok büyük katkıda bulunan bilgi ve becerilerini öğreten, esirgemeyen, tezim sürecince en büyük destekçilerimden biri olan Bio. MSc Ayşe BÜYÜKTAŞ MANAY'a Gaziantep Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar'ının tüm personellerine,

Zorlu tez sürecimde bana destek olan biricik annem Saadet KÖRÜK'e babam Mehmet KÖRÜK'e ve eşim Hüseyin SAKARYA'ya,

Teşekkürü bir borç bilirim.

Bu tezdeki başarıımı, bana benden çok güvenen kıymetli eşim en büyük destekçim Hüseyin SAKARYA'ya ve kıymetli annem Saadet KÖRÜK'e ithaf ediyorum.

Nesrin SAKARYA

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	iv
RESİMLER LİSTESİ.....	v
GRAFİKLER LİSTESİ.....	vi
TABLolar LİSTESİ	vii
ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Stafilokoklar	5
2.1.1. Tarihçe	5
2.1.2. Morfoloji	6
2.1.3. Üreme ve Biyokimyasal Özellikler	6
2.1.4. Fizyoloji ve Yapı:	7
2.1.4.1. Genom	7
2.1.4.2. Hücre Duvarı.....	7
2.1.4.2.1. Peptidoglikan Yapı ve Sentezi	7
2.1.4.2.2. Teikoik Asit	8
2.1.4.2.3. Yüzey Proteinleri	8
2.1.4.2.4. Kapsül ve Slime Tabakası	8
2.1.5. Enzimler.....	8
2.1.6. Toksinler	9
2.1.6.1. Sitotoksinler.....	10
2.1.6.2. Enterotoksin	10
2.1.6.3. Toksik Şok Sendromu Toksini (TŞST)	11
2.1.6.4. Panton-Valentin Lökositidin (PV)	11
2.1.7. Patogenez	11
2.1.8. Epidemiyoloji	12
2.1.9. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un Neden Olduğu Hastalıklar.....	12
2.1.9.1. Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları	12
2.1.9.2. Toksinlere Bağlı Olarak Ortaya Çıkan Enfeksiyonlar	13
2.1.9.3. Stafilokokların Yayılımı ile Oluşan Enfeksiyonlar	13
2.1.10. Antibiyotik Direnci	16
2.1.10.1. Aminoglikozidlere Karşı Direnç.....	16
2.1.10.2. Kloramfenikol Direnci.....	17
2.1.10.3. Makrolid, Linkozamid ve Streptogramin B (MLSB) Direnci	17
2.1.10.4. Tetrasiklin Direnci.....	17
2.1.10.5. Kinolon Grubu Antibiyotiklere Direnç.....	17
2.1.10.6. β -Laktamlara Direnç	17
2.1.10.7. Rifampin Direnci.....	18
2.1.10.8. Stafilokoklarda Glikopeptid Direnci.....	18
2.1.10.9. Oksazolidinon Direnci	18
2.1.10.10. Daptomisin Direnci	19
2.1.10.11. Metisilin Direnci.....	19
2.1.11. VISA, VRSA ve hVISA	20
3. MATERYAL VE METOD	24
3.1. Materyal.....	24

3.1.1. Kullanılan Malzemeler	24
3.1.1.1. Sıvı Mikrodilüsyon Testi	24
3.1.1.2. Satola Testi	25
3.1.1. 3. Popülasyon Analizi Profili Eğri Altı Alan Hesaplanması	25
3.1.2. Cihazlar.....	26
3.2. Metod	26
3.2.1. Suşların İzolasyonu ve Saklanması	26
3.2.2. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi	27
3.2.2.1. Vankomisin'in Tartılması	27
3.2.2.2. Stok Çözeltinin Hazırlanması	27
3.2.2.3. Besiyerinin Hazırlanması	27
3.2.2.4. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması ve İnokülasyonu	27
3.2.3. Satola testi.....	28
3.2.3.1. Besiyerini Hazırlanması	28
3.2.3.2. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması ve İnokülasyonu	29
3.2.4. Popülasyon Analizi Profili Eğri Altı Alan Hesaplanması	30
3.2.4.1. Besiyerinin Hazırlanması	30
3.2.4.2. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması ve İnokülasyonu	30
3.2.4.3. Popülasyon Analizi Profili Eğri Altı Alan Hesaplanması	30
4. BULGULAR.....	32
4.1. İzolatların Örnek ve Bölümlere Göre Dağılımı	32
4.2. İzolatların Vankomisin İçin Sıvı Mikrodilüsyon Testi Sonuçları	32
4.3. Satola Testi Sonuçları.....	33
4.4. Popülasyon Analizi profili Sonuçları	34
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	37
6. KAYNAKLAR	43
7. EKLER	51
8. ÖZGEÇMİŞ	54

KISALTMALAR

KNS	: Koagülaz Negatif Stafilokok
MRSA	: Metisiline Dirençli <i>S. aureus</i>
MRKS	: Metisiline Dirençli Koagülaz Negatif Stafilokok
MSSA	: Metisiline duyarlı <i>S. aureus</i>
MSKS	: Metisiline Duyarlı Koagülaz Negatif Stafilokok
PBP	: Penisilin Bağlayan Protein
VISA	: Vankomisine Orta Derecede Dirençli <i>S. aureus</i>
hVISA	: Vankomisine Heterojen Orta Derecede Dirençli <i>S.aureus</i>
Ig	: Immunglobulin
VRSA	: Vankomisine Dirençli <i>S.aureus</i>
BHI Agar	: Brain Heart Infusion Agar
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonun
TEM	: Transmisyon Elektron Mikroskopi
YBÜ	: Yoğun Bakım Üniteleri
GlcNAc	: N-asetil glukozamin
MurNAc	: N-asetil muramik asit
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
CDC	: Center For Disease Control and Prevention
TŞS	: Toksik Şok Sendromu
PV	: Panton- Valentin
SHDS	: Stafilokoksik Haşlanmış Deri Sendromu
CRF	: Coagulase-Reacting Factor
CF	: Clumping Factor
SCC	: Staphylococcal Cassette Chromosome
PA	: Patojenite Adaları
RNA	: Ribo Nükleik asit
MLSB	: Makrolid, Linkozamid ve Streptogramin
IV	: İntravenöz

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1. Çalışmamızda kullanılan sıvı mikrodilüsyon testi plaklarından görüntüler	28
Resim 2. Satola testinde kullanılan petrilerden görüntü	29
Resim 3. PAP-AUC yönteminde kullanılan petrilerden görüntüler	31



GRAFİKLER LİSTESİ

Grafik 1. PAP-AUC'ye göre hVISA çıkan bazı suşların grafiği (1 no'lu PAP-AUC çalışması)	36
Grafik 2. PAP-AUC'ye göre hVISA çıkan bazı suşların grafiği (2 no'lu PAP-AUC çalışması)	36



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. İzolatların tespit edilen MİK değerleri	33
Tablo 2. Satola testi sonuçları.....	34
Tablo 3. PAP-AUC bulguları.....	35



ÖZET

METİSİLİNE DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* İZOLATLARINDA hVISA ORANLARININ BELİRLENMESİ İÇİN İKİ FARKLI YÖNTEMİN KARŞILAŞTIRILMASI

Nesrin SAKARYA

Yüksek Lisans Tezi, Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğretim Üyesi Deniz GAZEL

54 Sayfa, Aralık 2021

Vankomisin, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) enfeksiyonlarının tedavisi için son seçenek antibiyotiktir, ancak son zamanlarda vankomisine karşı direnç ve heterojen direnç bildirmiştir. Vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA) ve vankomisine orta derecede dirençli *S. aureus* (VISA) dışında, stafilokok enfeksiyonlarının tedavi sürecindeki başarısızlığın önemli nedenlerinden birisi de vankomisine heterojen-orta dirençli *S. aureus* (hVISA) olduğu düşünülmektedir, ancak hVISA'yı tespit etmek yoğun emek isteyen ve uzmanlık gerektiren bir prosedürdür. Çalışmamızda Sanko Üniversitesi Hastanesinden izole edilmiş MRSA suşlarında hVISA oranlarının belirlenmesi amaçlanmış, Satola'nın geliştirdiği Brain Heart Infusion agar tarama yöntemi ve altın standart kabul edilen popülasyon analizi profili (PAP-AUC) yöntemi karşılaştırılmıştır. Öncelikle tüm bakterilerin sıvı mikro dilüsyon yöntemiyle MİK değerlerine bakılmış, tüm suşlar vankomisine karşı duyarlı bulunmuştur, daha sonra Satola yöntemi uygulanmıştır ve 48. saatteki sonuçlara göre 28 suş (%46.66) hVISA olarak saptanmıştır. hVISA olarak tespit edilen suşlar PAP-AUC yönteminde değerlendirilmiştir. 28 MRSA suşu içerisinde 12 suş hVISA olarak tespit edilmiştir. Satola testinde hVISA oranı %46.66 (28/60) olarak tespit edilmiştir. Bu izolatlara PAP-AUC metodu ile araştırma yapıldığında sadece 12 suş (tüm izolatların %20'si) hVISA olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda Satola ve PAP-AUC yöntemiyle bölgemizde ilk defa hVISA oranları araştırılmıştır. Satola testi ile PAP-AUC karşılaştırıldığında Satola testinde yalancı pozitiflik oranının yüksek olduğu saptanmıştır.

Anahtar kelimeler: *Staphylococcus aureus*, VISA, hVISA, Popülasyon analizi profili, MRSA

ABSTRACT

COMPARISON OF TWO DIFFERENT METHODS FOR DETERMINATION OF hVISA RATES IN METHICILLINE-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS* *AUREUS*

Nesrin SAKARYA

Master Thesis, Gaziantep University Institute of Health Science

Department of Medical Microbiology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Deniz GAZEL

54 pages December 2021

Vancomycin is the antibiotic of last choice for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections, but resistance and heterogeneous resistance to vancomycin have been reported recently. Except vancomycin-resistant *S. aureus* (VRSA) and vancomycin-moderately resistant *S. aureus* (VISA), one of the important causes of failure in the treatment process of staphylococcal infections is considered to be vancomycin heterogeneous-intermediate resistant *S. aureus* (hVISA). But detecting hVISA is a labor-intensive and specialized procedure. In our study, it was aimed to determine the hVISA rates in MRSA strains isolated from Sanko University Hospital. In addition, we compared Brain Heart Infusion screening agar developed by Satola and the population analysis profile (PAP-AUC) method, which is accepted as the gold standard. First of all, MIC values of all bacteria were determined by broth microdilution method and all strains were found to be sensitive to vancomycin. Then, Satola method was performed and 28 strains (46.66%) were determined as hVISA. The strains detected as hVISA were re-evaluated in the PAP-AUC method. Among 28 MRSA strains, only 12 (20% of all isolates) strains were identified as hVISA. In our study, hVISA rates were investigated for the first time in our region using Satola's method and PAP-AUC method. The rate of false positivity was found to be high when Satola test and PAP-AUC were compared.

Key words: *Staphylococcus aureus*, VISA, h-VISA, Population Analysis Profile, MRSA

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Penisilinler 1940'lı yıllarda kullanılmaya başlanmıştır. Stafilocok enfeksiyonlarının tedavisi için kullanılmış ancak beta-laktamaz enzimi üreten *Staphylococcus aureus* izolatları ortaya çıkmış ve yeni bir antibiyotiğe gereksinim duyulmuştur (1). Bir takım kromozomal kökenli *mecA* geni ile hücre duvarı sentezinde gerekli enzimlerde değişiklik yaparak yeni bir penisilin bağlama proteini (PBP2a) ortaya çıkmış, tüm beta-laktam içeren antibiyotiklere direnç sağlamıştır (2, 3). Bu mekanizmaya metisilin direnci denir ve metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) enfeksiyonları ciddi mortalite ve morbidite nedenidir. Hastane enfeksiyonlarının en sık nedenlerinden birisidir. MRSA suşlarının özellikle hastanelerde insan faktörü ile diğer hastalara yayılır (4). Hastaların başka nedenlerle antibiyotik almaları da bu tedavi seçeneği kısıtlı olan MRSA izolatlarının bu denli yaygın görülmesi tedavi maliyetinde artış, hastaların hastanede kalış süresinde uzama ve artmış mortalite oranlarına neden olmaktadır (5). Stafilocok türlerinde metisilin direncinin saptanması durumunda tedavi seçenekleri arasında hücre duvar sentezini inhibe eden ve beta-laktam halkası taşımayan bir antibiyotik (glikopeptidler gibi) veya hücre duvarı sentezi dışında başka bir metabolik yolu inhibe ederek etkili olan bir antibiyotiğin kullanımı (rifampisin gibi) gereklidir. Bu seçim bakteriyemi ve endokardit gibi ciddi enfeksiyonların tedavisinde glikopeptidler (vankomisin, teikoplanin), lokalize enfeksiyonların tedavisinde de diğer seçenekler şeklinde uygulanmaktadır. Klinikte en yaygın kullanılan glikopeptit grubu antibiyotik vankomisin (6). İlk olarak 1956 tarihinde kullanıma girmiş ve MRSA izolatlarındaki artışla birlikte kullanımı hızlı bir şekilde yaygınlaşmıştır. Dünya'da ilk kez 1997 yılında *S. aureus* suşlarında vankomisine direnç problemi Japonya'dan bildirilmiştir. Bu suşların vankomisin için minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin 8-16 mg/L arasında olduğu saptanmıştır (7). Vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA) (MİK >8mg/L) suşu ise 2002 yılında ise ABD'den bildirilmiştir (8).

1997 yılında Japonya'da Hiramatsu ve ark. (9) vankomisine yeni bir direnç tipi bildirmişlerdir. Bu suşun vankomisin için MİK değerleri duyarlı değerler içerisinde olmasına rağmen popülasyon içerisindeki 10^{5-6} bakteriden birinin vankomisinin 4-9 µg/ml konsantrasyonlarında üreyebildiği, yani "vankomisine heterojen orta derecede duyarlı" (MİK'i >2mg/L) oldukları saptanmıştır. Bu suşlara hVISA adı verilmiştir. Stafilocoklarda, hVISA 'nın nedeni peptidoglikan biyosentezindeki değişikliğe bağlı olarak hücre duvarının kalınlaşması ve düzensiz hale gelmesidir. İlaveten, PBP2

üretiminin aşırı artması ve PBP4 ekspresyonunun olmamasının da direnç mekanizmasında etkili olabileceği bildirilmiştir. Bu güne kadar saptanan ve farklı duyarlılık oranına sahip vankomisine orta düzeyde dirençli (VISA) izolatların, vankomisine uzun süre maruziyet sonrası ortaya çıktığı bildirilmektedir (5). VISA/hVISA suşlarının laboratuvarlarda uygulanan rutin duyarlılık testleriyle saptanması zordur. Rutin duyarlılık testleri popülasyon içindeki dirençli izolatları saptayamadığı için duyarlıların eradikasyonu ve dirençli izolatların seçilmesi bu suşlarla gelişen enfeksiyonların tedavisinde başarısızlığa yol açabilmektedir. Bu izolatların saptanması amacıyla, vankomisin içeren (4-6 mg/L) brain heart infusion agar (BHIA) ile tarama, E-test, makro E-test ve popülasyon analiz profili eğri altı alan (PAP-AUC) gibi farklı yöntemler kullanılmıştır. PAP, bu suşların tespitinde halen altın standart yöntemdir (10-12). Bu izolatların özellikle glikopeptid kullanımı yoğun olan merkezlerdeki prevalanslarının bilinmesi, tedavilerin düzenlenmesine yardımcı olabilir. hVISA'yı tespit etmek yoğun emek ve uzmanlık isteyen zor bir süreçtir. Araştırmamızın amacı; Sanko Üniversitesi Hatanesinde Aralık 2017- Mart 2020 tarihleri arasında izole edilen MRSA suşlarında hVISA prevalansını tespit etmektir. Ayrıca çalışmamızda, Satola ve ark. tarafından geliştirilmiş, pratik ve duyarlı olduğu raporlanan yeni bir hVISA tarama yöntemi ile altın standart kabul edilen PAP-AUC yöntemini karşılaştırmak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Stafilocoklar

2.1.1. Tarihçe

Stafilokokları 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 *Staphylococcus aureus* olarak isimlendirmiştir. Sonradan stafilokoklar, pek çok alt gruba ayrılmıştır (1). Ancak enfeksiyon etkeni olarak çoğunlukla *S. aureus* izole edildiği için çalışmalar daha çok bu bakteri üzerinde yoğunlaşmıştır. Bunun dışında kalan stafilokok alt grupları genel bir isimlendirmeyle koagülaz negatif stafilokok (KNS) olarak adlandırılmışlardır (1). Stafilocok enfeksiyonlarının tedavisi için 1936’dan itibaren sülfonamidler kullanılmıştır. Penisilinin kullanımı 1940 yıllarında başlamış çok sürmeden bu bakterinin savunma mekanizması olan penisilinaz üretmeye başlamasıyla direnç gelişmiştir. 1967 yılının sonlarına doğru neredeyse %80 oranında penisiline karşı direnç oluşmuştur (13). 1961 yılında çeşitli antibiyotik türleri denenmiştir. Bunlardan birisi de metisilindir. Ancak kısa süre içinde bu antibiyotiğe de direnç gelişmiştir (13). 1970 yıllarından sonra metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) çok yaygın görülmüştür. Metisin direnci ise birçok antibiyotik direncini (nafsilin, oksasilin) beraberinde getirmiştir. 1980’lerden itibaren KNS’ların nazokomiyal sepsis, endokardit, osteomyelit gibi birçok enfeksiyon etkeni olduğu ortaya çıkmıştır (14). 1982 ve sonrası hastane enfeksiyonlarında epidemik MRSA izolasyonu artış göstermiştir. Vankomisin ise 1956 yılından itibaren bu izolatlar için kullanılmış ancak hazırlanma aşamasındaki yöntemlerde problemler olduğu için kısa sürede kullanımdan kaldırılmıştır. Daha sonra MRSA’nın yaygınlaşması ve antibiyotik kullanımının kısırlaşması nedeniyle vankomisin tekrar kullanılmaya başlanmıştır. Vankomisine karşı direnç de çok geçmeden oluşmuş ve ilk orta düzeyde direnç 1997 yılında Japonya’da izole edilmiştir. Sonraki yıllarda orta düzeydeki direnç Dünya’nın çeşitli ülkelerinde görülmeye başlamış ve çok geçmeden vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA) varlığı bildirilmiştir. 2002-2004 yıllarında ise ABD’de 3 tip VRSA varlığı bildirilmiştir (15-22).

2.1.2. Morfoloji

Stafilokoklar gram pozitif koklardır ve ismini üreme sonrasında üzüm salkımı görüntüsünden dolayı almıştır. Klinik örneklerde ise tek tek, çiftler halinde veya kısa zincirler şeklinde görülmüştür. Yuvarlak, 0,5-1,5 µm çapında çoğunlukla düzensiz kümeler oluştururlar. Hareketsiz ve sporsuzdurlar. Kapsülsüzdürler. Katalazları özellikle glikozlu besiyerinde pozitifdir. Fakültatif anaeroptur. Doğada çok yaygın bulunurlar. İnsan ve hayvan normal florasında bulunabilirler. İnsanlarda ise %10-15 oranında burunda kolonize olabilirler. Hastanede yatan kişilerde ve sağlık çalışanlarında nazal taşıyıcılık daha fazladır. Nazofarinkste, deri ve perinede kolonize olabilirler. Ancak insanlar için patojendirler ve çok ciddi enfeksiyonlara neden sebep olabilirler (4, 23, 24).

2.1.3. Üreme ve Biyokimyasal Özellikler

Geniş bir ısı aralığında ürerler (6,5-45°C). En iyi üreyebildikleri ısı ise 30-37°C'dir. Kuruluğa dayanıklıdır. Aerop ve fakültatif anaerop bakterilerdir, pH 7-7,5'tir (1). Basit besiyeri de dahil birçok besiyerinde ürerler. En iyi üredikleri besiyeri ise kanlı agardır. Kanlı agarda 18-24 saatte yuvarlak, düzgün 1-4 mm, hafif konveks, S tipi koloni yaparlar. Besiyerinde pigment oluştururlar (*S. aureus* altın sarısı renginde, *S. epidermidis* tebeşir beyazı renginde). Yüksek tuz konsantrasyonunda ürerler (%10 ve daha az NaCL içeren ortamlar). Bazı türleri kanlı agarda tam hemoliz yaparlar ve *S. aureus* beta hemolizi yapar. Glikoz başta olmak üzere pek çok şekeri gaz yapmadan parçalarlar. Mannitolü sadece *S. aureus* parçalar, bu sayede diğer türlerden ayrılır. *Staphylococcus* cinsinde 40 tür ve 24 alt tür bulunur. Türlerin sınıflandırılmasında ise koloni morfolojisi, pigment oluşturma, hemolitik aktivite, koagülaz ve diğer enzimatik aktivite, aerobik koşullarda sükroz, trehaloz ve mannitolden asit oluşturma, asetil metil karbinol (asetoil) oluşturma, fosfataz duyarlılığı, novobiyosin duyarlılığının saptanması kullanılır (4, 6, 23, 24).

2.1.4. Fizyoloji ve Yapı:

2.1.4.1. 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 (25).

2.1.4.2. Hücre Duvarı

Stafilokokların hücre duvarını bir takım yapılar oluşturur. Bu yapılar peptidoglikan, teikoik asit, protein-A şeklinde üç temel elemanı taşımaktadır (4).

2.1.4.2.1. Peptidoglikan Yapı ve Sentezi

Hücre duvarının %50'sini peptidoglikan yapı oluşturur. İnsan vücudunun savunma mekanizmalarından olan lizozim enziminin hedef noktası bu tabakadır. Görevi endojen projenleri stimule etmektir. Bakteriye ozmotik stabilite sağlar. Antikor oluşumunu sağlar. Kompleman aktivasyonunu sağlar. Kemotaksis ve fagositozu inhibe eder (4, 23). Bu yapıyı glikan zincirleri oluşturur. 10-12 arasında değişen N-asetil muramik asit ile N-asetilglukozamin alt ünitelerinden oluşur. Oligopeptit yan zincirleri N-asetil muramik asit alt ünitelerine bağlanır. Daha sonra peptit köprü sayesinde çapraz bağlar yapar. *S. aureus* glikan zinciri pentaglisin köprüler aracılığıyla oligopeptit yapısında bulunan L-lizin ve komşu oligopeptitteki D-alanin arasında çapraz bağlar oluşturur. Gram pozitif bakterilerde bu çapraz bağlar daha sık görülür (25-28). Peptidoglikan tabakasının oluşumunda yer alan enzimlerden birisi penisilin bağlayan proteinlerdir. Bu enzim penisilin ve betalaktam antibiyotikleri için hedef noktadır. Peptidoglikanın oluşması için mürein monomeri sentezlenmelidir. Bu işlem hücre içinde gerçekleşir ve stoplazmada bulunan lipid taşıyıcılar ile hücre dışına aktarılır. Sitoplazmik membranda peptidaglikan yapısına, mürein monomerini katmak için iki enzim bulunur, bunlar glikoziltransferaz ve transpeptidazdır. Glikoziltransferaz mürein monomerini polimerize eder. Peptidoglikan komplemanı aktive ederek interlökin-1 yapımını uyarır ve abse oluşumuna neden olur (4, 23).

2.1.4.2.2. Teikoik Asit

Hücre duvarı kuru ağırlığının %30-50'sini oluşturur. Hücre duvarı için majör komponentlerden birisidir. Teikoik asit türe özgüdür. Peptidoglikan tabakasında bulunan N-asetil muramik asit ünitesine bağlanır. Bağlandığı bir başka yapı ise sitoplazmik membran lipidleridir. Bu polimerlerin yapısında fosfat bulunur. Zayıf immünojen olsalar da özgül antikor üretimine sebep olabilirler. Bu durum nadir de olsa stafilokok enfeksiyonlarının tanısında kullanılabilir. *S. aureus* yapısında ribitol teikoik asit, *S. epidermidis* yapısında da gliserol teikoik asit bulunur (4, 23).

2.1.4.2.3. Yüzey Proteinleri

S. aureus Protein-A sayesinde çok rahat konak dokuya kolonize olabilirler. Üreme sırasında serbest salınan, hücreye bağlı olan ve hücre dışına salgılanan olmak üzere üç tip Protein-A vardır. Bazı Ig'lere bağlanabilen özel bir afiniteleri vardır. IgG₁, IgG₂ ve IgG₃ fc parçalarına bağlanabilirler. Üreme sırasında salgılanması bakteriyi fagositozdan korur. Protein-A varlığı *S. aureus* için spesifik tanılama testi olarak kullanılabilmektedir (27, 29).

2.1.4.2.4. Kapsül ve Slime Tabakası

Stafilokokların çoğunda polisakkarit yapıda bir kapsül bulunur. Kapsül bakterinin bir nevi savunma mekanizmasıdır. Polimorfonükleer lölositlerin fagositozunu engeller. Stafilokokların büyük bir kısmı monosakkaritler, proteinler ve küçük peptitler içeren film tabakası (slime) yapmaktadırlar. Bu madde özellikle avirülen koagüloz negatif stafilokoklarda bulunur. Savunma mekanizmalarından bir diğeridir. Bakterinin kalp kapağı, şantlar, katater gibi yabancı cisimlerde tabaka oluşturmasını ve tutunmasını sağlar (23).

2.1.5. Enzimler

Katalaz: Stafilokokların tamamı bu enzimi üretir. Stafilokoklar bu enzim sayesinde streptokoklardan ayrılır ve toksik yapıdaki hidrojen peroksidi yıkarak su ve oksijene dönüştürürler. Bu sayede bakteri fagositlere karşı direnç kazanır (30).

Koagülaz: Ekstraselülerdir, serbest ve bağlı olmak üzere iki şekilde bulunur ve bir proenzimdir. Önemli bir virülans faktörüdür. Coagulase Reacting Factor (CRF)'e

bağlanıp aktif hale geçerek plazmanın pıhtılaşmasına neden olmaktadır. Koagülaz enziminin varlığı *S. aureus*'u diğer stafilokoklardan ayırır. Patojen stafilokokların çoğunun dış yüzeyinde bağlı (clumping factor: CF) kümelenme faktörü ve serbest (Stafilokinaz) koagülazlar bulunur. Proteolitik enzimler protein yapıdaki serbest koagülazı kolayca aktive eder. Bu enzim fibrinojenin fibrine dönüşümünde rol oynar ve plazmanın pıhtılaşmasını sağlar. Clumping faktör ise stafilokokların hücre yüzeyinde oluşur ve serbest halde değildirler. Doğrudan fibrinojene bağlanarak fibrin oluşmasını sağlarlar. Hücre yüzeyinde fibrin presipitasyonu sonucu stafilokoklar kümeleşmeye ve aglütinasyona uğrarlar. Bu enzimin en önemli rolü bakterinin üzerinin fibrin tabaka ile örtülmesi neticesinde fagositozdan korunmasını sağlamaktır. Bu iki koagülaz da insan serumunu pıhtılaştırma özelliğine sahiptir (14, 31-33).

Hyalüronidaz: ‘Yayılma faktörü’ de denir. *S. aureus* suşlarının birçoğu tarafından salgılanır. Bağ dokudaki hyalüronik asidi parçalar. Bu durum enfeksiyon yayılımının kolaylaşmasına neden olur (14).

Stafilokinaz: ‘Fibrinolizin’ adı da verilen bu enzim fibrin pıhtısını çözerek fibrini parçalar ve organizmanın yayılmasına katkıda bulunur. Isıya dirençlidir (24, 34).

Lipaz: Tüm *S. aureus* suşları bu enzimi salgılar. KNS'lerin %30'undan fazlası bu enzimi salgılar. Yağların hidrolize edilmesini sağlar. Bu sayede lipit içeren bölgelerde bakterinin yaşamasını kolaylaştırır. Stafilokokların oluşturduğu fronkül ve karbonkül enfeksiyonlarının nedeni bu enzimdir (27, 28).

Deoksiribonükleaz (DNase): Isıya dirençli olan bu enzim *S. aureus*'ların %90-96'sında bulur. Visköz DNA'yı parçalayan bir fosfodiesterazdır (14).

Penisilinaz (β -Laktamaz): Bakterinin penisilin grubu antibiyotiklere karşı direnç mekanizmasıdır. Beta- Laktam halkasını etkisiz hale getirir (25).

2.1.6. Toksinler

S. aureus toksinleri ile birçok hastalığa neden olmaktadır (35). Stafilokokların ekzotoksin niteliğinde, eritrosit ve çeşitli hücreler üzerinde sitolitik ve nekrotik etki bırakan birtakım toksinler üretmektedir. Bu toksinler iyi antijendir ve nötrolizan antikor cevabına neden olurlar (1, 36).

2.1.6.1. Sitotoksinler

Alfa Toksinler: Çoğu *S. aureus* suşları tarafından üretilen polipeptit yapıda bir toksindir. Bakteri kromozomu veya plazmidi tarafından kodlanabilir. Birçok hücre tipine toksik etkisi vardır. Hücre membranında 1-2 nm'lik porlar oluşturarak Ca ve Na gibi küçük moleküllerin hücreye alımına sebep olurlar. Bu sayede hücreler şişerek parçalanır ve doku yıkımı gerçekleşmiş olur (1, 36).

Beta Toksinler: Protein yapıda 35000-Da ağırlığında bir toksindir. Stigomiyelinoz C olarak adlandırılır. Patojen *S. aureus* suşunun çoğunda üretilir. Hücre üzerindeki slingomiyelin ve fosfotidiloin yapılarına özgüdür. Bu yapıların bulunduğu hücreler üzerinde toksik etkilidir. Hücredeki slingomiyelin miktarının fazlalığı toksik etkiyi artırır. Hücre membranındaki fosforil yapısının hidrolizini katalize ederek hücrenin parçalanmasına neden olur (4, 37).

Delta Toksini: Polipeptit yapıdadır. *S. aureus*'ların çoğu tarafından üretilir. Eritrositle birlikte bazı hücrelerin membran yapısına deterjan benzeri etki ederek geniş bir stalitik aktivite yapar (4).

Gama Toksini: Polipeptit zincirinden oluşmuştur. Lökosit ve makrofajlara hemolitik etki göstererek parçalarlar. Doku nekrozuna neden olurlar (4, 6).

Eksfoliatif Toksin: Ekzotoksin niteliğinde protein yapıda bir toksindir. A ve B olmak üzere iki formu vardır. A kromozomda bulunur. B ise plazmit tarafından kodlanır. Stratum granulosumda intraepidermal ayrılmalara neden olur. Stafilokoklara bağlı haşlanmış deri sendromunun epidermal nekrozisin ve dermatitin oluşumundan sorumludur (4, 6, 38).

2.1.6.2. Enterotoksin

A, B, C1, C2, D, E ve F olmak üzere yedi tip enterotoksin vardır. Gıda hastalıklarına neden olurlar. 30°C'ye kadar dayanabilirler. Özel antijen yapısındadırlar. Süper antijendirler. A ve D gıda zehirlenmelerinde sık görülür, C ve D enfekte süt ürünlerinde bulunur. B ise psödomembranoz enterokolit yapar ve hastane enfeksiyonu etkenidir. Toksinlerin etki mekanizmaları henüz anlaşılamamıştır. İnce bağırsak mukozasını etkiler. Enterotoksin oluşmuş besinin vücuda alınmasından 2-6 saat içinde bulantı kusma, diyare başlar (4, 23, 36).

2.1.6.3. Toksik Şok Sendromu Toksini (TŞST)

22.000 Da ağırlığında bir egzotoksindir. Yüksek oksijen konsantrasyonunda pH nötr ortamda oluşmaktadır. Süperantijendir. Sitokin salınımına neden olur. Mukozal bariyere tutunabilirler. Epitel hücrelerde çok az miktarda bulunsalar bile büyük bir sitokin salınımına neden olurlar. Özellikle menstrüasyon sırasında kullanılan tampon ve burun kanamalarında kullanılan tampon toksik şok sendromuna neden olmaktadır. Ölüm ile sonuçlanabilir (4).

2.1.6.4. Panton-Valentin Lökositidin (PV)

Lökositidin toksinidir ve lökositik etki gösterir. Lökosit hücrelerinin mebranında por deformasyonuna neden olur. Permeabilitede artış meydana gelir. Hücreler katyon ve ozmotik dayanıklılığını kaybeder organizmayı fagositozdan korur (4).

2.1.7. Patogeneze

Vücutta önceden kolonize olmuş stafilokoklar, immün sistem herhangi bir sebepten ötürü zayıflayınca fırsatçı patojen olarak hastalık yapabilirler. Çeşitli etkenler ile insan vücuduna taşınmasıyla da ortaya çıkabilirler. Bakteri kendine özgü geliştirdiği çeşitli mekanizmalar ile hastalık yapabilmektedir ve konak canlının savunma mekanizmalarından kaçabilmektedir (39). Bunlar; bakterinin fagositlerden kaçabilmeleri, konak dokuya tutunmayı sağlayan proteinleri, toksinleri ve enzimleri şeklinde özetlenebilir (40). Enfeksiyonun seyrinin süresini ve konakta oluşturduğu hasarı bir takım faktörler etkiler. Bunlar; konağın immün sistemi, deri ve mukoza bütünlüğünün durumu, mikroorganizmanın sayısı ve virülans faktörleri, konakta yabancı cisimin varlığı şeklinde özetlenebilir. *S. aureus*'un oldukça virülan bir bakteridir. Çevresel faktörlere dayanıklıdır. Konak Savunma mekanizmasından kaçabilmek için çeşitli yöntemler geliştirmiştir. Antibiyotiklere karşı çok hızlı direnç gösterir. Hastane enfeksiyonlarının sık nedenlerinden biridir ve insan için patojendir. Stafilokoklar insanlarda normal flora elemanı olarak bulunabilirler ancak fırsatçı patojendirler. Fırsatçı patojen olarak ise en sık izole edilen tür *S. epidermidis*'tir. Yabancı cisimler üzerinde slime tabakası sayesinde biyofilm oluşturabilirler (39). *S. aureus*'un kişiden kişiye bulaşı hava yoluyla veya direkt temas ile olabilir. Çok hızlı bir şekilde ve tüm yaş gruplarında kolonize olabilirler. Sık olarak nazofarinkste, ciltte ve perinal bölgede barınabilirler. Bu dokuların bütünlüğünün herhangi bir sebeple

bozulmasıyla alt katmanlarda abseler oluşturan *S. aureus* lokal fagositik mekanizmadan kaçabilirler. Lenfatik kanala ve kan dolaşımına girerek ölümlü sonuçlanan sepsislere neden olabilirler (40, 41).

2.1.8. Epidemiyoloji

İnsan *S. aureus* için doğal kaynaktır. Özellikle nemli deri bölgelerinde geçici kolonizasyonu sık görülür. Yenidoğanlarda perianal bölgede, göbek çevresinde ve deride görülür. *S. aureus* ve KNS gastrointestinal sistem, orofarinks ve ürogenital sistemde bulunur. Sağlıklı yetişkinlerin yaklaşık %30'u *S. aureus* taşıyıcısıdır. Özellikle nazofarinkste ve orofarinkste kolonize olurlar. Bu oran diyabet hastalarında, immün sistemi baskılanmış kişilerde, sık intravenöz girişimlere maruz kalan kişilerde, cerrahi operasyon geçiren kişilerde ve hemodiyaliz hastaları gibi birçok grupta artış göstermektedir (26).

MRSA suşları 1980'li yıllarda hastanede yatan bireyler arasında görülmeye başlamış, 2003'ten sonra da toplumda yayılım göstermiştir. Toplum kökenli MRSA'ların deri enfeksiyonları ve şiddetli pnömoni sebebi olduğu anlaşılmıştır. Hastane ve toplum kökenli MRSA suşlarının birbirinden farklılık gösterdiği görülmüştür. Hatta her ülkede saptanan suşların ortak özellikleri olsa da birbirinde bağımsız ortaya çıktıkları kaydedilmiştir (4, 20, 24, 26, 27).

2.1.9. *Staphylococcus aureus*'un Neden Olduğu Hastalıklar

S. aureus'un virulans faktörleri çok fazladır. Direkt olarak enfeksiyon etkeni olduğu gibi salgıladığı toksinler ile farklı bölgelerde ekstra hastalıklara neden olmaktadır. Çevresel faktörlere karşı çok hızlı adapte olurlar aynı zamanda antimikrobiyal ajanlara çok hızlı direnç geliştirmektedirler.

S. aureus'un neden olduğu hastalıkları 3 grupta toplamak mümkündür. Bunlar;

2.1.9.1. Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları

Selülit, folikülit, fronkül, İmpetigo, karbonkül, hidradenitis suppurativa, mastit ve cerrahi alan enfeksiyonu (42).

2.1.9.2. Toksinlere Bağlı Olarak Ortaya Çıkan Enfeksiyonlar

Stafilokokal haşlanmış deri sendromu (SHDS), toksik şok sendromu (TŞS), besin zehirlenmesi (42).

2.1.9.3. Stafilokokların Yayılımı ile Oluşan Enfeksiyonlar

Bakteriyemi sepsis, kardiyovasküler sistem enfeksiyonları (endokardit, perikardit, mediastinit), pnömoni ve ampiyem, eklem ve kemik enfeksiyonları) (42).

Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları

İmpetigo: Genellikle küçük çocuklarda yüz ve ekstremitelerde görülen yüzeysel bir deri enfeksiyonudur. Hastalık basık, kırmızı küçük bir makül şeklinde ortaya çıkar. Daha sonra içi iltihap dolu vezikül haline gelir. Bu veziküller yırtılarak iltihabı çevre dokuya yayarlar. Kabuklu, bal renkli, dışa drene olmuş kurutlar tipik belirtisidir. Bulaşıcılığı son derece yüksektir. Kreş ve okullarda epidemik salgınlara neden olabilir (43).

Folikülit: Saç ve kıl köklerinde görülür. Tabanı şişkin ve kızarıktır. Az miktarda iltihap görülür. Gözde olduğu takdirde halk arasında it dirseği adıyla bilinir (44).

Fronkül: Folikülitlerin birleşmesiyle ve yayılmasıyla oluşur. Cerrahi insüzyondan sonra kendiliğinden drene olabilir. Ağrılı, sert, kabarık lezyonlardır (44).

Karbonkül: Fronküller birleşerek subkütan dokuya kadar yayılan ağrılı lezyonlar oluşturur. Bu lezyonlara karbonkül denir. Sepsise neden olabilir. Lezyon üzerinde çok sayıda püdrenej bulunabilir (2, 43, 45).

Selülit: Portakal kabuğu görünümündedir. Bu bulgu selülit için tipiktir. Deri ve deri altı enfeksiyonudur (44).

Hidradenitis suppurativa: Çeşitli bölgelerdeki ter bezlerinin enfeksiyonudur. Fronküle benzer lezyonlar oluşur. İyileştiği zaman skar dokusu bırakabilir (46).

Mastit: Emziren annelerin süt kanallarında oluşmuş absedir. Memede kızarıklık, şişlik, sertlik, ağrı ve yoğun bir akıntı vardır (2, 43).

Toksinlere Bağlı Olarak Ortaya Çıkan Enfeksiyonlar

HDS: Haşlanmış deri sendromu sıklıkla bebek ve dört yaşından küçük çocuklarda görülür. Stafilokokların salgıladığı eksfoliyatif toksin ile oluşur. Ağız etrafında bir eritem ile başlar ve büller oluşur. Birkaç gün içinde büller yırtılır ve deri büyük parçalar halinde kalkar. On gün içerisinde iyileşir. Mortalite oranı %5'ten azdır ve ölüm sebebi kalkmış olan deride yerleşen diğer enfeksiyonlardan kaynaklıdır. Bül içerisinde oluşan sıvı berraktır ve lezyonlarda *S. aureus* görülmez (4, 46).

Bülloz impetigo: HDS'nin lokalize olmuş halidir. Eksfoliyatif toksinin lokalize yayılmasıyla oluşur. Bölgesel büller görülür. Bu büller içerisinde sıvıda *S. aureus* izole edilebilir (43).

TŞS: İlk olarak 1928'de *S. aureus* ile kontamine olmuş aşının uygulandığı 21 çocukta görülmüştür (4). 1980 yılında TŞS diye isimlendirilmiş ve adet döneminde olan kadınlarda saptandığı yayınlanmıştır. Adet döneminde kullanılan tamponla ilişkilendirilmiştir. Efficiliği yüksek olan vajinal tamponlarda üreyen *S. aureus*'un salgıladığı TŞST-1 mukozaya geçer ve vücuda yayılır. Hastalığın klinik bulguları; ateş, halsizlik, bulantı, hipotansiyon ve yaygın maküller eritematöz ile aniden başlar (3, 46). Aynı anda santral sinir sistemi, gastro intestinal sistem, hemotolojik, böbrek, karaciğer, kas gibi birçok sistem ve organ etkilenir. Avuç içi ve taban da dahil tüm deride pullu döküntüler olur. Kan kültüründe bakteri izole edilmez ancak çoğu vakada vajinada *S. aureus* izole edilmiştir. Toksik şok sendromu toksini süper antijendir. İmmün sistemin aşırı aktivasyonundan dolayı hastalık ortaya çıkar. Diğer TŞS vakaları cerrahi yara enfeksiyonları, postpartum enfeksiyonlar veya doğrudan intravenöz girişimlerle *S. aureus*'un invaze olmasıyla oluşur (47).

Besin Zehirlenmesi: Enterotoksin üreten stafilokoklar ile enfekte olmuş besinler uygun sıcaklıkta 2-4 saat aralığında kaldığı takdirde bakterinin üremesi ve enterotoksin salgısı artar. Bu besinlerin sindirimi ile besin zehirlenmesi oluşur. Daha çok et, çiftlik ürünleri, karbonhidratlı besinler, proteinli salatalar ve mayonez gibi ürünlerden besin zehirlenmesi oluşur. Sıklıkla enterotoksin A sorumludur. Bulantı kusmayla birlikte karın ağrısı görülür (4).

Stafilokokların Yayılımıyla Oluşan Enfeksiyonlar

Pnömoni: *S. aureus*'un aspirasyon veya kan yoluyla akciğerlere yerleşmesiyle oluşur. Çocuklarda primer kan yoluyla, yaşlılarda üst solunum yolları enfeksiyonlarından sonra sekonder gelişir. Çocukluk çağı için ciddi bir pnömoni grubudur. Akciğerlerde rastlanan hava kistleri ve abselerle karakterizedir. Başlangıç semptomu solunum güçlüğü ile seyreden yüksek ateştir. Hızlı bir seyir ile kusma, diyare, yan ağrıları ve toksik belirtiler görülür (48).

Ampiyem: Aspirasyon ve entübasyon kataterlerinin hastane kökenli *S. aureus*'u akciğerlere taşımasıyla tehlikeli pnömoniler oluşmaktadır (43, 44).

Osteomyelit: *S. aureus* bakterisinin farklı bir odaktan hematogen yolla kemiklere yayılması sonucu meydana gelir. Çocuklarda kemiklerin çok damarlı metafiz bölgesi etkilenebilir. Bu bölgelerde ağrı en sık görülen bulgudur. Yetişkinlerde genellikle vertebralara tutulur, nadiren de olsa uzun kemiklerde görülür. Ateşle birlikte şiddetli bölgesel ağrı vardır (46, 49).

Septik artritis: *S. aureus* tüm yaş gruplarında septik artritin en sık sebebidir. Tutulan eklemlerde ağrı, şişlik, sıcaklık tipik belirtilerdir. Eklem sıvısı bulanıktır. Tek bir odaktan hematogen yayılım ile birçok eklemde sekonder tutulumu olabilir (43).

Sepsis: Stafilokokların oluşturduğu sepsisler çok ciddi enfeksiyonlardır. Mortalite oranları çok yüksektir. Vücudun herhangi yerindeki basit bir enfeksiyonun kana karışmasıyla ciddi bakteriyel enfeksiyonlar oluşabilir, yüksek ateşle seyreder. Hastalarda genel görünüm kötüdür. Yine kan dolaşımıyla farklı dokulara yayılabilir. Hastane kökenli ve toplum kökenli stafilokoklardan bakteriyemiler oluşabilir (43, 47).

Endokardit: *S. aureus* endokarditinin mortalitesi %50 oranlarındadır. Ciddi bir enfeksiyondur. Başlangıçta grip benzeri belirtiler gösterir ve kalp atımında duraksamalara kadar ilerler. Özellikle mitral kapak ve aort kapağında oluşturduğu enfeksiyonlar uzak organlara yayılma oranını artırır. Damar içi ilaç kullananların aksine genelde sol kalp tutulur (43). Patofizyolojisi; enflamasyonlu kapak plazma proteinini bağlayan B1 grubu integrinler üretir. Fibronektin *S. aureus* ile kalp kapağı arasında köprü görevi görmektedir. Kapak üzerinde integrin fibronektin yüzeyine

yerleşen *S. aureus* konak savunma mekanizmalarından ve antibiyotiklerden kaçabilir (4, 43, 49).

2.1.10. Antibiyotik Direnci

Stafilokok enfeksiyonları sağlığı tehdit eden önemli bir sorundur. Bu enfeksiyonların tedavisi için penisilin kullanılmaya başlanmış ancak çok geçmeden penisilin direnci ortaya çıkmıştır. Stafilokoklar geliştirilmiş metisilinlere karşı çok hızlı direnç oluşturmuştur. MRSA özellikle hastane enfeksiyonlarının önemli bir sebebidir ve çok ciddi problemlere yol açar. Antibiyotiklere karşı oluşmuş direnç hastalıkların tedavisinde başarısızlıklara neden olur. Tedavi süresi uzar ve ciddi maddi kayıplar oluşur. Direnç gelişimine sebep olan en önemli faktörler; antibiyotiğin endikasyon dışı kullanılması, uygun dozlarda kullanılmaması ve kullanım süresine uyulmaması olarak sıralanabilir. *S. aureus* birçok direnç mekanizmasına sahiptir. En önemlileri hareketli gen kaset grupları ve patojenite adalarıdır (48). Stafilokoklarda metisilin direnci, *Staphylococcal Cassette Chromosome (SCC)* adında bir takım gen kasetlerinin üzerinde bulunan *mecA (SSCmec)* geni ile oluşur. PBP2a'nın sentezlenmesi sonucu oluşmaktadır. *SCCmec*, hareketli gen gruplarıdır ve MRSA kromozomuna bağlanmış yapılarıdır (2, 50). Bakterinin birçok patojenik özellikleri vardır. Bu özellikler konjugasyon, transdüksiyon ve transformasyon yöntemiyle birbirleri arasında aktarılır. Bakteri kromozomunun üzerinde bazı bölgelerde bir araya gelmiş gen grupları olan patojenite adaları (PA) önemli direnç mekanizmalarındandır. Aynı zamanda bakterinin fiziksel koşullara adaptasyonu, çoğalma özelliğini ve konak canlının bağışıklık sisteminden kaçış mekanizmalarını sağlamaktadır (51, 52).

2.1.10.1. Aminoglikozidlere Karşı Direnç

Bu antibiyotiğe karşı direnç ilaç molekülündeki hidroksil grubunu adenile eden nükleotidiltransferazlar, hidroksil grubunu fosforile eden fosfotransferazlar veya amino grubunu asetilleyen asetiltransferazlar aracılığıyla olur. Bazı MRSA suşları aminoglikozid modifiye edici enzimler üretmektedir (53).

2.1.10.2. Kloramfenikol Direnci

Stafilokoklar, kloramfenikol asetiltransferaz enzimini plazmid veya kromozom kontrolünde sentezleyerek ilacı asetile edip ribozomların 50S alt birimine bağlanmasına engel olur (54).

2.1.10.3. Makrolid, Linkozamid ve Streptogramin B (MLSB) Direnci

Erm geni tarafından kodlanan metilaz enzimileri, 50S ribozomal alt ünitenin 23S rRNA'sına bağlanıp polipeptid uzamasını inhibe eder (4, 54). 23S rRNA'nın metilasyonu sonucu, bir takım enzimlerin inaktive edilmesi ve pompa mekanizması (*msrA*, *mefA* pompa sistemleri) 3 tip direnç oluşumu söz konusudur (4, 55).

2.1.10.4. Tetrasiklin Direnci

Bu antibiyotiğe direnç iki temel mekanizma ile oluşur. Efluks pompa sistemi ve ribozomal korunmadır. Bazen her iki mekanizma birlikte çalışmaktadır. *S. aureus* 'larda efluks pompa sistemi ile ilacın dışarı atılması söz konusudur. Bakterinin ilaca sürekli olarak maruz kalmasıyla başta duyarlı olsa bile bir süre sonra direnç gelişimi görülmektedir. Bu olay plazmid, kromozom veya sıklıkla transpozonlarda bulunan tetrasiklin direnç geni (*tet A-G*, *tet K*, *L*) tarafından üretilen özgül bir membran proteinine bağlıdır (55, 56).

2.1.10.5. Kinolon Grubu Antibiyotiklere Direnç

Kinolonlar grubu antibiyotikler DNA giraz ve topoizomerez IV enzimlerini etkileyerek DNA sentezini inhibe ederler. Stafilokoklar, asıl olarak topoizomerez IV'ü etkilerler. Dış membran proteinlerinin mutasyonu ile bazı kinolonların *S. aureus*'un hücre içine girişi azalır (57).

2.1.10.6. β -Laktamlara Direnç

β -laktamaz enzime bağlıdır. Bilindiği gibi PBP, penisilin gibi β -laktam antibiyotiklerin hedefidir. β -laktam molekülü, yapısal analogu olduğu D-alanil-D alanin bağlanma bölgelerinden stafilokokların PBP'lerine kovalent olarak bağlanır. Bu da PBP'yi inaktive ederek peptidoglikan ağdan hücre rüptürüne sebep olup peptidoglikan sentezinin karşılıklı köprüler oluşturma aşamasını inhibe eder fakat, stafilokoklardan β -

laktam grubuna direnç geliştirmiş bakteriler olan MRSA ve MRKNS, bu direnci çoğunlukla PBP2 veya PBP2a, β -laktamlara bağlanma afinitesi çok düşük olan tek bir PBP sentezleyerek gerçekleştirirler (2, 50). Geniş spektrumlu beta-laktamaz dirençli parenteral bir sefalosporin olan seftabiprol, penisilin bağlayıcı proteinler PBP2a ve PBP2x'e karşı yüksek affinite göstermektedir (58-60).

2.1.10.7. Rifampin Direnci

RNA polimeraz enzimini etkileyerek bakterinin protein sentezini engeller. RNA polimerazın B-altgrubunda noktasal mutasyonlar sonucu yüksek seviyede direnç gelişmektedir. Stafilokok enfeksiyonlarında rifampinin tek başına kullanılmamalıdır (61).

2.1.10.8. Stafilokoklarda Glikopeptid Direnci

Glikopeptid antibiyotiklerin peptidoglikan sentezini önleyerek hücre duvarı yapımını inhibe ederler. Glikopeptid paketi yeni oluşan peptidoglikanla birleşmeye hazır mürein monomerin D-alanil-D-alanin uçları ile etkileşime girerek D-alanil-D-alanin terminalini gizler ve peptidoglikan arasındaki köprünün oluşmasını önler. Kütleleri nedeniyle bağlı glikopeptidler glikoziltransferaz ve transpeptidaz aktivitelerini engeller ve böylece peptidoglikan uzaması durur ve bakterinin hücre duvarı sentezi bozulur (62). Bu temel mekanizma dışında RNA sentezinin inhibisyonu ile plazma membran fonksiyonlarını ve hücre duvarında fosfolipid siklusunu bozarak bakterisidal etki de gösterirler (63). *E. Faecalis*'in konjugatif plazmiddeki transpozonda bulunan ve çoklu direnç oluşumunu sağlayan *vanA* geni *invivo* olarak *S. aureus*'a aktarılmıştır (4). Günümüzde dek *S. aureus* kökenlerinde üç farklı vankomisin direnci tanımlanmıştır. Bunlardan ikisi, 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 (63).

2.1.10.9. Oksazolidinon Direnci

S.aureus'ta ribozomal hedef bölgede veya 23S rRNA'daki mutasyon ile direnç gelişebileceği düşünülmüştür (64).

2.1.10.10. Daptomisin Direnci

S. aureus kökenlerinde molekülün hücre membranına bağlanmasının azalmasıyla gelişmektedir. Daptomisine karşı direnç çok sık karşılaşılan bir durum değildir ve kendiliğinden oluşmuş bir direnç çok nadirdir (64).

2.1.10.11. Metisilin Direnci

Bir stafilokok suşunda metisilin direnci saptanırsa eğer, bu suş diğer tüm β -laktam antibiyotiklere karşı dirençli olduğu kabul edilir (65, 66). Stafilokoklardaki metisilin direnci; kromozomal (intrinsik), fazla miktarda β -laktamaz salınımı ve PBP'lerdeki yapısal değişiklikler olarak üç farklı şekilde gerçekleşir.

Kromozomal (intrinsik) metisilin direnci: En sık karşılaşılan direnç mekanizmadır. Metisilin direncine neden olan transpozonların bulunduğu gen kaseti ve *mecA* genini taşıyan plazmid bakteri kromozomuna bağlanmaktadır. MRSA izolatları *mecA* geninin de etkisi ile PBP2a denilen yeni bir PBP oluşturmaktadır. β -laktam antibiyotikler PBP2a proteinine PBP'ne nazaran daha düşük afinite gösterir. Bu yüzden β -laktam antibiyotikler PBP2a bağlanamamaktadır. Sonuç olarak bakterinin hücre duvarı sentezi için gerekli olan peptidoglikan oluşumu devam etmektedir (42, 46). Bu direnci üç farklı şekilde gerçekleşmektedir.

a) Homojen direnç; tüm kolonide *mecA* vardır ve PBP2a sentezi yapılabilmektedir dolayısıyla bütün kolonide yüksek derecede metisilin direnci mevcuttur (42, 46).

b) Heterojen direnç; klinikte diğer direnç tiplerine nazaran daha sık görülür. Kolonideki tüm bakteriler *mecA* taşırlar ancak 10^6 ile 10^8 bakteriden birinde metisilin direnci daha yüksektir. Bu direnç indüklenebilir özelliktedir ve *factors essential for the expression of methicillin resistance (fem)* sisteminin neden olduğu düşünülmektedir (42, 46).

c) Eagle-tip direnç; suşlar düşük metisilin konsantrasyonlarında metisiline duyarlı iken, yüksek konsantrasyonlarda dirençlidirler. Bu tip direncin, sağlam *mecA* regülatör genlerinin yüksek metisilin konsantrasyonlarında PBP2a sentezini indüklemeleri sonucu olduğu düşünülmektedir (67).

Aşırı miktarda β -laktamaz salgılanması: McDougal ve ark. aşırı β -laktamaz üretiminin metisilin direncine neden olabileceğini göstermişlerdir. Bu suşlara Borderline resistant *S. aureus* (BORSA) da denmektedir (68).

PBP'lerdeki yapısal değişiklikler: PBP'lerin yapısının mutasyonel değişimi ile böyle bir direnç tipinin ortaya çıktığı düşünülmektedir. Son yıllarda β -laktamaz üretmeyen ve *mecA* genini bulundurmamalarına rağmen, az sayıda olsa metisiline dirençli kökenler tespit edilmiştir. Mevcut PBP'lerin β -laktam antibiyotiklere düşük afinite gösterdikleri görülmüştür. Bunun sonucu olarak bu tip dirençli suşlara Modified resistant *S. aureus* (MODSA) adı verilmektedir (69, 70). Metisilin direncinin bir diğer nedeni olarak *factors essential for the expression of methicillin resistance (fem)* veya *auxiliary (aux)* adı verilen, bir takım protein kodlayan genlerin olduğu düşünülmektedir. Bu genler *mecA* gen bölgesinden farklı bölgede bulunmaktadır. *Fem* faktörlerinin çoğu peptidoglikan yapımında rol oynar fakat PBP2a'yı etkilememektedirler. Peptidoglikan zincirleri arasında glisin rezidüleri ekleyerek pentaglisin yapıyı oluştururlar (71). *Fem* faktörlerinin enzimatik aktiviteleri vardır. Direkt olarak metisilin direncine etki ederler. *Fem* sitemindeki mutasyonlar, peptidoglikan yapısının değişmesi ile sonuçlanmakta ve β -laktamaz ile metisilin direncini etkileyebilmektedir (61, 71).

2.1.11. VISA, VRSA ve hVISA

Vankomisin 1980 yıllardan sonra MRSA'ların sık görülmeye başlanmasıyla stafilokok enfeksiyonları için kullanımı artmıştır. Sık ve yanlış glikopeptid kullanımı bu antibiyotikleri karşı direnç oluşumunu akla getirmiş ve çok geçmeden 1996 yılında Japonya'da "vankomisine orta duyarlı *S. aureus*" suşu Hiramatsu ve ark. tarafından bildirilmiştir (7). Vankomisin için MİK değeri 8 $\mu\text{g/ml}$ ve azalmış duyarlılığı olan bu suşlara "VISA" denmiştir (MİK 4-8mg/L). Hiramatsu ve ark. 1997 tarihinde vankomisine yeni bir direnç tipi daha bildirmişlerdir. MRSA suşunun vankomisin için MİK değerleri duyarlı sınırlardadır (MİK $\leq 2\text{mg/L}$) ancak popülasyon içerisindeki 10^{5-6} bakteriden birinin vankomisinin 4-9 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında üreyebildiği, yani "vankomisine heterojen orta derecede duyarlı" (MİK'i $>2\text{mg/L}$) olarak saptanmışlardır. Bu suşlara hVISA adı verilmiştir (9). Vankomisine dirençli *S. aureus* ise ilk olarak (VRSA) 2002 yılında ABD'nin Michigan eyaletinden bildirilmiştir (MİK $>8\text{mg/L}$). Diyabet hastasının kronik ayak ülseri ve diyaliz kateterinin ucundan izole edilmiştir. Bu suшта vankomisin için MİK değeri 128'den büyük bulunmuştur (MİK $>128 \mu\text{g/ml}$) (8).

İlk klinik VISA (Mu50) suşu için vankomisin direncinin nasıl oluştuğuna dair çok geniş çalışmalar yapılmıştır (72). Mu50 suşu biyokimyasal ve transmisyon elektron mikroskopi (TEM) ile incelenmiş sonuç olarak bakteride peptidoglikan sentezinin arttığı görülmüştür. Bu nedenle normalden daha çok vankomisin molekülü peptidoglikan tabakasına takılarak peptidoglikan sentezinin meydana geldiği sitoplazmik membrana ulaşamamaktadır. Peptidoglikan tabakasındaki artışın mürein monomerlerinin artışına da neden olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle Mu50 suşunda çoğalmış mürein monomerlerini tutmak için daha yüksek konsantrasyonlarda vankomisin gerekmektedir. Tespit edilmiş tüm VISA suşlarının direnç mekanizması hücre duvarı kalınlaşmasıyla oluşmuştur. TEM ile yapılan ölçümlere göre 7 ülkeden izole edilmiş 16 VISA izolatının hücre duvarı kalınlığı, vankomisine duyarlı suşların hücre duvarı kalınlığına oranla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. 16 VISA suşundan 15'nin vankomisin içermeyen besiyerinde yapılan 10-84 günlük seri pasajlardan sonra vankomisine dirençli alt gruplar popülasyon analiziyle tespit edilmiştir. Tüm suşlarda bu pasajlar sonucunda VSSA suşlarından ayırt edilemeyecek kadar hücre duvar kalınlığında azalma görülmüştür. Tekrar vankomisin kullanılmasıyla birlikte hücre duvarı yine kalınlaşma göstermiş ve vankomisin direnci tekrar ortaya çıkmıştır (73). Teorik olarak hücre duvarındaki peptidoglikan tabakalarının kalınlaşması 2 şekilde oluşur. Birincisi, Mu50 suşunda olduğu gibi aşırı miktarda peptidoglikan üretimidir. İkincisi ise peptidoglikan döngüsünün azalmasıdır. Peptidoglikan tabakalarının üretildiği yer sitoplazmik membranın yüzeyidir. Yeni sentezlenmiş peptidoglikan tabakaları daha eski peptidoglikan tabakasının yerine geçer ve en sonunda parçalanarak hücre yüzeyinden dışarıya atılırlar. Peptidoglikanı hidrolize eden otolitik enzimler bu parçalama olayında rol alır. Tüm bu olayların sonucunda peptidoglikan tabakalarındaki D-alanil-D-alanin oranı artar. Mu50 suşu ile yapılmış çalışmalarda saflaştırılmış peptidoglikan tabakadaki D-alanil- D-alanin rezidüsü, VSSA suşlarında bulunan tabakadan 2-4 kat daha fazladır (7, 70). Bunun anlamı; hücre duvarı 1,5 kat daha kalın olan Mu50 hücresi, MSSA suşuna göre neredeyse 3-6 kat daha fazla vankomisin molekülünü tutar. Bu konuyla ilgili yapılan bazı çalışmalarda peptidoglikan çapraz bağlarındaki azalma, glikopeptid direncinin tek başına sebebi değilken, bakterinin kalınlaşmış hücre duvarına sahip olması peptidoglikan çapraz bağlarındaki azalmanın direnç gelişimine katkıda bulunduğunu göstermiştir (9). Sonuç olarak bir bakteride hücre duvarının kalınlaşmış olması ve amid grubu eklenmemiş mürein monomerlerinin üretiminin artmış olması o bakteri için vankomisin direncinin varlığını düşündürmektedir. Amid grubu eklenmemiş

müreın monomerleri normal müreın monomerlerine göre vankomisine daha düşük afinite göstermektedirler (7). Bu nedenle, anormal müreın monomerlerinin üretiminin de Mu50'nin vankomisin direncine katkıda bulunduğu ileri sürölmektedir (9). Vankomisin direncinin hangi genetik temele dayandığı henüz netleştirilmemiştir. Son yıllarda izole edilen bazı stafilokokların metisiline duyarlı oldukları halde, vankomisine dirençli oldukları görölmüştür. Vankomisin direncinin MRSA ile sınırlı olmadığına dair yeni bir bilgi daha sağlamıştır (74). Bir olguda hVISA'nın tespit edilmiş olması, MRSA enfeksiyonunda karşı vankomisinin tedavisinin başarısızlığının bir nedeni olabilir (75). Fakat hVISA'nın klinik anlamını halen netleşmemiştir. Bunun nedeninin hem hVISA'nın bildirildiği çok az sayıda vaka bulunmaktadır, hem de mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılan rutin duyarlılık testleriyle hVISA tespitinin yapılamamasıdır. Disk difüzyon mikrodilüsyon ve gibi rutin duyarlılık testleri hVISA ve VSSA ayırımını tam olarak yapılamamaktadır (76). Vankomisin için MİK değeri duyarlı olmasına rağmen koloni içindeki 10^{-6} bakterinin, vankomisinin 4-8 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonunda üreyebildiği, yani vankomisine orta düzeyde duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Bu suşun adına Mu3 denmiştir ve heterojenöz bir popölasyona sahip olduğu için hVISA olarak tanımlanmıştır (7, 8, 77). CLSI'nin standart duyarlılık testleri için önerdiği inokulasyon yoğunluğu 5×10^5 CFU/ml'dir (78). Fakat özellikle hVISA 10^6 CFU/ml yoğunlukta tespit edildiği için örnekleme yanlışlığı nedeniyle belirlenememektedir. Bu yüzden 10^6 'lık bir popölasyonu analiz edebilen bir yöntem kullanılmalıdır. Popölasyon analizi profili eğri altı alanı (PAP-AUC) hVISA (Mu3) ve VISA (Mu50) suşlarını tespit etmedeki başarı oranı ve etkinliği %100 olarak bulunmuştur. Bu sebeplerden dolayı halen PAP-AUC yöntemi birçok araştırmacı tarafından VISA ve hVISA kökenlerinin tanımlanmasında altın standart olarak kabul edilmektedir (10, 11, 12). Sağlık çalışanları, MRSA, VISA ve hVISA için taşıyıcı görevi görmektedir. Dolayısıyla hVISA'nın klonal yayılımında rol oynamaktadır (79). 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 (79). Vankomisin, hVISA popölasyonunun %99.9'unu baskılayabilmektedir ancak kalan popölasyon yüksek vankomisin konsantrasyonunda bile yaşamaya devam eder. VISA izolatları vankomisin tedavisine rağmen hayatta kalabilmek için hücre duvarı kalınlığını arttırırlar. Bu durum çok fazla enerji sarf etmelerine neden olmaktadır. Vankomisin baskısı ortadan kalktığında enerji

depolamak için VISA'lar hVISA durumuna geçerler. *S. aureus*, için bu durum gerçek bir hayatta kalma başarısıdır ve bu bakteriyi tehlikeli bir patojen yapmaktadır (75).



3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Bu tez 14.01.2021-26.07.2021 tarihleri arasında Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TF. YLT. 21.5 proje numarası ile desteklenmiştir.

3.1.1. Kullanılan Malzemeler

3.1.1.1. Sıvı Mikrodilüsyon Testi

1. Besiyeri (%5 koyun kanlı agar, Katyon Müller Hilton Broth (Oxoid) (KAMHB))
2. 96 kuyucuklu U tabanlı mikroyay
3. Steril serum fizyolojik
4. Pipet ucu 1000 µl ve 10 µl
5. Distile su
6. Cam kavanoz
7. Steril öze
8. Balon joje
9. Steril bant
10. Vancomisin (Sigma-Aldrich USA)
11. Standart *S. aureus* ATCC 25923 suşu
12. Cam tüp
13. Steril spanç
14. Ependorf
15. Falkon tüp 15 ml ve 50 ml'lik

3.1.1.2. Satola Testi

1. Besiyeri (Kazein içeren Brain Heart İnfüzyon Agar (Oxoid) (BHIA-VC))
2. Vankomisin (Sigma-Aldrich USA)
3. Distile su
4. Steril serum fizyolojik
5. Steril cam kavanoz
6. Steril petri kutusu
7. Pipet ve pipet ucu 1000 µl ve 10 µl
8. Cam tüp
9. Mezur
10. Bek alevi
11. Steril öze
12. Ependorf tüpü
13. Standart hVISA (Mu3) ATCC 700698 suşu

3.1.1. 3. Popülasyon Analizi Profili Eğri Altı Alan Hesaplanması

1. Besi yeri (Kazein içeren Brain Heart İnfüzyon Agar (Oxoid) (BHIA-VC))
2. Vankomisin (Sigma-Aldrich USA)
3. Distile su
4. Steril serum fizyolojik
5. Steril cam kavanoz
6. Steril petri kutusu
7. Pipet ve pipet ucu 1000 µl ve 10 µl
8. Cam tüp

9. Mezur

10. Bek alevi

11. Steril öze

12. Ependorf tüpü

13. Standart hVISA (Mu3) ATCC 700698 suşu

3.1.2. Cihazlar

1. Etüv (Mermert)

2. Vorteks (Heidolph)

3. Mc Farland cihazı (Biomerieux)

4. Negatif basınçlı güvenlik kabini (CHC-CleAir)

5. Tartı (Ender)

6. Otoklav (Nüve)

7. Pastör fırını (İejotech)

8. Buz dolabı (Vestel)

3.2. Metod

3.2.1. Suşların İzolasyonu ve Saklanması

Aralık 2017- Mart 2020 tarihleri arasında Sanko Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarında izole edilmiş ve Sanko Üniversitesi arşivinde 150 ml/L saf gliserol ve 850 ml/L nutrient broth içeren (GBL) boncuklu tüp kullanılarak -80°C’de stoklanmış 60 MRSA izolatu kullanıldı. Bu suşların tanımlanması ve antibiyogramı öncelikle VITEK 2 otomatik identifikasyon sistemi ile yapıldı ve MRSA oldukları belirlendi. Suşlar transferden 1 gün öncesinde %5 koyun kanlı agarında pasajlandı. Üç katmanlı, 4 yivli tutma kulplu contalı sızdırmaz kapaklı taşıma kabına sıcaklığın 2-8°C olması için buz aküsü yerleştirilmiş taşıma kabında enfeksiyöz madde taşıma yönetmeliğine uygun şekilde Gaziantep Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına taşındı. Burada 150 ml/L saf gliserol ve 850 ml/L nutrient broth içeren (Pro-lab)

boncuklu tüp kullanılarak -80°C’de stoklandı ve her çalışmadan önce ana tüp kullanılarak %5 koyun kanlı agarında iki kez pasajlandı.

3.2.2. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

Vankomisin için MİK değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir. MİK değerlerinin belirlenmesinde, “Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Derneği 2. Antibiyotik Duyarlılığı İçin Fenotipik Yöntemler Kursu” rehberinde yer alan sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanıldı ve EUCAST kriterlerine göre değerlendirildi (77, 80).

3.2.2.1. Vankomisinin Tartılması

Vankomisinin potensi 1000 alındı.

$$Hacim(ml) = \frac{Ağırlık(mg) \cdot Potens(\mu g/mg)}{Konsantrasyon(\mu g/ml)}$$

Formülü kullanıldı. 100 mg toz tartıldı (80).

3.2.2.2. Stok Çözeltinin Hazırlanması

Steril edilmiş distile su kullanıldı. Yeteri miktarda vankomisin ve distile su steril kavanozda birleştirilip vortexlendi. 512 µg/ml konsantrasyonunda stok çözelti elde edildi. Uygun koşullarda küçük hacimler halinde +4°C de aynı gün kullanılmak üzere saklandı (80).

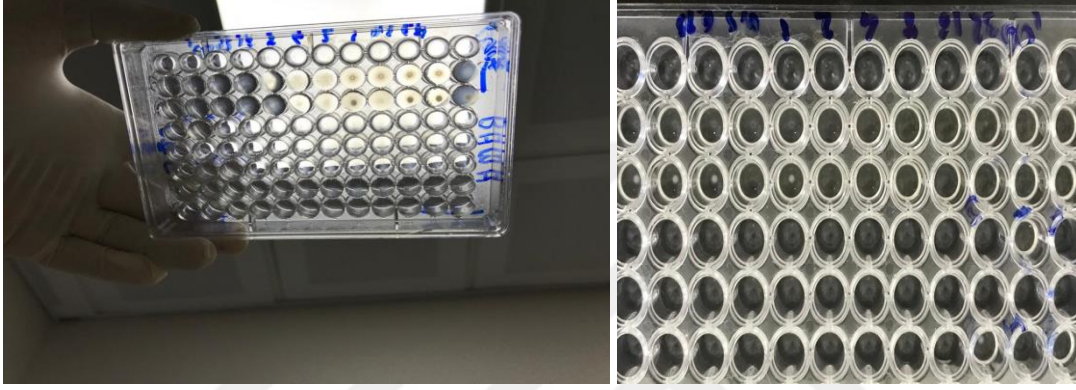
3.2.2.3. Besiyerinin Hazırlanması

Katyon Ayarlı Mueller Hilton Broth (KMHB) besi yeri kullanıldı. Kutunun üzerindeki ölçülere göre distile su ile karıştırılan besiyeri balon joje ile otoklavlandı (80).

3.2.2.4. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması ve İnokülasyonu

-80°C’de stoklanan 60 MRSA suşu ve *S. aureus* için kontrol suşu olarak kullanılan ATCC 25923 suşu %5 koyun kanlı agarında iki kez pasajlandı. Test tüpleri 3 ml serum fizyolojik ile dolduruldu. Üzerine steril öze ile kolonilerden bir miktar bakteri alınıp eklendi. Vorteks cihazı ile karıştırıldı ve 0,5 Mc Farland bulanıklığında bakteri süspansiyonu elde edildi. Hazırlanan besiyeri 96 kuyucuklu U tabanlı mikroyuvarlara

her bir kuyucuğa 100 µl olacak şekilde koyuldu. Plaklarda steril kontrol kuyucuğu ve üreme kontrol kuyucuğu oluşturuldu. Antibiyotik stok solüsyonundan her suş için ayrı olacak şekilde ilk kuyucuğa 100 µl koyuldu. Pipet yardımıyla seri dilüsyonlar yapıldı ve son kuyucuktaki 100 µl atıldı. Bakteri süspansiyonu kullanılmadan önce 1/10 oranında dilüe edildi. Her bir kuyucuğa 5 µl eklendi. Steril kontrol kuyucuğuna eklenmedi. Plakların yüzeyi steril bantla kaplandı. 37°C'deki etüve 24. saatinde okunmak üzere bırakıldı. Gözle görülür üremenin olmadığı kuyucuk konsantrasyonu MİK değeri olarak kabul edildi (80).



Resim 1. Çalışmamızda kullanılan sıvı mikrodilüsyon testi plaklarından görüntüler

3.2.3. Satola testi

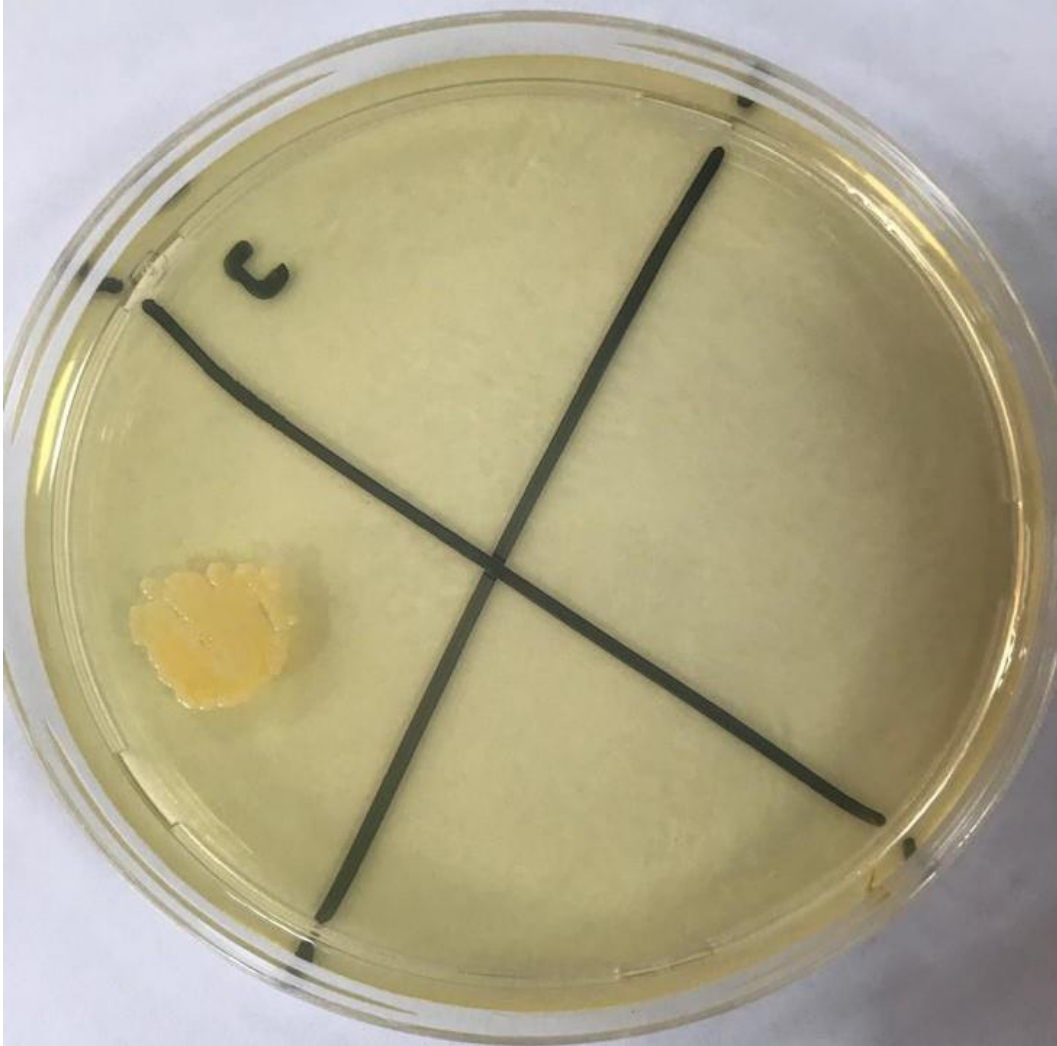
3.2.3.1. Besiyerini Hazırlanması

Satola ve arkadaşları tarafından önerilen bu yöntemde 16 g/l kazein içeren BHI agara her plağa 4 µg/l vankomisin olacak şekilde eklendi. Öncelikle kullanım talimatına göre besi yeri distile su ile birleştirilip otoklavlandı. 512 µg/ml konsantrasyonundaki antibiyotik solüsyonundan tüm steril petrilerin ortasına 156 µl damlatıldı. Sıvı haldeki sıcak besiyeri antibiyotiğin üzerine mezür yardımı ile 20 ml ölçülerek döküldü. Plaklar hafifçe ekseni etrafında döndürüldü. Antibiyotik ve besiyerini karışması sağlandı. Son olarak bek alevinden geçirildi (81, 82).

3.2.3.2. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması ve İnokülasyonu

-80°C stoklanan 60 MRSA suşu ve hVISA için kontrol suşu olarak kullanılan ATCC 700698 (Mu3) suşu %5 koyun kanlı agarında iki kez pasajlandı. Test tüpleri 3 ml serum fizyolojik ile dolduruldu. Üzerine steril öze ile kolonilerden bir miktar alınıp eklendi. Vortekslendi ve 0,5 Mc Farland bulanıklığında bakteri süspansiyonu elde edildi.

Hazırlanan besiyeri petrinin dış yüzeyinden dört kadrāja ayrılacak şekilde çizildi. Her bir bakteri süspansiyonundan bir petrinin tüm kadrıjlarına 10'ar µl pipet yardımı ile damlatıldı. Bir petride toplam 40 µl damlacık oluştu. 5 dk boyunca kurumaya bırakıldıktan sonra 35°C'lik etüve 48. saatlerinde okunmak üzere bırakıldı. En az bir kadrıjda 2 veya daha fazla koloninin olması satola testine göre hVISA olarak tespit edildi (81, 82).



Resim 2. Satola testinde kullanılan petrilerden görüntü

3.2.4. Popölasyon Analizi Profili Eğri Altı Alan Hesaplanması

Bu yöntemde her bir suş için toplamda 56 petri kullanıldı. Satola testinde pozitif bulunan suşlar farklı dilüsyonlarda yine farklı antibiyotik konsantrasyonu içeren besiyerlerine ekildi (9, 83).

3.2.4.1. Besiyerinin Hazırlanması

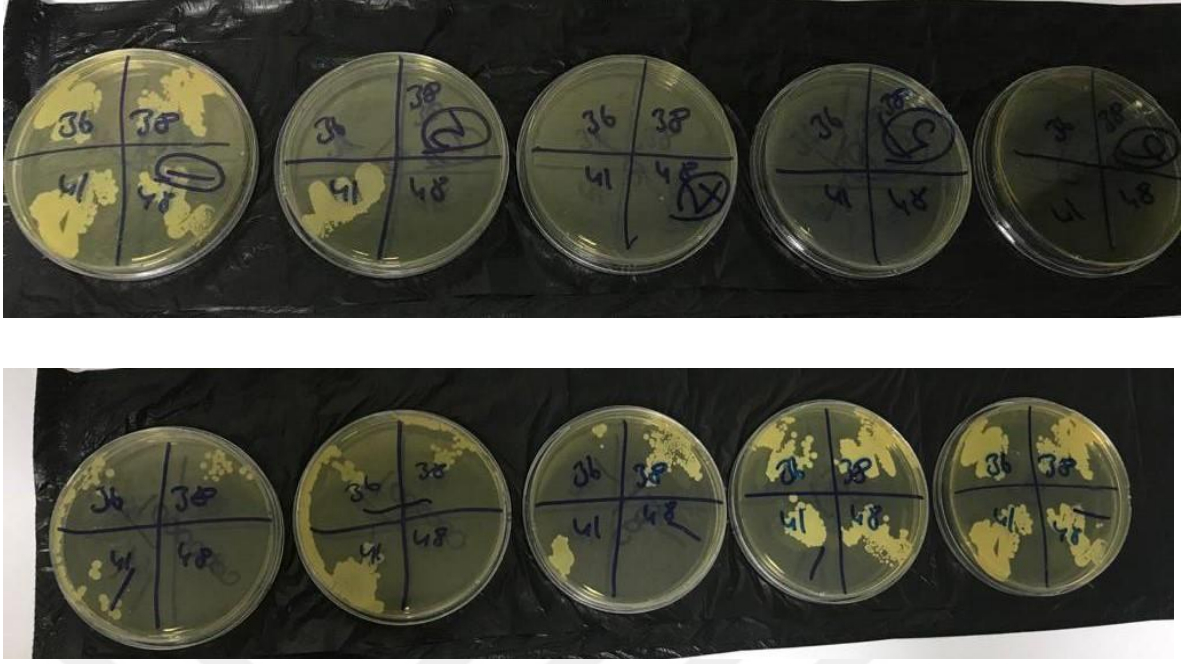
Bir suş için her konsantrasyondan 8 adet olacak şekilde 1, 2, 4, 5, 6, 8 ve 10 µg/ml vankomisin BHI agar plakları hazırlandı. Steril petrilerin ortasına 512 µg/ml'lik antibiyotik stok solüsyonundan yukarıdaki konsantrasyonları sağlayacak şekilde pipet yardımıyla damlatıldı. Sıvı haldeki sıcak besiyeri antibiyotiğin üzerine mezür yardımı ile 20 ml ölçülerek döküldü. Plaklar hafifçe eksen etrafında döndürüldü. Antibiyotik ve besiyerini karışması sağlandı. Son olarak bek alevinden geçirildi (9, 83).

3.2.4.2. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması ve İnokölasyonu

-80°C stoklanan 60 MRSA suşu ve hVISA için kontrol suşu olarak kullanılan ATCC 700698 (Mu3) suşu %5 koyun kanlı agarında iki kez pasajlandı. Pipet yardımı ile 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} olacak şekilde ependorf tüplerine seri dilüsyonlar yapıldı. Her bir seri dilüsyondan, her bir antibiyotik konsantrasyonlu besi yerine 50 µl damlatılarak yayıldı. Bu işlem satola testindeki tüm pozitif suşlar için ve Mu3 suşu için uygulandı. Petriler 35°C'deki etüvde inkübe edildi. 24. ve 48. saatte üreyen koloniler sayıldı.

3.2.4.3. Popölasyon Analizi Profili Eğri Altı Alan Hesaplanması

Antibiyotik konsantrasyonları x ekseninde, koloni sayılarının logaritması y ekseninde olacak şekilde tüm suşlara grafik oluşturuldu. Microsoft Excel programında oluşan bu grafiklerin eğri altı alanları hesaplandı. Çalışma izolatlarının eğri altı alanları eşzamanlı çalışılan Mu3 suşunun eğri altı alanına bölündü. Çıkan oran 0,9-1,3 aralığında ise hVISA olarak kabul edildi (9, 83).



Resim 3. PAP-AUC yönteminde kullanılan petrilerden görüntüler

4. BULGULAR

4.1. İzolatların Örnek ve Bölümlere Göre Dağılımı

Sanko Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarında izole edilen 60 MRSA suşu uygun koşullarda stoklanıp Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına taşındı. Çalışmada kullanılan MRSA suşların 17'si (%28,33) yara yerinden, 2'si (%3,33) kataterden, 17'si (%28,33) kandan, 22'si (%36,66) solunum yolu örneklerinden (trakeal aspirat, balgam), 1'i (%1,66) fistülden, 1'i (%1,66) plevral sıvı kültüründen izole edildi. Bu suşların servise göre dağılımı 3'ü (%3) yenidoğan yoğunbakım ünitesinden, 2'si (%3,33) kardio vasküler cerrahi servisinden, 27'si (%45) cerrahi yoğunbakım ünitesinden, 11'i (%18,33) polikliniklerden, 17'si (%28,33) diğer servisler şeklindedir.

4.2. İzolatların Vankomisin İçin Sıvı Mikrodilüsyon Testi Sonuçları

2 MRSA suşunun MİK değeri 0,125 µg/ml, 12 MRSA suşunun MİK değeri 0,25 µg/ml, 44 MRSA suşunun MİK değeri 0,5 µg/ml ve 2 MRSA suşunun MİK değeri 1 µg/ml olarak bulunmuştur. Çalışmamızda incelenen suşların hiç birisinde vankomiksin için dirençli veya orta duyarlı düzeyde MİK değeri tespit edilmemiştir.

Tablo 1. İzolatların tespit edilen MİK değerleri

İzolat no	MİK Değerleri(µg/ml)	İzolat no	MİK Değerleri(µg/ml)
1	0,5	31	0,5
2	0,25	32	0,5
3	0,5	33	0,5
4	0,5	34	0,5
5	0,5	35	0,5
6	0,25	36	0,5
7	0,5	37	0,5
8	0,5	38	0,5
9	0,5	39	0,5
10	0,25	40	0,5
11	0,5	41	0,5
12	0,5	42	0,5
13	0,5	43	0,5
14	0,5	44	0,5
15	0,5	45	1
16	0,5	46	0,125
17	0,5	47	0,25
18	0,5	48	0,25
19	0,5	49	0,5
20	0,5	50	0,25
21	0,25	51	0,25
22	0,25	52	0,5
23	0,25	53	0,5
24	0,5	54	0,5
25	0,5	55	1
26	0,5	56	0,5
27	0,25	57	0,5
28	0,5	58	0,5
29	0,125	59	0,5
30	0,25	60	0,5

4.3. Satola Testi Sonuçları

Öncelikle MİK değerleri duyarlı olarak konfirme edilen, 60 MRSA suşu satola yöntemiyle değerlendirildi. Satola testinde 48. saatteki verilere göre 28 (%46,66) izolat hVISA olarak tespit edildi. hVISA standart suşu olan Mu3 suşu diğer suşlarla birlikte eşzamanlı çalışıldı.

Tablo 2. Satola testi sonuçları

İzolat no	24.saatte	48.saatte	İzolat no	24.saatte	48.saatte
1	Ü.Y	Ü.Y	31	Ü.Y.	Ü.Y.
2	hVISA	hVISA	32	hVISA	hVISA
3	hVISA	hVISA	33	Ü.Y.	Ü.Y.
4	hVISA	hVISA	34	Ü.Y.	Ü.Y.
5	Ü.Y	Ü.Y	35	Ü.Y.	Ü.Y.
6	hVISA	hVISA	36	Ü.Y.	Ü.Y.
7	Ü.Y	Ü.Y	37	Ü.Y.	Ü.Y.
8	Ü.Y	Ü.Y	38	Ü.Y.	Ü.Y.
9	hVISA	hVISA	39	hVISA	hVISA
10	hVISA	hVISA	40	hVISA	hVISA
11	Ü.Y	Ü.Y	41	hVISA	hVISA
12	Ü.Y	Ü.Y.	42	hVISA	hVISA
13	hVISA	hVISA	43	Ü.Y.	Ü.Y.
14	hVISA	hVISA	44	Ü.Y.	Ü.Y.
15	Ü.Y	Ü.Y	45	Ü.Y.	Ü.Y.
16	hVISA	hVISA	46	hVISA	hVISA
17	Ü.Y	Ü.Y.	47	Ü.Y.	Ü.Y.
18	Ü.Y	Ü.Y	48	Ü.Y.	Ü.Y.
19	hVISA	hVISA	49	Ü.Y.	hVISA
20	hVISA	hVISA	50	hVISA	hVISA
21	Ü.Y	Ü.Y	51	Ü.Y.	Ü.Y.
22	hVISA	hVISA	52	Ü.Y.	Ü.Y.
23	Ü.Y.	Ü.Y.	53	hVISA	hVISA
24	hVISA	hVISA	54	Ü.Y.	Ü.Y.
25	hVISA	hVISA	55	hVISA	hVISA
26	hVISA	hVISA	56	hVISA	hVISA
27	Ü.Y	Ü.Y	57	Ü.Y.	Ü.Y.
28	Ü.Y.	Ü.Y.	58	hVISA	hVISA
29	Ü.Y.	Ü.Y.	59	Ü.Y.	Ü.Y.
30	hVISA	hVISA	60	Ü.Y.	Ü.Y.

48. Saatteki verilere göre 28 suş (%46,66) hVISA (Mu3, ATCC 700698) olarak tespit edilmiştir, 32 (%53,3) petride üreme görülmemiştir. Ü.Y: üreme görülmeyen petriler, hVISA: heterojen VISA tespit edildi.

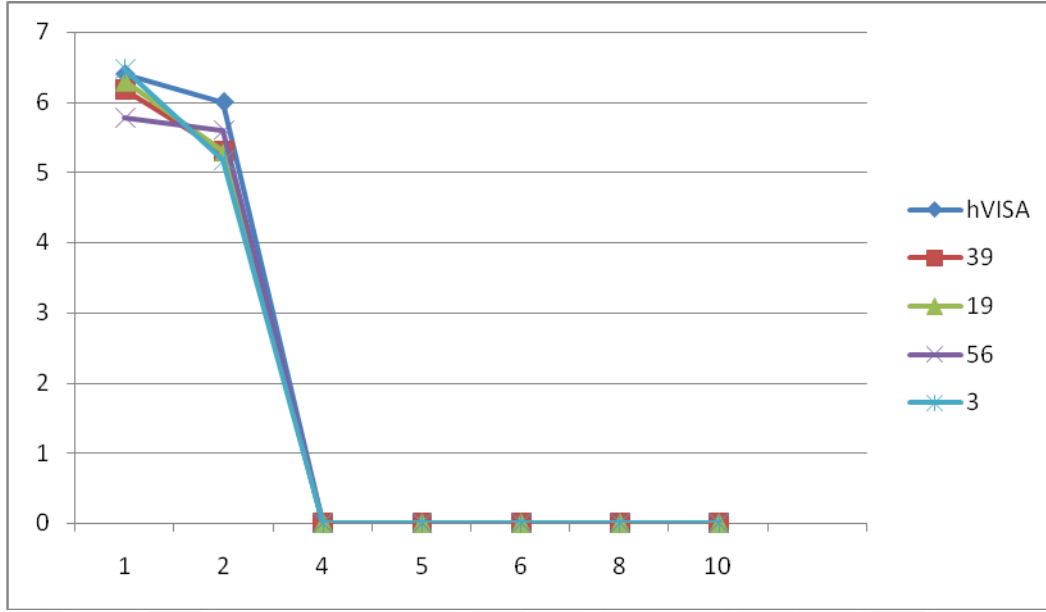
4.4. Popülasyon Analizi profili Sonuçları

Satola yönteminde hVISA olarak tespit edilen 28 (toplam izolatların %46.66) MRSA suşu PAP-AUC yöntemi ile değerlendirildi. Kontrol olarak standart hVISA suşu (ATCC 700698, Mu3) kullanıldı. Bu 28 MRSA suşu içerisinde, 12 suş (toplam izolatların %20'si) hVISA olarak tespit edildi.

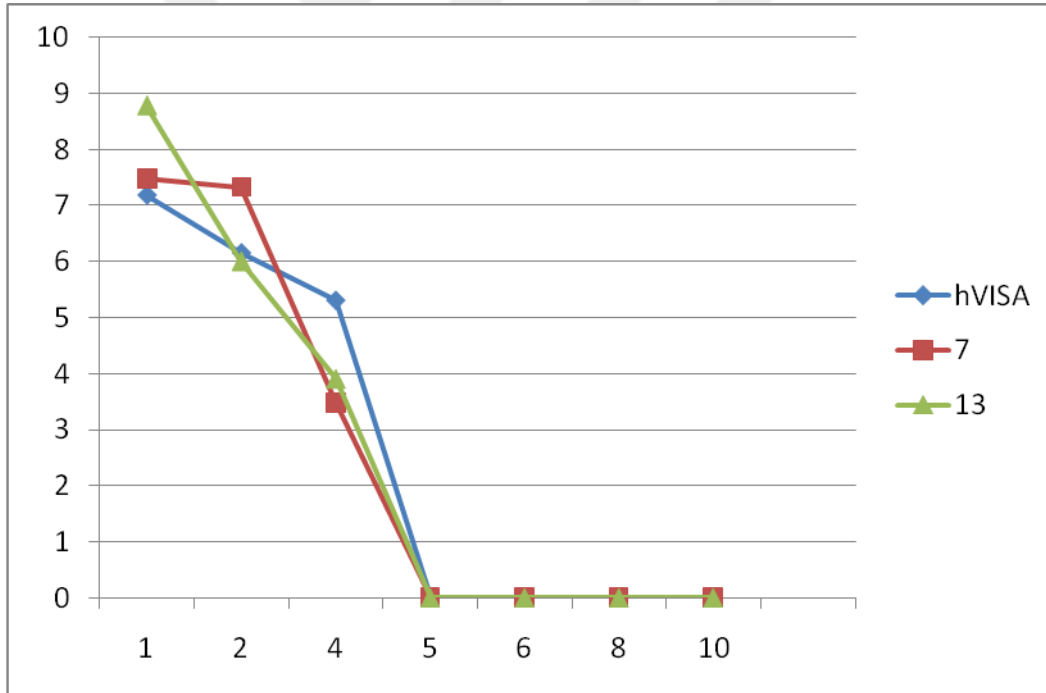
Tablo 3. PAP-AUC bulguları

İzolot no	İzolatların Eğri Altı Alanları	hVISA'nın Eğri Altı Alanı	Eğri Altı Alan Oranları	Aralık	
2	13,60456	20,75878	0,65536414	0,9-1,3	Değil
7	19,93757	20,75878	0,960440353	0,9-1,3	hVISA
13	19,24371	20,75878	0,92701546	0,9-1,3	hVISA
17	3,80103	20,75878	0,183104691	0,9-1,3	Değil
32	8,673435	20,75878	0,417820074	0,9-1,3	Değil
42	10,45154	20,75878	0,503475638	0,9-1,3	Değil
58	3,5	20,75878	0,168603357	0,9-1,3	Değil
ATCC 700698	20,75878	20,75878	1	0,9-1,3	
3	11,0027	12,19897	0,901936803	0,9-1,3	hVISA
4	3,039591	12,19897	0,24916784	0,9-1,3	DEĞİL
24	7,048455	12,19897	0,577790994	0,9-1,3	DEĞİL
26	13,73822	12,19897	1,126178686	0,9-1,3	hVISA
29	11,47195	12,19897	0,940403165	0,9-1,3	hVISA
40	7,843987	12,19897	0,643004041	0,9-1,3	DEĞİL
41	9,752575	12,19897	0,799458889	0,9-1,3	DEĞİL
49	11,07137	12,19897	0,907565967	0,9-1,3	hVISA
50	15,2641	12,19897	1,251261377	0,9-1,3	hVISA
53	8,719192	12,19897	0,714748212	0,9-1,3	DEĞİL
55	3,150515	12,19897	0,258260738	0,9-1,3	DEĞİL
22	7,971004	12,19897	0,653416149	0,9-1,3	DEĞİL
56	11,29217	12,19897	0,925665855	0,9-1,3	hVISA
19	11,10206	11,10206	1	0,9-1,3	hVISA
39	11,3959	12,19897	0,934169032	0,9-1,3	hVISA
ATCC 700698	12,19897	12,19897	1	0,9-1,3	
9	21,49392	51,82709	0,414723651	0,9-1,3	DEĞİL
20	31,89596	51,82709	0,61543027	0,9-1,3	DEĞİL
26	27,544933	51,82709	0,531477515	0,9-1,3	DEĞİL
ATCC 700698	51,82709	51,82709	1	0,9-1,3	
10	54,1504	53,26097	1,016699471	0,9-1,3	hVISA
14	49,65816	53,26097	0,932355532	0,9-1,3	hVISA
46	28,92378	53,26097	0,543057702	0,9-1,3	DEĞİL
ATCC 700698	53,26097	53,26097	1	0,9-1,3	

İzolatların eğri altı alanları standart hVISA'nın (ATCC 700698) eğri altı alanına bölündü, çıkan değer 0.9-1.3 aralığında ise hVISA olarak değerlendirildi.



Grafik 1. PAP-AUC'ye göre hVISA çıkan bazı suşların grafiği (1 no'lu PAP-AUC çalışması)



Grafik 2. PAP-AUC'ye göre hVISA çıkan bazı suşların grafiği (2 no'lu PAP-AUC çalışması)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Stafilokok enfeksiyonları yüzyıllardır insan sağlığı için önemli bir problem olmuştur. Hem hastane kökenli hem de toplum kökenli *Staphylococcus aureus* enfeksiyonlarının tedavisi bakterilerin geliştirdikleri çoklu ilaç direnç nedeni ile güçleşmiştir. Penisilinin kullanılmasıyla birlikte özellikle stafilokok enfeksiyonlarına bağlı ölüm oranlarında hızlı bir düşüş olmuştur, ancak kısa sürede penisilinlere karşı da direnç gelişmiştir (5). Günümüzde MRSA izolatlarına Dünya'nın her yerinde sıkça rastlanılmaktadır ve MRSA oranları ülkelere göre değişiklik göstermektedir. MRSA suşları ciddi oranda hastane enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Özellikle yoğun bakım üniteleri, uzun süre hastanede yatan hastalar, 65 yaşın üzerinde olan hastalar ve ek bir hastalığa sahip olan (böbrek yetmezliği, KOAH, diyabet) hastalar yüksek risklidir. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yoğun bakım ünitelerinden izole edilmiş *S. aureus* suşları arasında metisilin direnci oranı %60 olarak bildirilmiştir (84). Türkiye'de ise 2003-2004 yıllarında yapılan yayınlar göre çeşitli merkezlerde izole edilmiş *S. aureus* izolatlarında metisilin direnci oranının %52 olduğunu bildirilmiştir (85). Refik Saydam Hıfızısıhha Merkezi Başkanlığı 2008 ve 2009 yıllarında Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı (UHESA).raporuna göre antimikrobiyal direnç hızlarının persentil dağılımları.tablosunda MRSA'un ağırlıklı genel ortalaması 2008 yılında %58,9 olarak, 2009 yılında %58,5 olarak belirtilmiştir. Bu kitapçık yenilenerek 2010 yılında tekrar yayınlanmıştır. 2010 yılında ağırlıklı genel ortalama ise MRSA için %53,4 olarak gösterilmiştir (83, 86).

MRSA suşlarının çoğunun aminoglikozidlere,..makrolidlere, antistafilokoksik penisilinlere (oksasilin, metisilin, nafsilin) ve tetrasiklinlere de direnç geliştirdiği için MRSA enfeksiyonlarının tedavisi glikopeptidlerle sınırlı kalmıştır. Glikopeptid antibiyotiklerinin yanlış doz, yanlış süre ve gereksiz yere kullanımı ile birlikte bu ilaca da direnç gelişimi görülmeye başlanmıştır. Özellikle son yıllarda bildirilmeyen başlanan glikopeptid direnci stafilokok enfeksiyonlar için son seçenek olan vankomisin kullanımının kısıtlanmasını gündeme getirmektedir (87). *S. aureus* kökenlerinde üç farklı vankomisin direnci tanımlanmıştır. Hiramitsu ve ark. tarafından 1996 yılında Japonya'da bildirilen ve vankomisin için MİK değeri 8 µg/ml olan Mu50 suşudur. Vankomisine karşı duyarlılığı azalmış bu suşlar VISA olarak tanımlanmıştır (9). Yine Hiramitsu ve ark. 1997'de yeni bir direnç tipi bildirmişlerdir. Vankomisin için MİK

değeri duyarlı olmasına rağmen koloni içindeki 10^{-6} bakterinin, vankomisin 4-8 µg/ml konsantrasyonunda üreyebildiği, yani vankomisine orta düzeyde duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Bu suşun adına Mu3 denmiştir ve hVISA olarak tanımlanmıştır. Daha sonra birçok ülkede farklı oranlarda hVISA bildirilmeye başlanmıştır (7, 77). Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından belirlenen değerlere göre VISA ve VRSA izolatlarının ;vankomisin direnç sınırı tanımlanabilmektedir ancak hVISA izolatları için bu geçerli değildir. CLSI ölçütlerine göre vankomisine duyarlı değerlerde bulunan ($MİK \leq 2$ µg/ml) ancak 10^4 - 10^5 popülasyonda bir sıklıkta olmak üzere, $MİK > 2$ µg/ml içeren suşlar hVISA olarak tanımlanmaktadır (88). MRSA'lar içerisinde hVISA suşlarının görülme sıklığı %0,71-65 arasındadır, ancak bu oran değişkenlik göstermektedir (89). Üçüncü direnç tipi sadece üç adet *S. aureus* kökeninde saptanmıştır *vanA* genine bağlı dirençtir (25). İlk kez 2002 yılında Michigan'da bir diyaliz hastasında VRSA izolatı tanımlanmıştır (8). Vankomisine dirençli bu suşa VRSA denmiştir ($MİK > 32$ µg/ml). Dünya'da VRSA enfeksiyonunun görüldüğü sadece 11 vaka vardır. Bu olgulardan ikisi İran ve Hindistan'da, dokuzu ABD'den (Pennsylvania 1, New York 1, Michigan 7 olgu), bildirilmiştir (90). 2006 yılına kadar *S. aureus* için vankomisin direncinin değerleri, $MİK \leq 4$ µg/ml, duyarlı, 8-16 µg/ml aralığında ise orta duyarlı ve $MİK \geq 32$ µg/ml dirençli olarak kabul edilmiştir. 2006 'da ise CLSI, *in vitro* duyarlılık sonuçları ile elde edilen klinik sonuçlar arasındaki değerlerin daha uyumlu olması amacıyla *S. aureus* için belirlenmiş olan vankomisin $MİK$ direnç sınır değerlerini düşürmüştür. Sonuç olarak günümüzde yeni direnç sınır değerlerine göre, $MİK \leq 2$ µg/ml olan izolatlar duyarlı, 4-8 µg/ml aralığında olan izolatlar VISA ve $MİK \geq 16$ µg/ml olanlar VRSA olarak kabul edilmektedir (91). Bu nedenlerden dolayı daha önce hVISA olarak tanımlanan izolatlardan bazıları, son belirlenen değerlere göre VISA olarak tanımlanmıştır. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) yer alan VISA tanımı 2009 yılında tamamen değiştirilmiş ve vankomisin $MİK$ değeri ≥ 4 µg/ml olan tüm *S. aureus* izolatlarını VRSA olarak kabul etmiştir (91, 92). VRSA kökenli suşların $MİK$ değerleri yüksek olması nedeniyle, glikopeptid direnci laboratuvalarda rutin duyarlılık testleriyle kolaylıkla belirlenebilmektedir. VISA kökenlerini saptamak güç değildir (93). Centers for Disease Control (CDC) kriterlerine göre *S. aureus* kökenini VISA olarak adlandırmak için 10^6 CFU/ml yoğunluğundaki bakteri süspansiyonu kullanılarak 24 saatlik inkübe edilmelidir. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile $MİK$ değerlerine bakılmalı ve çıkan değerlerin 8-16 µg/ml olması

gerektiğini belirtmiştir (78). hVISA'nın klinik önemi halen netleştirilememiştir. Bunun nedeni hVISA'nın bildirildiği vaka sayısı azdır ve laboratuvarlarda uygulanan rutin duyarlılık testleri ile tespit edilememektedir. Ancak hVISA'nın bulunması MRSA enfeksiyonlarına karşı vankomisin etkisinin azalmasının tedavi süresinin uzamasının veya tedavide başarısız olunmasının nedeni olarak gösterilebilir (75). Dolayısıyla tespit edilmesi önem kazanmıştır. hVISA, laboratuvarlarda kullanılan duyarlılık testlerinden biri olan sıvı mikrodilüsyon ile duyarlı bulunmaktadır ($MİK \leq 2 \mu g/ml$). 5×10^5 CFU/ml gibi düşük dansiyeteli inokülasyonlar ile tespit edilemeyebilir. Örneğin; bu tip direncin ilk örneği olan Mu3 suşu sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile vankomisin için MİK değerleri 1–2 $\mu g/ml$ aralığında tespit edilmiştir (94). CLSI'nin standart duyarlılık testleri için önerdiği inokülasyon yoğunluğu 5×10^5 CFU/ml'dir. Fakat özellikle hVISA 10^6 CFU/ml yoğunlukta tespit edildiği için örnekleme yanlışlığı nedeniyle belirlenememektedir. Bu yüzden 10^6 'lık bir popülasyonu analiz edebilen bir yöntem kullanılmalıdır. Wootton ve ark. (11) tarafından tanımlanan popülasyon analizi profili eğri altı alanı (PAP-AUC) yönteminin bir çok çalışmada tekrarlanabilirliği ve etkinliği görülmüştür. Bu yöntemin hVISA (Mu3) ve VISA (Mu50) suşlarını tespit etmedeki başarı oranı ve etkinliği %100 olarak bulunmuştur. Bu sebeplerden dolayı halen PAP-AUC yöntemi birçok araştırmacı tarafından VISA ve hVISA kökenlerinin tanımlanmasında altın standart olarak kabul edilmektedir (11, 12). Ancak çok zahmetli ve külfetli bir yöntemdir. Ayrıca özel ekipmana ve yüksek düzey teknik donanıma ihtiyaç vardır. Bu yüzden laboratuvarlarda rutin olarak kullanılmamaktadır. Satola ve ark. 4 $\mu g/ml$ vankomisin ve 16 g/l kazein içeren Brain Heart Infusion (BHI-VC) bir tarama agarı geliştirmişlerdir. Bu yöntem kolay, yüksek duyarlılıkta ve özgüllükte bulunmuştur. Ancak European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) de belirtildiği gibi bu sonucu destekleyen yalnızca bir çalışma vardır (81, 82). Bu nedenle rutin kullanım için şimdilik olanaklı değildir.

Bizim çalışmamızda hVISA suşunun tespiti için altın standart kabul edilen PAP-AUC yöntemi ile Satola'nın geliştirdiği tarama agarı yöntemi karşılaştırılmıştır. Öncelikle Sanko Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarında izole edilmiş 60 MRSA suşu Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına taşınmış ve çalışmaya burada devam edilmiştir. Türkiye'de stafilokoklar için vankomisin direncinin ve duyarlılığının araştırıldığı bir çok çalışma yapılmıştır. Gülay ve ark. (95) klinik örneklerden izole edilmiş 95 MRSA suşunda vankomisin

direncini mikrodilüsyon yöntemi ile araştırmışlardır ve suşların 5'inde (%5,3) vankomisine azalmış duyarlılık (MİK: 8 µg/ml) tespit etmişlerdir. Mirza ve ark. (96) 2001-2011 yılları arasında çocuk hasta popülasyonundan izole edilmiş 94 MRSA suşu ile MİK çalışması yapmışlardır. Çalışmaya dâhil edilen MRSA izolatlarında vankomisin değerlerinde yıllara göre herhangi bir artış olmadığını farklı iki yöntem (Mikrodilüsyon ve Gradient test) kullanarak tespit etmişlerdir ve izolatların tamamının vankomisine duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Aktaş ve ark. (97) 100 stafilokok suşunda agar dilüsyon ile taramışlar ve vankomisine dirençli bir suş tespit etmemişlerdir. Sünbül ve ark. (98) 102 stafilokok suşunu kullanarak yaptıkları çalışmada vankomisin için MİK değerlerinin 0,25–2 µg/ml aralığında olduğunu bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda 60 MRSA suşunun MİK değerlerinin belirlenmesi için altın standart kabul edilen sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır. 2 MRSA suşunun MİK değeri 0,125 µg/ml, 12 MRSA suşunun MİK değeri 0,25 µg/ml, 44 MRSA suşunun MİK değeri 0,5 µg/ml ve 2 MRSA suşunun MİK değeri 1 µg/ml olarak bulunmuştur. Suşların hiç birisinde vankomisin için dirençli ve orta dirençli düzeyde MİK değeri tespit edilmemiştir, daha sonra bu suşlar hVISA araştırması için Satola testinde değerlendirilmiştir.

Satola ve ark. (81) kullandığı yöntemin, PAP-AUC yöntemine alternatif olabilmesi için birden fazla çalışmada duyarlı ve özgül bulunması gerekmektedir. 2005 yılında Sancak ve ark. (89) 256 MRSA izolatını 4 µg/ml'lik vankomisin ile hazırlanmış BHI agarı kullanarak çalışmışlar ve 145 (%56) suşu hVISA tespit etmişlerdir. Korkut Tunç ve ark. (83) *mecA* geni tespit edilmiş 52 adet *S. aureus* suşunu 6 µg/ml vankomisin içeren BHIA'da tarama yapmış, suşlardan 8 adetini 24. saatte, 1 adeti 48. Saatte olmak üzere toplamda 9 (%17,3) suşu agar tarama ile hVISA olduğunu saptamışlardır. Gazel ve ark. (82) 100 MRSA izolatından 43'ünü (%43) Satola testi ile hVISA olarak saptamışlardır. Feng ve ark. (99) 2013'te yaptıkları çalışmada 456 MRSA izolatı, 6 µg/ml vankomisin içeren BHIA kullanarak taramışlar ve 105 (%23) izolatın ürediğini tespit etmişlerdir. Çalışmamızda 60 MRSA suşuna ilk olarak Satola ve ark.'nın geliştirdiği tarama agarı uygulanmıştır ve 28 suş (%46,66) hVISA olarak tespit edilmiştir. 32 suşun bulunduğu petrilerde (%53,33) üreme görülmemiştir. Satola yöntemi ile bulduğumuz hVISA oranları Sancak ve ark. bulduğu oranlara benzerdir. Ancak, Dünya'da ve Türkiye'de yapılan tarama agarı çalışmalarında bulunan hVISA oranlarına göre bizim bulduğumuz oran ortalamanın biraz üzerindedir. Bunun nedeninin Satola ve ark.'nın tarama agarında

4 µg/ml vankomisin kontrasyonunu kullanmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz, ancak daha fazla suş kullanılarak yeni çalışmaların yapılmasının gerektiği bir gerçektir.

Çalışmamızda ek olarak, Satola testi ile hVISA olarak tespit edilen 28 suş, PAP-AUC yöntemi ile tekrar değerlendirilmiştir ve Satola testine göre %46,66 tespit edilen hVISA oranı, altın standart kabul edilen PAP-AUC yöntemine göre tüm izolatlar içerisinde %20 olarak tespit edilmiştir. Gülay ve ark. (95) 1998’de Türkiye’deki ilk hVISA suşunu raporlamışlardır. 2005 yılında MRSA izolatlarını kullanarak hVISA’yı araştıran ilk çalışmayı ise Türkiye’de Sancak ve ark. yapmışlardır. Çalışmalarında PAP-AUC yöntemini kullanarak 256 MRSA izolatını taramışlar ve bu suşlardan 46 (%18) suşu hVISA olarak tespit etmişlerdir. Kuşçu ve ark. (100) çalışmalarında 148 metisiline dirençli stafilokok kökeni kullanmışlardır. hVISA’yı PAP-AUC yöntemiyle araştırmışlar ve 107 MRSA içerisinde bir adet (%0,9) hVISA izolatı tespit etmişlerdir. İlk defa Mirza ve ark. (96) pediyatrik popülasyondan MRSA izolatları izole ederek çalışmışlar ve PAP-AUC yöntemiyle hVISA’yı %21,3 olarak saptamışlardır. Korkut Tunç ve ark. (83) 52 adet MRSA suşu içinden PAP-AUC yöntemi ile 9 (%17,30) adet hVISA tespit etmişlerdir. Dünya’da yapılan çeşitli araştırmalara göre ise Yunanistan’da Souli ve ark. (101) 175 izolatta PAP-AUC yöntemine göre 6 (%3,4) izolatı hVISA olarak bulmuşlardır. Khatib ve ark. (102) 371 MRSA izolatından 6 (%1,6) suşu VISA, 30 (%8,1) suşun ise hVISA olduğunu tespit etmişlerdir. Pitz ve ark. (22) çalışmalarında 147 MRSA izolatı kullanmışlar ve 2 (%1,2) adet izolatı hVISA olarak tespit edilmiştir. Yapılan çalışmaların tespit edilmiş prevalans oranları %0,9 ile %21,3 aralığında farklılık göstermektedir. Tüm çalışmalarda farklı sonuçların elde edilmesinin temel sebebi çalışmalardaki kullanılan örneklerin farklı türlerde olması (stafilokok kökenleri, MRSA) veya farklı yöntemler ile değerlendirilmiş olmasından kaynaklı olduğuna bağlanmıştır (Mikrodilüsyon, PAP-AUC, Makrodilüsyon). PAP-AUC sonuçlarımıza göre, çalışmamızda hVISA prevelansı, ülkemizde daha önce yapılan bazı PAP-AUC çalışmalarının sonuçlarına yakın bir değerde çıkmıştır ve bölgemizde ilk defa olarak bu alanda bir veri kümesi oluşturulmuştur.

Çalışmamızın sonucunda, Satola testi tarafından hVISA olarak tanımlanan 28 izolattan sadece 12’si PAP-AUC metodu ile hVISA olarak doğrulanabilmiştir. Bu durum bize Satola testinin çok hassas olmadığını ve çok fazla yalancı pozitifliğin olduğunu göstermiştir. Sonuçlarımıza göre hVISA araştırmasında, vankomisinli agar bazlı

yöntemler yerine direk olarak popölasyon analizi profili yönteminin tercih edilmesi uygun olacaktır. Bu konuda farklı merkezlerde, daha çok örneğın dahil edildiğı yeni çalışmalar yapılması gerekmektedir.



6. KAYNAKLAR

1. Cengiz AT. *Staphylococcus*, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Şemsettin Ustaçelebi (Ed.), Güneş Kitapevi, Ankara 1999; 339-348.
2. Garrity G, Holt JG. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: an Overview of the Roadmap to the Manual*. New York: Bergey's Manual Trust, 2000.
3. Lindsay JA, Ruzin A, Ross HF, Kurepina N, Novick RP. The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Molecular microbiology* 1998; 29(2):527-43.
4. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Tıbbi Mikrobiyoloji*. Başustaoğlu AC (ed), Atlas Kitapçılık, Ankara 2010; 209-222
5. Güneş H. Metisiline dirençli stafilokoklarda glikopeptid antibiyotiklere duyarlılık durumunun araştırılması. Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, 2008.
6. Öksüz L. Sağlık Bilimlerinde Klinik Mikrobiyoloji. Gazel D, Özbek E, Kol Aydoğdu S, (ed). Akademisyen Kitapevi 2021; Bölüm 6:57-59.
7. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillinresistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 1997; 40: 135-36.
8. CDSC. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin-United States. The Morbidity and Mortality Weekly Report 2002; 51 (26): 565-7.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Walsh TR, Bolmström A, Qvamström 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.
13. Ayliffe GAJ. The progressive intercontinental spread of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Infectious Diseases* 1997; 24 (Suppl 1): 74-79.
14. Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1. Baskı. İzmir: Güneş Kitabevi 1999; 339-45.

15. 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.
16. Kim MN, Pai CH, Woo JH, Ryu JS, Hiramatsu K. Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in Korea. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000;38: 3879-81.
17. Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, et al. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *New England Journal of Medicine* 1999; 340: 493-501.
18. Hood J, Edwards GFS, Cosgrove B, Curran E, Morrison D, Gemmell CG. Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* at a Scottish hospital. *Journal Infection* 2000; 40: A11.
19. Rotun SS, McMath V, Schoonmaker DJ, et al. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin isolated from a patient with fatal bacteremia. *Emerging Infectious Diseases* 1999; 5: 147-9.
20. Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* resistant to vancomycin-United States, Morbidity and Mortality Weekly Report. Rep 2002; 51: 565-67.
21. Centers for Disease Control and Prevention. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*-Pennsylvania, Morbidity and Mortality Weekly Report. 2002; 51: 902.
22. Pitz AM, Yu F, Hermsen ED, Rupp ME, Fey PD, Olsen KM. Vancomycin susceptibility trends and prevalence of heterogeneous vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* in clinical methicillin-resistant *S. aureus* isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011; 49(1): 269-74.
23. Dündar V, Dündar ÖD. Stafilokok Enfeksiyonları, Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (ed), Nobel Tıp Kitabevleri İstanbul 2008; 2065-2077.
24. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 5. Baskı. İzmir: Barış Yayınları İzmir 2009; 495-96.
25. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* infections. *New England Journal of Medicine* 1998; 339(5): 520-31.
26. 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.
27. 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.
28. 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* 5th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1997; 505-14.

29. Levinson W, Jawetz E. Medical Microbiology and Immunology, 6th. ed. Singapore: Lange Medical Books/McGraw-Hill, 2000; 85–95.
30. Batıktutlu S. Çeşitli klinik materyallerden izole edilen *S. Staphylococcus aureus* suşlarında metisilin direnci ve E-test ile Vankomisin MIC değerlerinin araştırılması. Uzmanlık Tezi. S.B. Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, 2006; 12
31. Bilgehan, H. Klinik mikrobiyoloji özel bakteriyoloji ve bakteri enfeksiyonları Bornova: Barış Yayınları 1994; 188-211.
32. Unat EK. Tıp bakteriyolojisi ve virolojisi. Dergah Tıp Yayınları. İstanbul.1982; 428-45.
33. Baird D, Collee JG, Marmion SP, Simmons A. (eds.). *Staphylococcus*: clusterforming Gram-positive cocci, Practical Medical Microbiology 1996; 245-62.
34. Hajek V, Meugnier H, Bes M et al. *Staphylococcus saprophyticus subs. bovis subs. nov.* isolated from bovine nostrils. International Journal of Bacteriology. 1996; 46: 792-96.
35. 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 *Staphylococcus aureus*, Journal of Clinical Microbiology. 1990; 28: 1338.
36. Washington CW. Allen SD. Janda WM. Koneman EW. Procop GV. Schreckenberger PC. Woods GL. Gram- positive cocci. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th ed, Lippincott Williams and Wilkins, chapter 12, 2006; 623-671.
37. Larsen HS. Mahon CR. *Staphylococcus*. Textbook of Diagnostic Microbiology, Mahon CR and Manuselis GJ (eds.), 1995; 326-338.
38. Akman DA, Kistik Fibrozlu hastaların burunlarında *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığının ve izole edilen suşların antibiyotik duyarlılığının saptanması, 2008, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, 64 sayfa, İstanbul.
39. Kahl B. Herrmann M. Everding AS. Koch HG. Becker K. Harms E. Persistent infection with small colony variant strains of *Staphylococcus aureus* in patients with cystic fibrosis. Journal Infection Diseases 1998; 177: 1023-1029.
40. Von Eiff C. Becker K. Metze D. Lubritz G. Hockmann J. Schwarz T. Intracellular persistence of *Staphylococcus aureus* small-colony variants within keratinocytes: a cause for antibiotic treatment failure in a patient with Darier's disease. Clinical Infection Diseases. 2001; 32: 1643-1647.
41. Kayser FH, Bienz KH, Eckert J, Zinkernagel RM. Medizine Mikrobiologie verstehen, lernen, nahschlagen Georg Thieme Verlag 1998.

42. Özel E. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarında mecA geninin tespitinde evigene, latex aglünitasyon testi ve pzs yönteminin karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, 2011.
43. Que A, M Philippe *Staphylococcus aureus* (including staphylococcal toxic shock). In: Mandel GL, Bennet JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th. ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2010; 2543-2579.
44. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E. W, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Gram-Positive Cocci. İçinde: Washington C. Winn Jr. (ed). Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6. baskı. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2006; 623-671.
45. Brooks GF, Butel J.S, Morse SA. The Staphylococci. İçinde: Brooks G.F, Butel J. S, Morse S. A. (ed). Medical Microbiology. 12. baskı New York: Javets, Melnick & Adelberg's; 2004; 223-230.
46. Ulusoy S, Usluer G, Ünal S, *Staphylococcus aureus* Mikrobiyoloji, Patogenez ve Epidemiyoloji. İçinde: Gram Pozitif Bakteri Enfeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp;2004; 9-71.
47. Martínez E, Mensa J, Rovira M, Martínez JA, Marcos A, Almela M, Carreras E. Central venous catheter exchange by guidewire for treatment of catheter-related 57 bacteraemia in patients undergoing BMT or intensive chemotherapy. Bone Marrow Transplant. 1999; 23(1):41-4.
48. Köksal F. Bakteriyel Patojenite Adaları/Genomik Adalar. İçinde: IV. Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji Kursu. Durmaz R. (ed). İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi, Malatya 3-7 Eylül 2007; 144-152.
49. Tefik CA. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ustaçelebi Ş (ed). Güneş kitabevi Ankara 2003; 339-348.
50. Trindade P, Pacheco RL, Costa SF, Rossi F, Barone AA, Mamizuka EM, Levin AS. Prevalence of SCCmec type IV in nosocomial bloodstream isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Clinical Microbiology. 2005; 43.
51. Katayama Y, F Takeuchi T, Ito X X, Ma Y, Ui-Mizutani I, Kobayashi, Hiramatsu K. Identification in methicillin-susceptible *Staphylococcus hominis* of an active primordial mobile genetic element for the *staphylococcal cassette chromosome mec* of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology 2003; 185:2711-2722.
52. Katayama Y, Zhang HZ, Hong D, Chambers HF. Jumping the barrier to beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology 2003; 185:5465-547.
53. Chambers HF. Meticillin Resistance in Staphylococci: Molecular and Biochemical Basis and Clinical Implications. Clinical Microbiology Review 1997; 10:781-91.
54. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S. Antibiyotikler. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi 2003; 31-41

55. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 10.baskı. Ankara: Hacettepe-Taş 2002; 182-327.
56. Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. Science 1994; 264: 382-8.
57. Acar JF, Goldstein FW. Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones. Clinical Infection Diseases 1997; 24(Suppl 1):567-73.
58. Reynolds PE, Brown DFJ Penicilin-binding proteins of betalactam-resistant strains of *Staphylococcus aureus*, FEBS Letter 1985; 192:28-32.
59. Vaudaux P, Gjinojci A, Bento M et al: Intensive therapy with ceftobiprole medocaril of experimental foreign-body infection by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, Antimicrobial Agents Chmotherapy 2005; 49(9):3789-93.
60. Hartman BJ, Tomasz A. Low-affinity penicillin-binding protein associated with betalactam resistance in *Staphylococcus aureus*. Journal Bacteriology 1984; 158: 513-16.
61. Ulutan F. Rifamisinler. Türkiye Klinikleri J Infectious Diseases-Special Topics 2017; 10(1):121-5.
62. Jehl F, Chomarat M, Weber M, Gerard A. Antibiyotik Duyarlılık Testinden Reçeteye. Çev: Söyletir G, Bal Ç, Gür D, Topçu WA. 2. Baskı İstanbul: Bio Merieux Yayınları 2003; 78-83.
63. Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M. Asya Mikrobiyoloji. 4. Baskı. İzmir: Asya Tıp Kitabevi 2005; 54.
64. Önemli Ve Sorunlu Gram pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Ed. Ulusoy S, Usluer G. Ünal S. Bilimsel Tıp Yayınevi Ankara 2004.
65. Jolly L, Wu S, van Heijenoort J, de Lencastre H, Mengin- Leclerc D, Tomasz A. The femR315 gene from *Staphylococcus aureus*, the interruption of which results in reduced methicillin resistance, encodes a phosphoglucosamine mutase. Journal Bacteriology 1997;179:5321-5.
66. Proctor RA, Van LP, Kristjansson M, Maslow JN, Arbeit RD. Persistent and relapsing infections associated with small-colony variants of *Staphylococcus aureus*. Clinical Infection Diseases 1995; 20:95-102
67. Salmenlinna S. Molekular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Finland. Academic dissertation. Faculty of Medicine, University of Helsinki, Haartman Institute. Helsinki, 2002.
68. McDougal L, Thornsberry C, 1986, The role of β -lactamase in staphylococcal resistance to penicillinase resistant penicillins and cephalosporins. Journal of Clinical Microbiology. 1986; 23: 832-839.

69. Tomasz A, Drugeon HB, De Lencastre HM, Jabes D, McDougal L, Bille J, New mechanism for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: clinical isolates that lack the PBP 2a gene and contain normal penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding proteins with modified penicillin-binding capacity, *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 1989; 33:1867-9.
70. Dumlupınar B. Antibiyotiklere Dirençte Yeni Eğitimler. *Klinik dergisi* Cilt 14, Sayı:2.2001; s:47-56.
71. Rohrer S, Ehlert K, Tschierske M, Labischinski H, and Bachi BB. The essential *Staphylococcus aureus* gene *fmhB* is involved in the first step of peptidoglycan pentaglycine interpeptide formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 1999; 96:9351-9355.
72. 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. *Antimicrobiol Chemotherapy* 1998; 42: 199-209.
73. 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.
74. Moore MR, Perdreau RF, 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. *Antimicrobiol Agents Chemotherapy* 2003; 47: 1262-66.
75. Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance *Lancet Infectious Diseases* 2001; 1: 147-55.
76. Wang SSY, Ho PL, Woo PCY, and Yuen KY. Bacteremia caused by staphylococci with inducible vancomycin heteroresistance. *Clinical Infection Diseases* 1999; 29: 760-67.
77. European Union Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2017) The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance Version 2.01. Available: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf. Accessed: 12 January 2020.
78. Clinical and Laboratory Standards Institute. Antimikrobik Duyarlılık Testleri İçin Uygulama Standartları 17.Bilgi eki Ocak 2007.
79. 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. *American Journal of Emergency Medicine* 1993; 94: 313-28.

80. Demirpek U. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Derneği 2. Antibiyotik Duyarlılığı İçin Fenotipik Yöntemler Kursu. Aydın 2011; 6-12.
81. Satola SW, Farley MM, Anderson KF, Patel JB (2010) Comparison of detection methods for heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*, with the population analysis profile method as the reference method. Journal of Clinical Microbiology 49: 177-183.
82. Gazel D, Erinmez M, Büyüktaş A, Zer Y. Investigation of heteroresistant vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* among MRSA isolates. The Journal of Infection in Developing Countries. Gaziantep 2020
83. Korkut TE, Kuzucu Ç, Otlı B. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarında vankomisine karşı azalmış duyarlılığın araştırılması. Türk Mikrobiyol Cemiyeti Dergisi 2017; 47(1): 39-46.
84. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January through 1992 June 2004, issued October 2004. American Journal of Infection Control. 2004; 32(8): 470-85.
85. Derbentli Ş. Stafilokoklarda antibiyotik direnci, 2003- 2004 Türkiye haritası. ANKEM Derg. 2005; 19(Ek 2): 54-60.
86. Refik Saydam Hıfızısıhha Merkezi Başkanlığı'nca yayınlanan Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı (UHESA) Raporu Özet Veri Kitapçığı. [Son güncelleme tarihi: 6 Mayıs 2017; Erişim tarihi: 19 Temmuz 2018]. Erişim adresi: www.rshm.gov.tr/enfeksiyon/dosya/lab.doc
87. Yakupoğulları Y, Gündüz A, Özcan M, Doğukan M, Seyrek A, Yılmaz M. *Staphylococcus aureus* suşlarının siprofloksasin, ofloksasin, levofloksasin ve moksifloksasin duyarlılıkları. Fırat Tıp Dergisi. 2006(11); 1: 45-47.
88. Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycinintermediate and heterogeneous vancomycinintermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection and clinic alimplications. Clinical Microbiology Review. 2010; 23(1): 99-139.
89. Sancak B, Ercis S, Menemenlioglu D, Colakoglu S, Haşcelik G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin in a Turkish university hospital. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2005; 56(3): 519-23.
90. Gould IM. Clinical activity of anti-Gram-positive agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2011; 66(14): 17-21.
91. Hardy KJ, Hawkey PM, Gao F. Oppenheim BA. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in the critically ill. British journal of anaesthesia. 2004; 92(1): 121-30.

92. Nannini E, Murray BE, Arias CA. Resistance or decreased susceptibility to glycopeptides, daptomycin, and linezolid in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Current Opinion Pharmacology*. 2010; 10(5): 516-21.
93. Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, et al. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *New England Journal of Medicine*. 1999; 340: 493-501.
94. Tenover FC, Biddle JW, Lancaster MY. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. *Emerging Infectious Diseases* 2001; 7 (2): 327-331.
95. Gülay Z, Atay T, Yuluğ N. *Staphylococcus aureus* suşlarında vankomisin direncinin araştırılması. *ANKEM Derg* 1998; 12:101
96. Mirza HC, Sancak B, Gur D. The prevalence of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* and Heterogeneous VISA among methicillin-resistant strains isolated from pediatric population in a Turkish university hospital. *Microbial Drug Resistance*. 2015; 21(5): 537-44.
97. Aktaş Z, Şalcıoğlu M, Akbulut K, Bal Ç, Anğ Ö. Stafilocoklarda fusidik asit, vankomisin ve teikoplanin etkinliğinin agar dilüsyon yöntemi ile karşılaştırılması. 4. 51 Antimikrobik Kemoterapi Günleri Program ve Özet Kitabı (Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No:37) İstanbul 1999; 5: 209.
98. Sünbül M, Eroğlu C, Çınar T, Saniç A, Leblebicioğlu H. Stafilocok suşlarının vankomisin ve teikoplanine duyarlılıkları. *ANKEM Derg* 1998; 12: 77-80.
99. Feng NN. The incidence and risk factors for heterogeneous vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2013; 52:318-22.
100. Kuşçu F, Öztürk D, Gürbüz Y, Tütüncü E, Şencan İ, Gül S. Metisiline dirençli stafilocoklarda azalmış vankomisin duyarlılığının araştırılması. *Mikrobiyol Bul*. 2011; 45(2): 248-57.
101. Souli M, Karaikos I, Galani L, Maraki S, Perivolioti E, Argyropoulou A, et al. Nationwide surveillance of resistance rates of *Staphylococcus aureus* clinical isolates from Greek hospitals, 2012-2013. *Infectious Diseases*. 2016; 48(4): 287-92.
102. Khatib R, Jose J, Musta A, Sharma M, Fakih MG, Johnson LB, et al. Relevance of vancomycin intermediate susceptibility and heteroresistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011; 66(7): 1594-9

7. EKLER

Ek-1. Etik Kurul Onay Formu

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ETİK KURULUN ADI	Gaziantep Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
AÇIK ADRESİ:	Gaziantep Üniversitesi Hayvan Deneyleri Araştırma Merkezi Binası (GAÜNDAM) Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 27310 Şehitkamil/Gaziantep
TELEFON	0342 360 12 00-Dahili 4800
FAKS	-
E-POSTA	etikkurul@gantep.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ				
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Dr.Öğr.Üyesi Deniz GAZEL			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Mikrobiyoloji			
KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi			
VARSA İDARI SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
DESTEKLEYİCİ				
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)				
DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
	FAZ 2	☐		
	FAZ 3	☐		
	FAZ 4	☐		
	Gözlemsel ilaç çalışması	☐		
	Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐		
	In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐		
	İlaç dışı klinik araştırma	☒		
Diğer ise belirtiniz :				
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	YER MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
				Türkçe	İngilizce	Diğer
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			☐	☐	☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			☐	☐	☐
	OLGU RAPOR FORMU			☐	☐	☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			☐	☐	☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı		Açıklama			
	SİGORTA	☐				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☒	14.05.2020 imza tarihi			
	BİYolojik MATERYEL TRANSFER FORMU	☐				
	İLAN	☐				
	YILLIK BİLDİRİM	☐				
	SONUÇ RAPORU	☐				
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐				
DİĞER:	☐					

Etik Kurul Başkanı
Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Aysun BARANSEKİSKİ

(NOT: EKLER ARKASINDA GÖRÜLMEKTEDİR. BU KISIMDA KAYITLI KİŞİLERİN İMZA ETMELİDİR.)

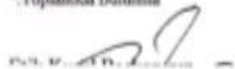
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> izolatlarında hVISA oranlarının belirlenmesi için iki farklı yöntemin karşılaştırılması		
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	180		
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2020/180	Tarih: 27.05.2020	
	Sorumlu Araştırmacı Dr.Öğr.Üyesi Deniz GAZEL olan "Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i> izolatlarında hVISA oranlarının belirlenmesi için iki farklı yöntemin karşılaştırılması" başlıklı proje öneri dosyası ile ilgili belgeler incelenmiş olup, etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına etik kurul üye çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan etik kurul onayı alındıktan sonra şahsen başvuru yoluyla izin alınması gerekmektedir.		

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr.Aysun BARANSEL İSİR

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr.Aysun BARANSEL İSİR	ADLI TIP	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Prof.Dr. Yasemin ZER	MİKROBİYOLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Prof.Dr.Özlem ALTINDAĞ	FİZİK TEDAVİ ve REHABİLİTASYON	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Prof.Dr.Birgül ÖZÇİRPİCİ	HALK SAĞLIĞI	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Prof.Dr.Muradiye NACAK	TIBBİ FARMAKOLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Prof. Dr. İlker SEÇKİNER	ÖROLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Prof. Dr. Mehmet KESKİN	ÇOCUK ENDOKRİNOLOJİ ve METABOLİZMA HASTALIKLARI	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Prof. Dr. Sinan AKBAYRAM	ÇOCUK HEMATOLOJİ ve ONKOLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Prof. Dr. Ramazan BAL	FİZYOLOJİ	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Doç. Dr. Umut ELBOĞA	NÜKLEER TIP	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Dr.Öğr.Üyesi Serkan GÖRGÜL	BIYOFİZİK	Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Dr.Öğr.Üyesi Eda Didem YALÇIN	AĞIZ DİŞ ve ÇENE RADYOLOJİSİ	Gaziantep Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Uzm. Dr. Gönül KARATAŞ DURUSOY	GÖZ HASTALIKLARI	Gaziantep Dr. Ersin Arslan Eğ. Arz. Hast.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Emine Aybügen YILDIRIM	AVUKAT (Hukukçu)	Gaziantep Barosu	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	
Hasan KİÇİKOĞLU	OKUL ÖNCESİ ÖĞRETMENİ	Gaziantep Anadolulu	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	

*:Toplantıda Bulunma



Ek-2 Proje Bitişi Raporu

12.11.2021 20:24

bapyb.gantep.edu.tr/?act=guest&act2=eposta&pid=2_F70%2BKs5vnB5k84HoBIEMn9zoBIESUMLpQI14PMVUY17GLI5J2m...



GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ BİRİMİ

Konu : BAP birimi projeniz/başvurunuz ile ilgili yeni bir işlem yaptı

Sayın Dr.Öğr.Üyesi Deniz GAZEL,

Aşağıda bilgileri bulunan projeniz ile ilgili yeni bir işlem yapılmıştır.

Proje Bilgileri

Proje No TF.YLT.21.05

Proje Metisiline dirençli Staphylococcus aureus izolatlarında hVISA oranlarının belirlenmesi için iki farklı yöntemin karşılaştırılması

Yapılan işlem ile ilgili detaylar

Yapılan İşlem Proje başarıyla sonlandırıldı (Tüm belgeler eksiksiz tamamlandı)

Koordinatörlüğün notu:

İlgili Yönetim Kurulu Kararı 08-11-2021 tarihli toplantıya istinaden;

Yürütücülüğünü **Dr.Öğr.Üyesi Deniz GAZEL'** in yaptığı **TF.YLT.21.05** kod no.lu ve **Yüksek Lisans Tezi Araştırma Projesi** türündeki "*Metisiline dirençli Staphylococcus aureus izolatlarında hVISA oranlarının belirlenmesi için iki farklı yöntemin karşılaştırılması*" konulu projenin sonuç raporunun incelenip, **projenin amacı doğrultusunda bittiğine,**

Gaziantep Üniversitesi BAPYB

e-BAP
Otomasyonu

Tel : 0342 3601200 0342 - 3171357,3171373, 3171374, 3171355, 3171358, 3171377
Adres : Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi 27310
Gaziantep
Web : <http://bapyb.gantep.edu.tr/>

Bu bir bilgilendirme mailidir. Lütfen bu mail adresine cevap vermeyiniz.
Lütfen size gelen e-postaları Spam (Junk) mail olarak işaretlemeyiniz.

bapyb.gantep.edu.tr/?act=guest&act2=eposta&pid=2_F70%2BKs5vnB5k84HoBIEMn9zoBIESUMLpQI14PMVUY17GLI5J2myB10%2B3Ge9F70%... 1/1

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı	Nesrin KÖRÜK
Akademik unvan/pozisyon	Hemşire
Görev yeri	Devlet Hastanesi
Telefon numarası	
E-posta adresi	

EĞİTİM BİLGİLERİ

Yıl	Bölüm	Kurum	De rec e
2014	Hemşirelik	Kahramanmaraş Sütçüimam Üniversitesi Sağlık Meslek Yüksekokulu	Lis ans

İŞ TECRÜBESİNE AİT BİLGİLER

Tarih Aralığı	Kurum	Gö rev
2014-2015		He mşi re
2015-2020		He mşi re
2020-		He mşi re

1. Görev alınan klinik araştırma bilgileri:

Klinik araştırma	Tarih Aralığı	Görev
Dr. Öğr. Üyesi Deniz GAZEL		Uzma n Tabip (Tıbbi Mikro biyolo ji)
Nesrin KÖRÜK		Hemşi re