

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

**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ'NDE
2001-2011 YILLARI ARASINDA ÇOCUK HASTA GRUBUNDAN
İZOLE EDİLEN METİSİLİNE DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS
AUREUS* (MRSA) SUŞLARINDA VANKOMİSİNE ORTA
DÜZEYDE DUYARLI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (VISA) VE
HETEROJEN VISA (hVISA) SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

Dr. H. Cenk MİRZA

UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA

2011

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

**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HASTANESİ'NDE
2001-2011 YILLARI ARASINDA ÇOCUK HASTA GRUBUNDAN
İZOLE EDİLEN METİSİLİNE DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS
AUREUS* (MRSA) SUŞLARINDA VANKOMİSİNE ORTA
DÜZEYDE DUYARLI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* (VISA) VE
HETEROJEN VISA (hVISA) SIKLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

Dr. H. Cenk MİRZA

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Banu SANCAK

ANKARA

2011

TEŞEKKÜR

Öncelikle, tezimin gerçekleşmesinde çok büyük emeği, katkıları ve desteği olan; her zaman bilgi ve tecrübesinden yararlanmış olduğum fedakar tez danışman hocam sayın Doç. Dr. Banu SANCAK'a çok teşekkür ederim. Ayrıca uzmanlık eğitimim boyunca kendilerinden çok şey öğrendiğim, iyi bir mikrobiyolog olmam için çaba harcayan, en doğru ve güncel bilgileri aktaran değerli hocalarıma da teşekkür ederim.

Tezimin yapım aşamasında bana büyük yardımları olan, başta Prof. Dr. Deniz GÜR olmak üzere, İsmail TUTAR, İbrahim KAYMAKOĞLU, Sadiye ÖZBAY ve diğer 'Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı' elemanlarına teşekkür ederim. Yine tezimin yapım aşamasında destekleri olan Nejla KILIÇ, Coşkun ERDEM ve İrfan ATMACA'ya da teşekkürü bir borç bilirim.

Benim bugünlere gelmemi sağlayan, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim annem Meral MİRZA, babam G. Ertuğrul MİRZA ve her şeyimi paylaştığım kardeşim M. Berk MİRZA'ya sonsuz teşekkür ederim.

İyi ve kötü günlerimde daima yanımda olan, sevinç ve üzüntülerimi paylaştığım sevgili nişanlım Arzu ÇİFTÇİ'ye de çok teşekkür ederim.

ÖZET

Mirza H.C., Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde 2001-2011 yılları arasında çocuk hasta grubundan izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarında vankomisine orta düzeyde duyarlı *S.aureus* (VISA) ve heterojen VISA (hVISA) sıklığının araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık tezi, Ankara, 2011. Metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) enfeksiyonlarının tedavisinde vankomisin ve teikoplanin olmak üzere glikopeptid grubu antibiyotikler kullanılmaktadır. MRSA enfeksiyonlarının yüksek prevalansı, vankomisinin daha sık kullanılmasına yol açmış ve bu durum glikopeptidlere azalmış duyarlılık gösteren MRSA suşlarının ortaya çıkmasıyla sonuçlanmıştır. Vankomisine orta düzeyde duyarlı *S.aureus* (VISA) ve heterojen VISA (hVISA) suşlarının neden olduğu bakteriyemi olguları ile glikopeptidlere duyarlı MRSA suşlarının neden olduğu bakteriyemi olgularının klinik özelliklerini karşılaştıran çalışmalarda VISA/hVISA enfeksiyonları vankomisin tedavi başarısızlığıyla ilişkili bulunmuştur. Vankomisine orta düzeyde duyarlı *S.aureus* izolatlarının; özellikle de hVISA izolatlarının saptanmasında rutinde kullanılan antibiyotik duyarlılık testleri güvenilir değildir. Şu ana kadar çocuk hastalardaki VISA/hVISA sıklığının araştırıldığı sadece iki çalışma saptanmıştır. Bu çalışmada; çocuk hasta grubundan izole edilen MRSA suşları arasındaki VISA/hVISA prevalansının, VISA/hVISA izolatlarının tanımlanmasında altın standart olan 'popülasyon analizi profili - eğri altında kalan alan' (*Population analysis profile - area under the curve*; PAP-AUC) ve Etest makrometod yöntemleriyle saptanması amaçlanmıştır. Ayrıca MRSA izolatlarının vankomisin ve daptomisin MİK (minimum inhibitör konsantrasyon) değerlerinin saptanması ve vankomisin MİK değerlerinde zaman içerisinde olası bir artışın belirlenmesi planlanmıştır.

Çalışmamıza 1 Ocak 2001 ile 1 Kasım 2011 tarihleri arasında izole edilen 94 MRSA izolatı dahil edilmiştir. Bu izolatların vankomisin ve daptomisin MİK değerleri mikrodilüsyon ve Etest yöntemiyle belirlenmiştir.

İzolatlar arasındaki VISA/hVISA prevalansı Etest makrometod ve PAP-AUC yöntemleri kullanılarak saptanmıştır.

Çalışmamıza dahil edilen MRSA izolatlarının vankomisin MİK değerlerinde yıllar içerisinde bir artış (*MIC creep*) saptanmamıştır. Hem mikrodilüsyon hem de standart Etest yöntemiyle izolatların tamamı vankomisine duyarlı olarak bulunmuştur. Vankomisin MİK değeri 2 µg/ml olan izolatların oranı ise %29.8 olarak saptanmıştır. Hem mikrodilüsyon hem de Etest yöntemiyle tüm izolatlar daptomisine duyarlı olarak bulunmuştur.

Çalışmamız, çocuk hasta grubunda hVISA prevalansının, altın standart olarak kabul edilen PAP-AUC yöntemi ile saptandığı ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır. Bu yöntemle çalışmamızda 20 (%21.3) hVISA izolatı saptanmıştır. PAP-AUC yönteminin sonuçları ile Etest makrometod sonuçları karşılaştırılmış ve Etest makrometodun duyarlılığı %71.4; özgüllüğü ise %91.4 olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda saptanan hVISA izolatlarının %75'inin vankomisin MİK değeri 2 µg/ml olarak saptanmıştır. Vankomisin MİK değeri 2 µg/ml olan izolatların ise %53.6'sı hVISA olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla vankomisin MİK değeri 2 µg/ml olarak saptanan MRSA izolatlarının hVISA olasılığı açısından incelenmesinin, klinikte uygulanacak tedavinin yönlendirilmesi açısından büyük katkısı olacağı düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: *S.aureus*, VISA, hVISA, vankomisin, daptomisin

Destekleyen Kuruluş: Hacettepe Üniversitesi Araştırma Fonu

Proje no: 010D03101003

ABSTRACT

Mirza H.C., The prevalence of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogeneous VISA (hVISA) among methicillin-resistant strains isolated from children in Hacettepe University Hospital (2001-2011), Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis In Medical Microbiology, Ankara, 2011. Glycopeptide group antibiotics (vancomycin and teicoplanin) are the current mainstay of therapy for infections caused by methicillin-resistant *S.aureus* (MRSA). However, the high prevalence of MRSA infections has led to increased use of vancomycin and has resulted in the emergence of MRSA with reduced susceptibility to glycopeptides. Recent studies comparing the clinical features of bacteremia due to vancomycin-intermediate *S.aureus* (VISA) / heterogeneous VISA (hVISA) and fully vancomycin susceptible MRSA showed that VISA/hVISA infections were associated with vancomycin treatment failure. The detection of VISA, especially hVISA by routine susceptibility testing is unreliable. To our knowledge, there are only two studies which investigated the prevalence of VISA/hVISA among pediatric group. The aim of our study was to determine the prevalence of VISA/hVISA among pediatric group by using Etest macromethod and 'population analysis profile - area under the curve (PAP-AUC)' method which is the gold standard test for the identification of VISA/hVISA isolates. We also evaluated the vancomycin and daptomycin minimum inhibitory concentration (MIC) values of MRSA and investigated a probable increase in vancomycin MIC values of MRSA over time.

Ninety four MRSA isolates recovered between January 2001 and November 2011 were included in this study. The vancomycin and daptomycin MIC values of these isolates were detected by broth microdilution and Etest method. The prevalence of VISA/hVISA was determined by PAP-AUC and Etest macromethod.

Vancomycin MIC creep was not detected among the MRSA isolates. All of the isolates were found as susceptible to vancomycin by microdilution

and standard Etest method. The percentage of isolates which had vancomycin MIC of 2 µg/ml was 29.8%. All isolates were susceptible to daptomycin by both of microdilution and standard Etest methods.

To our knowledge this is the first study investigating the prevalence of VISA/hVISA isolates by PAP-AUC method among pediatric group. By this method 20 hVISA isolates (21.3%) were detected. For detection of hVISA isolates, Etest macromethod was also used and results were compared to PAP-AUC method. Etest macromethod yielded sensitivity of 71.4% and specificity of 91.4%.

In our study 75% of hVISA isolates had a vancomycin MIC of 2 µg/ml. Among hVISA isolates, the percentage of isolates with MIC 2 µg/ml was 53.6%. Therefore, the isolates which have vancomycin MIC of 2 µg/ml must be investigated for the presence of hVISA isolates which could lead implementation of more effective therapeutic options in clinical settings.

Keywords: *S.aureus*, VISA, hVISA, vancomycin, daptomycin

Supported by Hacettepe University Scientific Research Unit

Project number: 010D03101003

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiii
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>S.aureus</i> 'da Görülen Vankomisine Direnç Mekanizmaları	8
2.1.1. Vankomisin tüketiminde artış	9
2.1.2. Tıkanma (<i>Clogging</i>)	11
2.2. Direnç Sınır Değerleri ve Tanımlar	13
2.3. VISA, hVISA ve VRSA Epidemiyolojisi	17
2.4. VISA/hVISA İzolasyonu ile Vankomisin Tedavisi Başarısı Arasındaki İlişki	18
2.5. Alternatif Antibiyotikler	19
3. GEREÇ ve YÖNTEM	21
3.1. İzolatlar	21
3.2. MRSA İzolatlarının Vankomisin ve Daptomisin MİK Değerlerinin Saptanması	21

3.2.1. Mikrodilüsyon yöntemi	21
3.2.2. Standart Etest yöntemi	22
3.3. Heterojen VISA İzolatlarının Saptanması	23
3.3.1. Etest makrometod	23
3.3.2. 'Popülasyon analizi profili - eğri altında kalan alan' yöntemi	23
3.4. İstatistiksel Analiz	25
4. BULGULAR	26
4.1. MRSA izolatlarının izole edildiği klinik örnekler ve yıllara göre dağılımı	26
4.2. MRSA İzolatlarının Vankomisin ve Daptomisin MİK Değerleri	26
4.3. Yıllara Göre MRSA İzolatlarının Vankomisin MİK Değerlerinde Görülen Değişiklik	28
4.4. MRSA İzolatlarının Vankomisin ve Daptomisin İçin Elde Edilen MİK Aralığı, MİK50 ve MİK90 değerleri	28
4.5. MRSA İzolatlarının Mikrodilüsyon ve Etest Yöntemleri ile Belirlenen MİK Değerleri Arasındaki Uyum	29
4.6. Etest Makrometoda Göre hVISA Olarak Saptanan İzolatlar	30
4.7. Etest Makrometoda Göre hVISA Olarak Saptanan İzolatların, Vankomisin MİK Değerleri ile İlişkisi	34
4.8. 'Popülasyon Analizi Profili - Eğri Altında Kalan Alan' Yöntemine Göre hVISA Olarak Saptanan İzolatlar	36
4.9. 'Popülasyon Analizi Profili - Eğri Altında Kalan Alan' Yöntemine Göre hVISA Olarak Saptanan İzolatların, Vankomisin MİK Değerleri ile İlişkisi	40
4.10. 'Popülasyon Analizi Profili - Eğri Altında Kalan Alan' Yöntemi ile Etest Makrometod Sonuçlarının Karşılaştırılması	43

5. TARTIŞMA	44
KAYNAKLAR	53

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAL	Bronkoalveolar Lavaj
BHIA	<i>Brain Heart Infusion Agar</i>
BOS	Beyin omurilik sıvısı
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CFU/ML	Mililitre başına koloni oluşturan birim sayısı
DTA	Derin trakeal aspirasyon
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GISA	Glikopeptidlere orta düzeyde duyarlı <i>S.aureus</i>
hGISA	Heterojen GISA
HPLC	<i>High – Performance Liquid Chromatography</i>
hVISA	Heterojen VISA
MİK	Minimum inhibitör konsantrasyon
MRSA	Metisiline dirençli <i>S.aureus</i>
MSSA	Metisiline duyarlı <i>S.aureus</i>
Mu3	Referans hVISA izolatı
Mu50	Referans VISA izolatı
Nm	Nanometre
PAP-AUC	<i>Population analysis profile – area under the curve</i>
PBP	Penisilin bağlayan protein
PFGE	<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>
SCCmec	<i>Staphylococcal cassette chromosome</i>

SF	Serum fizyolojik
TEM	<i>Transmission Electron Microscope</i>
TK-MRSA	Toplum kaynaklı MRSA
VISA	Vankomisine orta düzeyde duyarlı <i>S.aureus</i>
VRE	Vankomisine dirençli enterokok
VRSA	Vankomisine dirençli <i>S.aureus</i>
VSSA	Vankomisine duyarlı <i>S.aureus</i>

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. VISA/hVISA izolatlarında saptanan koloni morfolojileri A) Büyüklü küçüklü üreme B) Farklı renkte koloniler	8
2.2. <i>S.aureus</i> ATCC 29213 (VSSA), hVISA ve VISA suşlarının TEM ile alınan görüntüleri	11
2.3. Vankomisin molekül yapısı	11
2.4. Tıkanma (<i>clogging</i>) teorisi	12
2.5. PAP-AUC grafiği	16
2.6. JKD6009 – JKD6008 ile JKD6052 – JKD6051 suşlarına uygulanan PFGE yönteminin sonuçları	16
3.1. PAP-AUC yönteminin yapılış şekli	25
4.1. MRSA izolatlarının vankomisin MİK değerlerinin, kullanılan in vitro duyarlılık yöntemine göre (mikrodilüsyon ve Etest) dağılımı	27
4.2. MRSA izolatlarının daptomisin MİK değerlerinin, kullanılan in vitro duyarlılık yöntemine göre (mikrodilüsyon ve Etest) dağılımı	27
4.3. Vankomisin MİK değerlerinin geometrik ortalamalarının yıllara göre dağılımı	28
4.4. Etest makrometod ve PAP-AUC yöntemiyle hVISA olarak saptanan bir MRSA izolatının Etest makrometod fotoğrafları	31
4.5. Etest makrometod ve PAP-AUC yöntemiyle hVISA olarak saptanan bir MRSA izolatının Etest makrometod fotoğrafları	32
4.6. Şekil 4.5 B’de gösterilen fotoğrafın büyütülmüş şekli	32

4.7. Şekil 4.6'da görülen, inhibisyon bölgesi içerisindeki küçük koloninin kanlı agara pasajlanması sonucu oluşan kolonilerin 24. ve 48. saatteki görünüşleri	33
4.8. Püý örneğinden izole edilen bir hVISA suşunun teikoplanin Etest (Etest makrometod) inhibisyon bölgesindeki bir kolonisinden alınan pasaj sonrasında büyük beyaz ve küçük sarı kolonilerin birlikte üremesinin gösterilmesi	33
4.9. Etest makrometod ile hVISA olarak saptanan izolatların, mikrodilüsyon yöntemiyle elde edilen vankomisin MİK değerleri ile ilişkisi	34
4.10. Etest makrometod ile hVISA olarak saptanan izolatların, standart Etest yöntemiyle elde edilen vankomisin MİK değerleri ile ilişkisi	35
4.11. Etest makrometod ile hVISA olarak saptanan izolatların, standart Etest yöntemiyle elde edilen vankomisin MİK değerlerinin yuvarlanması sonucu oluşan değerler ile ilişkisi	35
4.12. Heterojen VISA olarak saptanan bir izolatın (Şekil 4.5) ve referans hVISA izolatı olan Mu3'ün, PAP-AUC yöntemi için hazırlanan 0, 0.5, 1, 2, 2.5, 4 ve 8 µg/ml vankomisin içeren BHIA'da 48. saat sonunda üreyen kolonileri	37
4.13. Mu3 izolatı ve çalışmamızda saptanan bir hVISA izolatının PAP-AUC grafikleri	38
4.14. Heterojen VISA suşlarının, izole edildiği klinik örnek türüne göre dağılımı	39
4.15. Heterojen VISA izolatlarının yıllara göre dağılımı	40

- 4.16. PAP-AUC yöntemine göre hVISA olarak saptanan izolatların, mikrodilüsyon yöntemiyle saptanan vankomisin MİK değerleri ile ilişkisi 41
- 4.17. PAP-AUC yöntemine göre hVISA olarak saptanan izolatların, standart Etest yöntemiyle saptanan vankomisin MİK değerleri ile ilişkisi 42
- 4.18. PAP-AUC yöntemine göre hVISA olarak saptanan izolatların, standart Etest ile saptanan vankomisin MİK değerlerinin yuvarlanması sonucu oluşan değerler ile ilişkisi 42

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. <i>Staphylococcus</i> cinsinin taksonomik sınıflamadaki yeri	3
2.2. <i>S.aureus</i> ' un virölans faktörleri	4
2.3. Farklı antibiyotiklerin molekül ağırlıkları	12
4.1. MRSA izolatlarının izole edildiği klinik örnekler ve bunların yıllara göre dağılımı	26
4.2. MRSA izolatlarının vankomisin ve daptomisin için elde edilen MİK aralığı, MİK50 ve MİK90 değerleri	29
4.3. Vankomisin için, mikrodilüsyon yöntemine göre Etest yöntemiyle elde edilen MİK değerlerinin dağılımı	30
4.4. Daptomisin için, mikrodilüsyon yöntemine göre Etest yöntemiyle elde edilen MİK değerlerinin dağılımı	30
4.5. PAP-AUC yöntemiyle hVISA olarak saptanan suşların izole edildikleri klinik örnekler, izolasyon yılları, vankomisin ve daptomisin MİK değerleri ile Etest makrometod sonuçları	39
4.6. PAP-AUC yöntemi ile Etest makrometod sonuçlarının karşılaştırılması	43
4.7. Etest makrometodun duyarlılık ve özgüllük değerleri	43

1. GİRİŞ

İlk kez 1878 yılında Robert Koch tarafından tanımlanan stafilokokların, günümüzde birçok enfeksiyonun etkeni olduğu bilinmektedir. Sahip oldukları önemli virülans faktörleriyle deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından besin zehirlenmelerine kadar çok çeşitli klinik tablolara neden olabilmektedirler (1). *Staphylococcus aureus*, stafilokoklar içerisinde en önemli patojen olarak dikkati çekmektedir (2).

Penisilin G'nin 1940'lı yılların başında kullanıma girmesi, stafilokokal enfeksiyonların tedavisi için geçici bir çözüm olmuşsa da, çok kısa bir zaman içerisinde beta-laktamaz üreten *S.aureus* izolatları ortaya çıkmış ve yeni bir antibiyotik ihtiyacı gündeme gelmiştir (3). Penisilinazlara dirençli bir penisilin olan metisilin keşfi, direnç sorununu kısa bir süre erteleyebilmiş, 1961 yılında metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) izolatları ortaya çıkmıştır (4).

Glikopeptid grubu bir antibiyotik olan vankomisin, MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde uzun yıllar başarıyla kullanılmıştır. Fakat ilk kez 1996 yılında Japonya'dan vankomisine orta düzeyde duyarlı *S.aureus* (VISA) izolatı rapor edilmiştir. Bundan bir yıl sonra ise yine Japonya'dan ilk heterojen VISA (hVISA) izolatı bildirilmiştir (5). Günümüzde dünyanın farklı bölgelerinden çok farklı VISA/hVISA oranları bildirilmektedir (6-10). Oranlar arasındaki büyük farklılıkların, hVISA izolatlarının saptanmasında tüm dünyada kabul gören kolay ve standart bir tarama yönteminin olmaması nedeniyle meydana geldiği sanılmaktadır.

Bazı çalışmalarda VISA/hVISA izolatlarının neden olduğu enfeksiyonların, duyarlı izolatlardan kaynaklanan enfeksiyonlara kıyasla daha yüksek oranda bakteriyemi ile seyrettiği ve hastanede kalış süresini uzattığı vurgulanmaktadır (11, 12).

S.aureus izolatları arasında VISA/hVISA prevalansının araştırıldığı çalışmalar incelendiğinde, bu çalışmaların tamamına yakınında erişkin hasta grubundan izole edilen suşların kullanıldığı görülmektedir (13, 14). Çocuk hasta grubunda ise VISA/hVISA sıklığının araştırıldığı sadece iki çalışmaya rastlanılmıştır (15, 16). Bu iki çalışmada da, hVISA sıklığının saptanmasında

altın standart olarak kabul edilen ‘popölasyon analizi profili - eğri altında kalan alan’ (*Population analysis profile - area under the curve*; PAP-AUC) yöntemi kullanılmamıştır.

Bu çalışmanın amacı, Hacettepe Üniversitesi Tıp Faköltesi Hastanesi’nde 2001-2011 yılları arasında çocuk hasta grubundan izole edilen MRSA suşları arasındaki VISA/hVISA sıklığının araştırılmasıdır. Bu amaçla hVISA izolatlarının tanımlanmasında altın standart olarak kabul edilen PAP-AUC yöntemi kullanılmıştır. Heterojen VISA izolatlarının tanımlanmasında Etest makrometod da kullanılmış, bu yöntemin sonuçları PAP-AUC yönteminin sonuçları ile karşılaştırılarak duyarlılık ve özgülük değeri elde edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada MRSA izolatlarının vankomisin ve daptomisin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri mikrodilüsyon ve Etest yöntemiyle saptanmış, bu iki yöntem arasındaki uyum karşılaştırılmış ve vankomisin MİK değeri içinde yıllar içerisinde bir artışın (*MIC creep*) olup olmadığı araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Stafilokoklar ilk kez 1878 yılında Robert Koch tarafından tanımlanmış, 1880 yılında Pasteur tarafından sıvı besiyerinde üretilmiştir. Alexander Ogston 1881’de stafilokokların fare ve kobaylar için patojen olduğunu vurgulamıştır (1). Günümüzde stafilokokların, insanlardaki bakteriyel enfeksiyonların önemli bir kısmından sorumlu olduğu bilinmektedir.

Staphylococcus cinsinde bulunan bu bakteriler hareketsiz, sporsuz ve katalaz pozitifler. Mikroskopik olarak incelendiklerinde düzensiz üzüm salkımı benzeri kümeler oluşturmakla birlikte daha az sıklıkla tek ve çift, tetratlar ve kısa zincirler (3 veya 4 hücreli) şeklinde görülebilen gram pozitif koklardır. *Staphylococcus saccharolyticus* ve başlangıçta anaerobik üreyen fakat pasajlarla birlikte aerotoleran hale gelen *S.aureus* subsp. *anaerobius* dışında fakültatif anaeropturlar (17). Kanlı agarda 18-24 saatte yuvarlak, düzgün, 1-4 mm çapında konveks koloniler oluştururlar. Sıcaklık ve çevre koşullarında meydana gelen değişikliklere dayanıklı bakterilerdir. Kuruluğa dirençlidirler. Genellikle 60°C’de bir saatte aktivitelerini kaybederler. Yüksek tuz konsantrasyonlarında (%10-15) üreyebilme özelliğine sahiptirler (1).

Taksonomik sınıflamaya bakıldığında *Staphylococcus* cinsinin, Bacillales takımına bağlı olan *Staphylococcaceae* ailesi içerisinde yer aldığı görülmektedir (Tablo 2.1) (18). Günümüzde bu cinsin 45 tür içerdiği bilinmektedir (19).

Tablo 2.1. *Staphylococcus* cinsinin taksonomik sınıflamadaki yeri

Alem:	Bakteriler
Şube:	Firmicutes
Sınıf:	Bacilli
Takım:	Bacillales
Familya:	Staphylococcaceae
Cins:	" <i>Staphylococcus</i> "

Staphylococcus aureus, *Staphylococcus* cinsi içinde yer alan en önemli patojendir (2). İnsanlarda çok çeşitli enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Deri ve yumuşak doku enfeksiyonları (folikülit, fronkül, karbonkül, impetigo, sellülit, nekrotizan fasiit vs.), pnömoni, menenjit, osteomyelit, endokardit ve bakteriyemi bunlardan bazılarıdır. Sahip olduğu çeşitli toksinler yoluyla besin zehirlenmesi, haşlanmış deri sendromu, toksik şok sendromu gibi ciddi klinik tablolara da neden olmaktadır (20). *S.aureus*'un sahip olduğu virülans faktörleri Tablo 2.2'de özetlenmiştir (21).

S.aureus, çoğu stafilokok türünde bulunmayan koagülaz enzimine sahiptir. Bu enzimin varlığının araştırılmasına yönelik bir test olan koagülaz testi *S.aureus*'un diğer stafilokok türlerinden ayırt edilmesini sağlar. Dolayısıyla stafilokok türlerinin birbirinden ayrılmasında ilk basamakta uygulanan test koagülaz testidir. *S.aureus* dışındaki bazı stafilokok türleri de bu test ile pozitif sonuç verebilmektedir (*S. lugdunensis*, *S.schleiferi*, *S.intermedius*, *S.delphini*, *S.lutrae*, *S.hyicus*). Bunlardan *S.lugdunensis*, insanlarda toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olabilmekle birlikte, diğer türler daha çok hayvanlarda enfeksiyon oluşturmakta ve insanlardan nadiren izole edilmektedirler (2).

Tablo 2.2. *S.aureus*' un virülans faktörleri

Virülans Faktörleri	Etkileri
Kapsül	Antifagositik etki, adezyon
Protein A	IgG molekülünün Fc kısmına bağlanma
Sitotoksinler	Farklı hücreler üzerine sitolitik etki
Eksfoliatif toksin	Hücreler arası bağların kırılması
Enterotoksinler	Besin zehirlenmesi
TSST-1	Süper antijen
Koagülaz	Fibrinojenin fibrine çevrilmesi
Katalaz	Hidrojen peroksitin parçalanması
Hyalüronidaz	Hyalüronik asitin parçalanması
Fibrinolizin	Oluşan pıhtının parçalanması
Lipaz	Lipitlerin parçalanması
Nükleaz	Nükleik asitlerin parçalanması
Beta-laktamaz	Beta-laktam antibiyotiklerin hidrolizi

S.aureus'a bağılı gelişen ölümcül enfeksiyonlar, 1941 yılında Penisilin G'nin kullanıma girmesinden sonra belirgin bir azalma göstermiştir. Ancak bundan çok kısa bir süre sonra penisiline direnç gösteren *S.aureus* izolatları ortaya çıkmıştır. Bunu takip eden 20 yıl içerisinde *S.aureus* izolatlarının yaklaşık %80'i penisiline dirençli hale gelmiştir. Beta-laktamaz enziminin yol açtığı bu direnç sorunu, 1959 yılında beta-laktamaz enzimine dayanıklı semisentetik bir penisilin olan metisilin klinikte kullanımının başlamasıyla aşılmıştır. Ancak, *S.aureus* enfeksiyonlarının tedavisinde bu antibiyotiğin kullanımının başlamasından sadece iki yıl sonra, 1961 yılında ilk MRSA izolatı tanımlanmıştır (3, 22, 23).

Metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA)'larda, beş adet penisilin bağlayan protein (PBP) bulunurken, MRSA'larda bunlara ek olarak PBP 2' veya PBP 2a olarak adlandırılan 78 kDa ağırlıkta olan farklı bir PBP sentezlenmektedir (5, 24, 25). PBP 2a'yı kodlayan gen, 2.1 kb büyüklüğünde olan ve *mecA* olarak adlandırılan bir gen olup, stafilokokal kaset kromozomu (*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*; *SCCmec*) adı verilen bir direnç adası üzerinde bulunmaktadır (5). Tüm MRSA'lar *mecA* genine sahipken metisiline duyarlı suşlarda bu gen bulunmamaktadır. PBP 2a, diğer PBP'lerden farklı olarak beta-laktam yapısındaki antibiyotiklere karşı düşük afinite göstermektedir. Dolayısıyla PBP 2a, beta-laktam grubu antibiyotiklerin varlığında, yüksek afiniteli PBP'lerin fonksiyonunu görerek peptidoglikan sentezini sürdürebilme yeteneğine sahip olan tek transpeptidazdır (26, 27). Beta-laktam grubu antibiyotikler, hücre duvarında yer alan PBP'lere bağlanarak peptidoglikan sentezini engellemektedir. Metisiline dirençli *S.aureus*'larda ise bu antibiyotikler PBP 2a'ya bağlanamamakta ve bunun sonucunda peptidoglikan sentezi devam etmektedir (5,24).

Günümüzde *S.aureus* izolatlarında metisilin direnci tüm dünyada yaygın olarak görülmekte olup, prevalansı ülkeler arasında oldukça farklılık göstermektedir. Kuzey Avrupa ülkelerinde MRSA prevalansı %1'in altında iken, güney Avrupa ülkelerinde, Amerika'da ve bazı Asya ülkelerinde bu oran %50'leri aşmış durumdadır (4, 23, 28). Günümüzde, sadece hastane kaynaklı MRSA enfeksiyonlarının değil aynı zamanda toplum kaynaklı MRSA

(TK-MRSA) enfeksiyonlarının görülme sıklığında da önemli bir artış dikkati çekmektedir (4, 24).

Metisiline dirençli *S.aureus* enfeksiyonlarının tedavisinde en sık kullanılan ilaçlar glikopeptid grubu antibiyotiklerdir. Glikopeptid grubu bir antibiyotik olan vankomisin 1950'li yılların başlarında keşfedilmiştir. Edmund Kornfeld bir çamur örneğinden *Amycolatopsis orientalis* (eski adlarıyla *Streptomyces orientalis*, *Nocardia orientalis*) adlı bir mikroorganizma izole etmiş ve bu mikroorganizmanın vankomisinin kaynağı olduğu belirlenmiştir (13, 29, 30). Sadece gram pozitif bakterilere karşı etkinliği bulunan vankomisin, 1958 yılında klinik kullanıma girmiş ve yıllar boyunca bu ilaca karşı direnç saptanmamıştır.

İlk kez 1989 yılında olmak üzere vankomisine dirençli enterokoklar (VRE) görülmeye başlanmıştır. Bundan yedi yıl sonra, 1996 yılında ilk vankomisine orta düzeyde duyarlı *S.aureus* (VISA) izolatı bildirilmiştir. 2002 yılından itibaren de vankomisine dirençli *S.aureus* (VRSA) izolatları görülmeye başlamıştır (5).

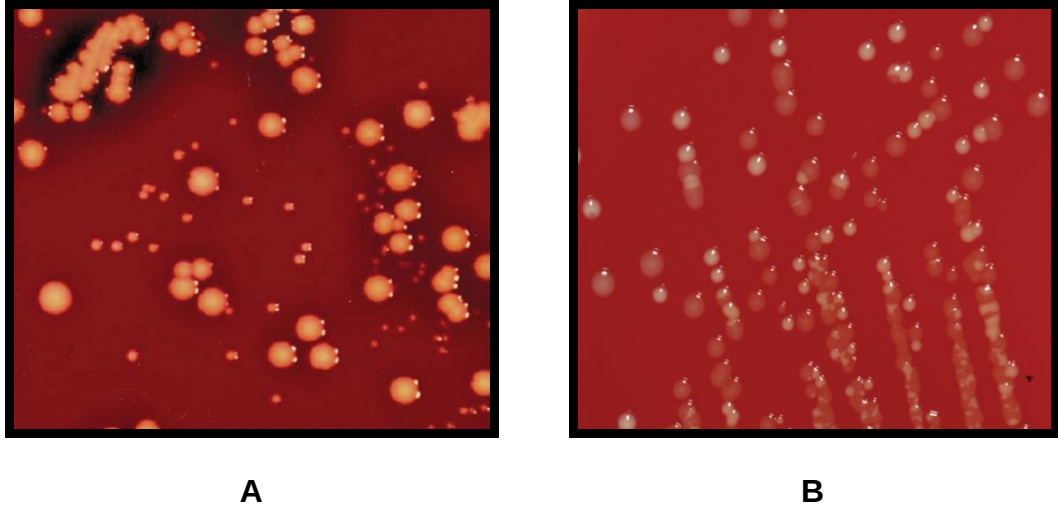
Vankomisin, bakteride hücre duvar sentezini inhibe ederek etki göstermektedir. Bu ilaç, sentezlenmekte olan hücre duvarının bir komponenti olan peptidoglikanın D-alanil-D-alanin ucuna bağlanarak transpeptidasyon basamağını inhibe etmektedir (13).

İlk kez 1996 yılında Japonya'dan Hiramatsu ve ark., vankomisine azalmış duyarlılık gösteren MRSA klinik izolatını tanımlamışlardır. Bu izolat 4 yaşında pulmoner atrezi nedeniyle cerrahi operasyona maruz kalan bir çocuktan elde edilmiştir. Cerrahi operasyondan 2 hafta sonra insizyon bölgesindeki pürülan akıntıdan MRSA izole edilmiş ve vankomisin tedavisine rağmen yanıt alınamamıştır. Mu50 olarak adlandırılan bu izolatın vankomisin MİK (Minimum İnhibitör Konsantrasyon) değeri, mikrodilüsyon yöntemi ile 8 µg/ml olarak saptanmıştır (31). Bu olguyu takiben Amerika'dan (Michigan ve New Jersey) iki olgu ve Fransa'dan bir olgu olmak üzere vankomisine azalmış duyarlılık gösteren diğer *S.aureus* izolatları da bildirilmiştir.

Vankomisin MİK değerleri 8 µg/ml olarak saptandığı için bu izolatlar, *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) kriterlerine göre vankomisine orta düzeyde duyarlı *S.aureus* (*Vancomycin-intermediate S.aureus*; VISA) olarak tanımlanmıştır (32, 33). Bütün bu olgularda saptanan ortak özellik, direnç gelişiminden 6 ay önceki dönem içinde birçok kez ve uzun süreli olmak üzere vankomisin veya teikoplanin tedavisinin uygulanmış olmasıdır. Farklı duyarlılık paternleri gösteren bu izolatların, tedavide birçok kez vankomisin kullanılması sonucunda ya da başka bir ifadeyle vankomisine defalarca maruz kalma neticesinde ortaya çıktığı tezi ortaya atılmıştır (34). 1996 yılından sonra Avrupa, Amerika ve Asya ülkelerinden olmak üzere vankomisin MİK değerleri 8-16 µg/ml arasında değişen diğer VISA izolatları da bildirilmeye başlanmıştır (28, 35, 36).

Vankomisine orta düzeyde duyarlı *S.aureus*'ların ortaya çıkmasından çok kısa bir süre sonra 1997 yılında Hiramatsu ve ark., "heterojen VISA" (hVISA) olarak adlandırılan yeni bir vankomisin direnç tipi tanımlamışlardır (6, 37). *Clinical and Laboratory Standards Institute* kriterlerine göre vankomisine duyarlı bulunan ($MİK \leq 2$); fakat en az 10^5 - 10^6 'da bir sıklıkta olmak üzere MİK değeri >2 µg/ml olan bir subpopülasyon içeren suşlar hVISA olarak tanımlanmaktadır. Mu 3 olarak adlandırılan ilk hVISA izolatı, 64 yaşında pnömoni tanısı almış ve vankomisin tedavisine yanıt vermeyen bir hastadan izole edilmiştir. Bugüne kadar farklı ülkelerden ve değişik oranlarda olmak üzere hVISA izolatları bildirilmiştir (6-10). Vankomisine heterojen direnç gösteren bu izolatların VISA öncülü olduğu sanılmaktadır. Bu izolatların vankomisin antibiyotiğine maruziyetinin devamı durumunda, direnç gösteren subpopülasyonun seçilerek VISA izolatına dönüşümünün gerçekleşebileceği düşünülmektedir (38).

Hem VISA hem de hVISA izolatlarının, kültürde üretildiklerinde farklı morfolojilere sahip koloniler oluşturabildikleri bilinmektedir. Bu izolatların büyüklü küçüklü ve farklı renkte olabilen kolonileri Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. VISA/hVISA izolatlarında saptanan koloni morfolojileri A) Büyüklü küçüklü üreme B) Farklı renkte koloniler (13 numaralı referanstan alınmıştır)

Vankomisin direncinde görülen bu gelişmeleri takiben ilk kez 2002 yılında Michigan'da olmak üzere vankomisine dirençli *S.aureus* (VRSA) izolatı tanımlanmıştır. Bugüne kadar, VRSA enfeksiyonunun görüldüğü 9'u Amerika Birleşik Devletleri'nden (ABD), 1'i Hindistan'dan ve 1'i de İran'dan olmak üzere toplam 11 olgu tanımlanmış olmakla birlikte, bu direnç fenotipinin epidemiyolojik önemi henüz aydınlığa kavuşmamıştır (13, 39).

Vankomisine direnç gösteren suşların büyük bir kısmı, aynı zamanda teikoplanine de direnç göstermektedir. Teikoplanin de, etki mekanizması vankomisine benzeyen ve vankomisinle aynı grupta bulunan 'glikopeptid grubu' bir antibiyotiktir. Bu yüzden bazı kaynaklarda VISA yerine glikopeptidlere orta düzeyde duyarlı *S.aureus* (GISA) ve hVISA yerine heterojen GISA (hGISA) terimleri de kullanılmaktadır. Bununla birlikte günümüzde VISA/hVISA terimleri daha çok kabul gören ve daha sık kullanılan terimlerdir.

2.1. *S.aureus*'ta Görülen Vankomisine Direnç Mekanizmaları

VRSA : Vankomisinin hücredeki hedefi D-alanil-D-alanindir. VRSA izolatlarında görülen direnç, *vanA* gen varlığına bağlıdır. Bu genin vankomisine dirençli enterokoklardan Tn1546 transpozonu ile *S.aureus*

izolatlarına aktarıldığı düşünülmektedir. *vanA* gen varlığında peptidoglikan tabakasında yer alan D-Alanil-D-Alanin yerine D-Alanil-D-Laktat sentezlenmektedir. Bunun sonucunda vankomisin hedef molekülüne bağlanamamakta ve direnç ortaya çıkmaktadır (14).

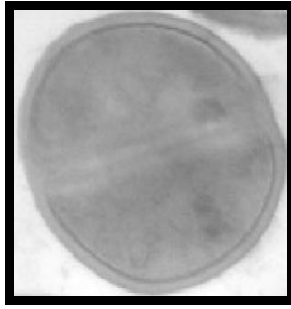
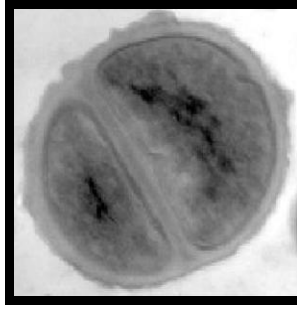
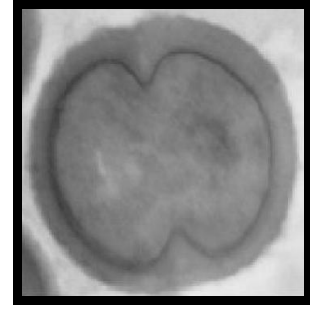
VISA/hVISA : Vankomisine orta düzeyde duyarlı *S.aureus* ve hVISA izolatlarında görülen vankomisin direnç mekanizması ise VRSA izolatlarında görülen direnç mekanizmasından farklılık göstermektedir. Bu izolatlarda *vanA* geni saptanmamıştır. Bugün için VISA/hVISA izolatlarında vankomisin direncinden sorumlu olan mekanizma tam olarak açıklık kazanmamakla birlikte, olası direnç mekanizmalarını ‘vankomisin tüketiminde artış’ ve ‘tıkanma (*clogging*)’ şeklinde özetlemek mümkündür.

2.1.1. Vankomisin tüketiminde artış

Vankomisine orta düzeyde duyarlı *S.aureus* ve hVISA izolatlarında hücre duvarının, vankomisine duyarlı *S.aureus* izolatlarına (VSSA) kıyasla daha kalın olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (40-42). Duvar kalınlığındaki artışın, bu suşlardaki artmış peptidoglikan sentezinin bir sonucu olduğu düşünülmektedir. Vankomisine duyarlı bir *S.aureus*’un hücre duvarı 20 kat peptidoglikan tabakasından oluşurken, Mu50 suşunda bu tabakanın 30-40 kat olduğu belirtilmektedir (43). Ayrıca bu izolatlarda hücre duvarında yer alan peptidoglikan zincirleri arasındaki çapraz bağların miktarında da azalma vardır. Çapraz bağların sayısının daha az olması nedeniyle serbest D-Alanil-D-Alanin miktarı daha fazladır (44, 45). Vankomisin, sentezi tamamlanmış olan peptidoglikan tabakasındaki bu serbest D-Alanil-D-Alanin rezidülerine bağlanarak asıl hedefine ulaşamamaktadır. Vankomisinin asıl hedefi hücre duvarının dış kısımlarında bulunan serbest D-Alanil-D-Alanin rezidüleri değil; hücre membranına yakın yerleşim gösteren öncül peptidoglikan zincirlerinde bulunan D-Alanil-D-Alanin molekülleridir. Bunun bir sonucu olarak, bu suşlarda vankomisin asıl hedefine ulaşmadan dış katmanlarda büyük miktarlarda kullanılarak tüketilmektedir (46, 47). Bu suşların hücre duvarındaki çapraz bağ miktarının azalmasının nedenini sorgulayan birçok araştırma bulunmaktadır (44, 47, 48). Bu çalışmalarda

vurgulanan ortak görüş, çapraz bağ oluşumundan sorumlu enzimler olan transpeptidazların substratlarında meydana gelen değişikliklerin bu sonuca yol açtığı yönündedir. Normalde transpeptidazların bağlandığı muropeptidlerde bulunması gereken aminoasitlerden birisi glutamindir. Oysa bu suşların hücre duvarında yüksek miktarda, amid grubundan yoksun olan muropeptidlerin olduğu gösterilmiştir. Yani bu suşlar, glutamin yerine glutamat bulunduran muropeptidleri hücre duvarlarında barındırmaktadır. Glutamat içeren muropeptidler de (amid grubundan yoksun muropeptidler) transpeptidaz enzimleri için uygun bir substrat olma özelliği taşımamaktadır. Dolayısıyla transpeptidazlar, bu muropeptidlere etkin bir şekilde bağlanamamakta ve yeterli miktarda çapraz bağ oluşturmamaktadırlar (47, 48). Amid grubundan yoksun muropeptidlerin bir başka özelliği ise, normal muropeptidlere kıyasla daha yüksek vankomisin bağlama afinitesine sahip olmalarıdır (44, 47). Özetlenecek olursa vankomisine direnç gösteren suşlar, muropeptidlerde meydana gelen değişiklikler sonucunda yüksek miktarda vankomisin molekülünü hücre duvarlarında yakalayıp hapsedmektedirler (*Affinity trapping/sponge effect*). Böylece hem transpeptidasyon basamağını inhibe ederek serbest D-Alanil-D-Alanin miktarını artırmakta hem de muropeptidlerin vankomisin bağlama afinitesini artırarak daha çok vankomisin molekülünün tüketimine neden olmaktadır. Sonuç olarak vankomisin moleküllerinin yanlış hedeflere bağlanmasına yol açarak bu antibiyotiğin etkisini zayıflatmaktadır. Bir başka deyişle, vankomisinin etki göstermeden büyük miktarlarda tüketimine neden olmaktadır.

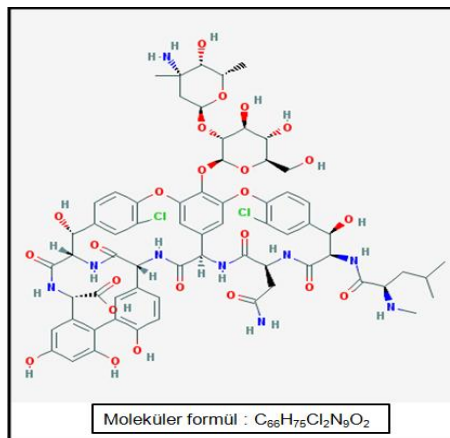
Vankomisine duyarlı *S.aureus*, hVISA ve VISA suşlarının duvar kalınlıklarının geçirimli elektron mikroskopu (*Transmission electron microscope*; TEM) ile ölçülmesi sonucunda elde edilen görüntüler Şekil 2.2'de gösterilmiştir. Hücre duvarı kalınlıkları VISA>hVISA>VSSA olarak saptanmış ve duvar kalınlıkları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (41).

S.aureus* ATCC 29213****24.05 ± 5.6 nm*hVISA****50.01 ± 7.2 nm****VISA****63.01 ± 9.8 nm**

Şekil 2.2. *S.aureus* ATCC 29213 (VSSA), hVISA ve VISA suşlarının TEM ile alınan görüntüleri [Her bir suş için duvar kalınlıkları nanometre cinsinden belirtilmiştir (60.000 x) (nm : nanometre)]

2.1.2. Tıkanma (*clogging*)

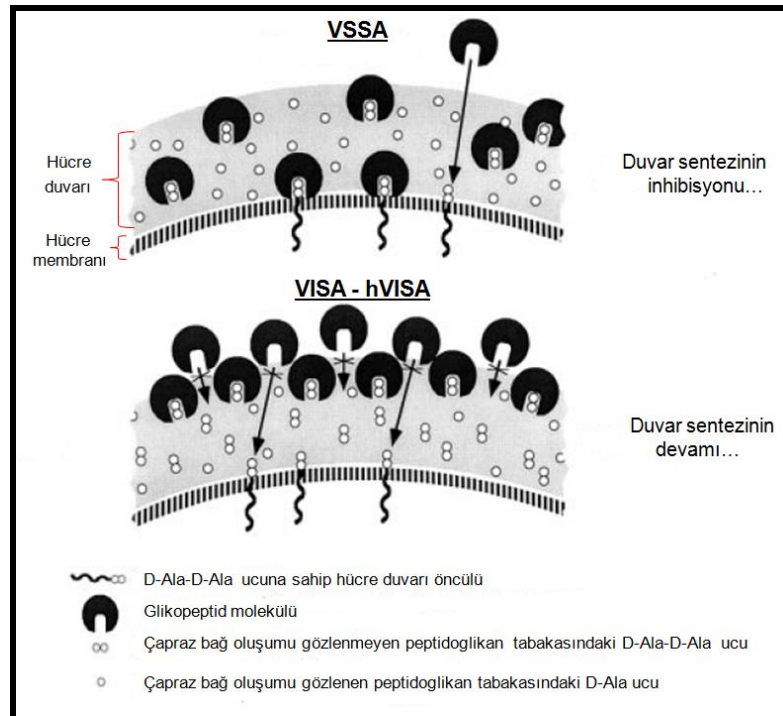
Vankomisin büyük bir moleküldür (Şekil 2.3) (49). Moleküler ağırlığı 1449.2536 g/mol olup, bu değer birçok antibiyotiğe kıyasla yüksek bir değerdir (Tablo 2.3) (50). Sentezi tamamlanmış olan peptidoglikan tabakalarındaki tuzak moleküller tarafından büyük miktarda tutulan vankomisin molekülleri, diğer vankomisin moleküllerinin önünde fiziksel bir engel oluşturmaktadır. Dolayısıyla vankomisin molekülleri, oluşan bu fiziksel bariyeri geçip asıl hedeflerine ulaşamamaktadır (51). Başka bir deyişle, vankomisin moleküllerinin hedefe ulaşmaları, yine vankomisin molekülleri tarafından engellenmektedir. Şekil 2.4'te tıkanma (*clogging*) teorisini açıklayan bir resim gösterilmiştir.



Şekil 2.3. Vankomisinin moleküler yapısı

Tablo 2.3. Farklı antibiyotiklerin molekül ağırlıkları (Her antibiyotik sınıfından birer örnek seçilmiştir)

Antibiyotik	Molekül ağırlığı (g/mol)
Kinopristin/dalfopristin	1713
Daptomisin	1620.7
Vankomisin	1449.3
Kolistin	1155.4
Eritromisin	733.9
Amikasin	585.6
Seftriakson	554.6
Trimetoprim-Sulfametoksazol	543.6
Tetrasiklin	444.4
Aztreonam	435.4
Klindamisin	424.9
Ampisilin	349.4
Linezolid	337.3
Siprofloksasin	331.3
Kloramfenikol	323.1
İmipenem	299.3



Şekil 2.4. Tıkanma (*clogging*) teorisi (50. referanstan uyarlanmıştır)

Özetlenecek olursa, vankomisin moleküllerinin kendisinin yol açtığı tıkanma (*clogging*) ve VISA/hVISA suşlarının tipik özelliği olan kalınlaşmış hücre duvarı; vankomisinin sitoplazmik membrana ulaşmasını, adeta birbirini tamamlayan bir mekanizma ile engellemektedir. Tıkanma nedeniyle vankomisin molekülleri ilerleyememekte, bu sırada hücre duvar sentezi devam ederek kalınlaşmayı bir miktar daha artırmaktadır. Bu artış da vankomisin moleküllerinin sitoplazmik zara ulaşmasını bir süre daha ertelemektedir. Bunun bir sonucu olarak, bu izolatlar zaman kazanmakta ve belki de yeni bir hücre bölünmesini gerçekleştirmeye fırsat bulabilmektedirler. Bunun sonucunda da vankomisinin bakterisidal etkisinden kurtulmaktadırlar (51).

Sieradzki ve ark.'larının (53) 1999 yılında yaptıkları çalışma da, yukarıda açıklanmış olan olası direnç mekanizmalarını destekler niteliktedir. Bu çalışmada 79 yaşında, hipertansiyona bağlı son dönem böbrek hastalığı bulunan bir hastadan, ölümünden önceki 4 ay içerisinde üç kere MRSA izole edilmiştir. Bunlardan ilk ikisi sırasıyla kan ve kateterden izole edilmiş ve vankomisine duyarlı bulunmuştur. Son izolat ise kandan izole edilmiş ve bu izolatta vankomisin direnci gözlenmiştir. Hastanın uzun süreli vankomisin tedavisine maruz kaldığı belirtilmektedir. Bu üç izolatın genetik yakınlığını araştırmak amacıyla *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) yöntemi uygulanmış ve tüm izolatlar genetik olarak benzer bulunmuştur. Ayrıca son izolat, vankomisin içeren besiyerinde üretilmiş ve zamanla besiyerinde bulunan vankomisinin tamamen tükendiği saptanmıştır. Bu besiyerinde üretilen *S.aureus*' ların hücre duvarları saf bir şekilde elde edildikten sonra *High – Performance Liquid Chromatography* (HPLC) yöntemi uygulanmış ve suşun üretildiği besiyerinde zamanla kaybolan vankomisin, bakterilerin saflaştırılan hücre duvarından elde edilmiştir (53).

2.2. Direnç Sınır Değerleri ve Tanımlar

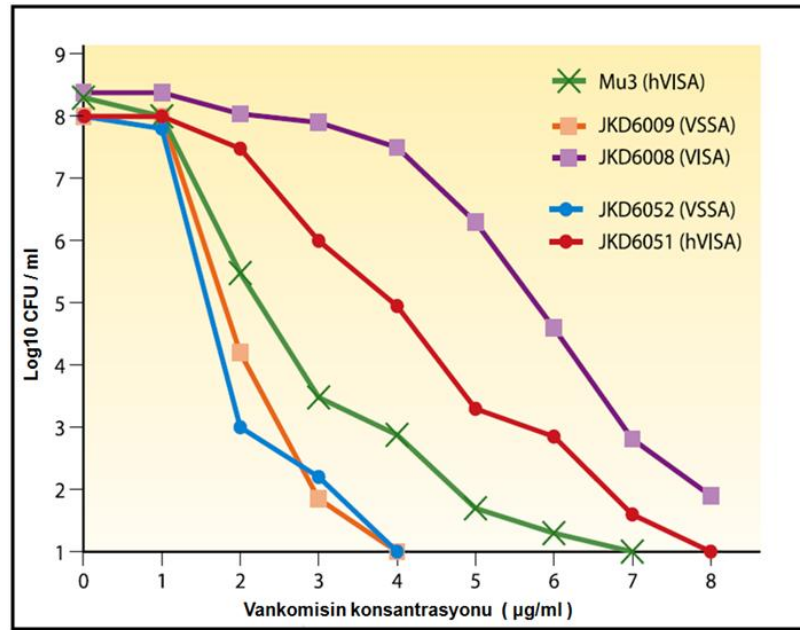
2006 yılı öncesinde *S.aureus* için vankomisin direnç sınır değerleri, ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$ duyarlı, 8-16 $\mu\text{g/ml}$ orta duyarlı ve ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ dirençli olarak belirlenmiştir. 2006 yılında ise CLSI vankomisin tedavisinin uygulandığı

S.aureus enfeksiyonlarıyla ilgili klinik çalışmaların sonuçlarını değerlendirmiş ve bu direnç sınır değerlerini değiştirmiştir. Sonuç olarak günümüzde VISA izolatları için CLSI tarafından belirlenmiş olan vankomisin için direnç sınır değeri, ≤ 4 $\mu\text{g/ml}$ değerinden ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ değerine değiştirilmiştir. Yeni direnç sınır değerlerine göre, MİK değeri ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ olan izolatlar duyarlı, 4-8 $\mu\text{g/ml}$ olan izolatlar VISA ve ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$ olanlar ise VRSA olarak kabul edilmektedir (54). Dolayısıyla daha önceden hVISA olarak tanımlanmış olan izolatlardan bazıları yeni belirlenmiş olan değerlere göre VISA olarak kabul edilmektedir.

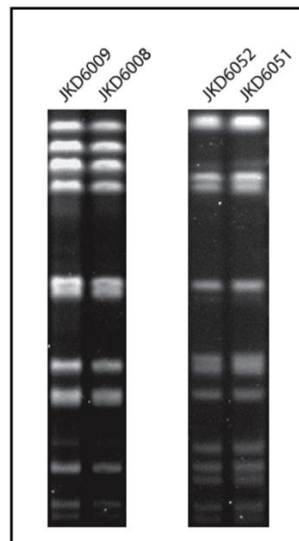
Yukarıda belirtildiği gibi VSSA, VISA ve VRSA tanımları; belirlenmiş direnç sınır değerleri çerçevesinde yapılabilirken, hVISA için belirlenmiş herhangi bir direnç sınır değeri bulunmamaktadır. CLSI kriterlerine göre vankomisine duyarlı bulunan ancak en az 10^5 - 10^6 'da bir sıklıkta olmak üzere, MİK değeri >2 $\mu\text{g/ml}$ olan bir subpopülasyon içeren suşlar hVISA olarak tanımlanırlar. Dolayısıyla bir *S.aureus* suşunun CLSI tarafından önerilen yöntemlerle vankomisine duyarlı bulunması, o suşun hVISA olmadığını ekarte ettirmemektedir. *Clinical and Laboratory Standards Institute* tarafından önerilen sıvı mikrodilüsyon yönteminde, mikropłaktaki her bir çukurcuğa 5×10^4 colony forming unit (cfu) içeren bakteri süspansiyonu eklenmektedir. Kullanılan bu bakteri miktarı ile, en az 10^5 - 10^6 'da bir sıklıkta direnç gösteren subpopülasyonun yakalanma olasılığı düşüktür. Vankomisin MİK değerinin saptanması amacıyla kullanılan standart yöntemlerle hVISA suşlarının yakalanamamasının bir nedeni budur.

Heterojen VISA suşlarının taranmasında tüm dünyada kabul gören, standart bir yöntem bulunmamaktadır (13, 45). Bugüne kadar hVISA izolatlarının tanımlanmasında birçok yöntem denenmiştir. Dirençli popülasyonu seçmek amacıyla farklı konsantrasyonlarda vankomisin veya teikoplanin içeren besiyerlerinin kullanıldığı tarama yöntemleri bulunmaktadır. Bugüne kadar kullanılmış olan tarama yöntemleri; besiyerinin içerdiği antibiyotik türü (vankomisin, teikoplanin), konsantrasyonu (2, 3, 4, 5 veya 6 $\mu\text{g/ml}$), inokulum yoğunluğu (0.5, 2 McFarland), inokulum hacmi (10, 50, 100, 200 μl) ve kullanılan besiyeri (*Brain Heart Infusion Agar* (BHIA), *Mueller Hinton Agar*) olmak üzere farklılık göstermektedir (13). Bunun bir sonucu

olarak da bu yöntemlerin hVISA saptamadaki duyarlılık ve özgüllükleri değişkenlik göstermektedir (55-60). Heterojen VISA izolatlarının saptanmasında kullanılan diğer yöntemler arasında 'Hiramatsu'nun popülasyon analizi' yöntemi, Etest makrometod ve 'popülasyon analizi profili - eğri altında kalan alan' (*Population analysis profile - area under the curve; PAP-AUC*) yöntemi sayılabilir (13). Bunlardan PAP-AUC yöntemi günümüzde hVISA izolatlarının saptanmasında altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemde test edilmek istenen *S.aureus* suşlarının sıvı besiyerindeki 24 saatlik kültürlerinden, artan konsantrasyonlarda vankomisin içeren BHIA besiyerlerine ekimler yapılmaktadır. Otuz yedi derecede 48 saat inkübasyon süresini takiben farklı konsantrasyonlarda vankomisin içeren plaklarda üreme gösteren bakteri kolonileri sayılmaktadır. Bir grafik çizilerek bu grafiğin 'y' eksenine üreyen koloni sayılarının logaritmaları; 'x' eksenine ise antibiyotik konsantrasyonları yazılarak her bir suş için bir eğri elde edilmektedir. Test edilen her bir suş için elde edilen eğrinin altındaki alan (*area under the curve; AUC*), referans hVISA suşu olan 'Mu3' suşu için elde edilen eğri altındaki alana bölünerek bir oran elde edilmektedir. Elde edilen sonuç ≤ 0.9 ise VSSA, $0.9-1.3$ arasında ise hVISA, ≥ 1.3 ise VISA olarak değerlendirilmektedir (24, 55). En güvenilir yöntem olmakla beraber PAP-AUC rutinde uygulanması zor, zaman alıcı, pahalı ve zahmetli bir yöntemdir. Şekil 2.5'te bazı VSSA, hVISA ve VISA suşlarına PAP-AUC yönteminin uygulanması sonucu ortaya çıkan grafik; Şekil 2.6'da ise bu suşların genetik yakınlığını ifade etmek amacıyla uygulanan PFGE sonuçları görülmektedir (13, 40).



Şekil 2.5. PAP-AUC grafiği (i) JKD6008 : 'JKD6009' adlı VSSA izolatının elde edildiği bir endokardit hastasına 42 gün boyunca vankomisin tedavisi uygulanmasının ardından aynı hastadan izole edilen VISA izolatı. (ii) JKD6051 : 'JKD6052' adlı VSSA izolatının izole edildiği başka bir endokardit hastasına 32 gün boyunca vankomisin tedavisi uygulanmasının ardından aynı hastadan izole edilen hVISA izolatı (13 numaralı referanstan alınmıştır).



Şekil 2.6. JKD6009 – JKD6008 ile JKD6052 – JKD6051 suşlarına uygulanan PFGE yönteminin sonuçları (PFGE profillerine bakıldığında JKD6009'un JKD6008 ile; JKD6052'nin ise JKD6051 ile aynı suş olduğu belirtilmektedir) (13 numaralı referanstan alınmıştır)

Etest makrometod ise, hVISA izolatlarının saptanmasıyla ilgili yapılan birçok çalışmada, diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında PAP-AUC yöntemine daha yakın duyarlılık ve özgüllük değerlerine sahip bir yöntemdir (9, 14, 55, 61). Bu yöntemde üretici firma önerileri doğrultusunda, test edilecek *S.aureus* suşunun sıvı besiyerinde 2 McFarland bulanıklığında süspansiyonu hazırlanmaktadır. İki McFarland bulanıklığı; antibiyotik duyarlılık testleri için kullanılan standart bulanıklıktaki (0.5 McFarland) bakteri süspansiyonundan daha yoğun bir süspansiyondur. Daha yoğun bir süspansiyon kullanılmasının nedeni, hVISA içindeki direnç gösteren popülasyonu yakalama olasılığının artırılmasıdır. Bu süspansiyondan 100 µl alınarak BHIA katı besiyeri üzerine yayılmakta; 15-20 dk sonra vankomisin ve teikoplanin içeren Etest şeritleri besiyeri üzerine yerleştirilmektedir. Kırk sekiz saat 35°C'de inkübasyon sonrası vankomisin ve teikoplanin için MİK sonuçları değerlendirilmektedir. Üretici firma önerileri doğrultusunda, vankomisin ve teikoplanin MİK değerlerinin ≥ 8 µg/ml olması veya sadece teikoplanin MİK değerinin ≥ 12 µg/ml olması durumunda suş hVISA olarak değerlendirilmektedir.

Otomatize sistemler ise hVISA izolatlarının saptanmasında başarısız kalmaktadır. Bugüne kadar hVISA oluşumuna neden olabilecek özgül bir gen bölgesi tanımlanmadığı için moleküler yöntemler de hVISA saptanması için kullanılamamaktadır (13, 62).

2.3. VISA, hVISA ve VRSA Epidemiyolojisi

Metisiline dirençli *S.aureus* izolatları içerisinde VISA suşlarına halen ender olarak rastlanmakla birlikte, hVISA suşlarının görülme sıklığı %0.71 ile %65 arasında olmak üzere oldukça farklılık göstermektedir (6, 9-11, 61, 63-66). Elde edilen bu farklı oranların en önemli nedeni, hVISA suşlarının taranmasında değişik yöntem/yöntemlerin kullanılmasıdır (13).

Bugüne kadar tüm dünyadan bildirilen vankomisine dirençli *S.aureus* (VRSA) izolatlarının toplam sayısı ise sadece 11 adettir. Dokuzu ABD'den, 1'i

Hindistan'dan ve 1'i de İran'dan bildirilen bu izolatlarda görülen vankomisin direncinden, VRE'den aktarıldığı düşünülen *vanA* geninin sorumlu olduğu bilinmektedir. Çok nadir rastlanan bu direnç fenotipinin epidemiyolojik önemi henüz aydınlığa kavuşmamıştır (13, 39).

Bunun yanı sıra yapılan bazı çalışmalarda *S.aureus* izolatlarının vankomisin MİK değerlerinde yıllar içerisinde bir artış olduğu saptanmıştır (67, 69). Vankomisine duyarlı bulunmasına rağmen, yüksek vankomisin MİK değerine sahip izolatlarla gelişen bakteriyemilerin, düşük vankomisin MİK değerine sahip izolatlarla gelişenlere oranla 'tedavi başarısızlığı açısından' daha yüksek bir risk taşıdığını vurgulayan çalışmalar da bulunmaktadır (70, 71).

2.4. VISA/hVISA İzolasyonu ile Vankomisin Tedavisi Başarısı Arasındaki İlişki

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, hVISA kaynaklı enfeksiyonlarda bakteriyemi, hastanede kalış süresi ve enfeksiyona bağlı gelişen komplikasyon oranları (endokardit, osteomyelit, kalp yetmezliği) VSSA kaynaklı enfeksiyonlarla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek bulunmuştur (11, 12, 72, 73).

Charles ve ark.'larının (11) yaptığı çalışmada, hVISA bakteriyemilerinin vankomisine duyarlı MRSA bakteriyemilerine oranla daha yüksek bakteri yüküyle seyrettiği ($p=0.001$); bu bakteriyemilerin daha yüksek oranda vankomisin tedavi başarısızlığıyla sonuçlandığı ($p<0.001$) gösterilmiştir. Aynı çalışmada hVISA bakteriyemisi saptanan hastalarda hastanede kalış süresinin daha uzun olduğu ($p=0.006$) gösterilmiştir (11).

Maor ve ark.'larının (72) yaptığı çalışmada hVISA bakteriyemisi saptanan hastaların bakteriyemi süresi, vankomisine duyarlı MRSA bakteriyemisi saptanan hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (12 gün vs. 2 gün). Yine bu çalışmada hVISA bakteriyemisi saptanan hastalardaki 'endokardit' ve 'osteomyelit' gibi

komplikasyonların oranları da vankomisine duyarlı MRSA bakteriyemili hastalara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (endokardit: %18.5 vs. %3.6; osteomyelit: %25.9 vs. %7.2)(72).

2009 yılında yapılan; 19 hVISA endokarditi ile 46 VSSA endokarditinin karşılaştırıldığı çalışmada, hVISA endokarditlerinin istatistiksel olarak daha yüksek oranda persistan bakteriyemiyle seyrettiği gösterilmiştir (%68.4 vs. %37; $p=0.029$). hVISA endokarditi bulunan hastalardaki kalp yetmezliği oranı da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (%47.4 vs. %19.6; $p=0.033$)(73).

Fong ve ark.'larının (12) yaptığı çalışmada VISA ve hVISA kaynaklı enfeksiyonların, VSSA'ların oluşturduğu enfeksiyonlara göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha uzun süre bakteriyemiyle seyrettiği ($p<0.01$) ve hastanede daha uzun bir kalış süresine neden oldukları ($p<0.01$) belirlenmiştir. Yine bu çalışmada kemik, eklem ve protez enfeksiyonları ile VISA/hVISA ilişkisinin önemine dikkat çekilmiştir. Mortalite sıklıkları arasında ise anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Tüm bu veriler, *S.aureus*'larda vankomisine karşı direnç sorununun yakından takip edilmesinin ve heterojen direnç gösteren izolatların saptanmasına yönelik olarak tüm laboratuvarlarda uygulanabilecek standart bir yöntemin gerekliliğini vurgulamaktadır.

2.5. Alternatif Antibiyotikler

Heterojen VISA izolatlarının klinik önemini vurgulayan çalışmalardan da anlaşılacağı üzere glikopeptid antibiyotiklere karşı direnç sorunu gündeme gelmeye başlamıştır. Metisiline dirençli *S.aureus* kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde vankomisin ve teikoplanine alternatif olabilecek antibakteriyel ilaçlara ihtiyaç duyulduğu görülmektedir. Daptomisin, linezolid, kinopristin/dalfopristin gibi yeni antibiyotikler sadece MRSA değil; VRE gibi tedavisinde zorluklar yaşanan birçok gram pozitif bakteri enfeksiyonu için de kullanılabilecek antibiyotiklerdir.

Bunlardan daptomisin yeni bir antibiyotik sınıfı olan siklik lipopeptitlerin ilk üyesidir (74). *Streptomyces roseosporus* tarafından üretilen bir fermentasyon ürünü olan daptomisin 1980'li yılların başında keşfedilmiştir (75).

Daptomisin, kalsiyuma bağlanarak aktifleşmekte ve hücre membranıyla etkileşip membranda iyon kanalları oluşturmaktadır. Kanallardan hücre dışına potasyum ve diğer iyonların çıkışıyla membranda ani bir depolarizasyon meydana gelmektedir. Bunu takiben DNA, RNA ve protein sentezi durmakta ve hücre ölümü meydana gelmektedir (76, 77).

Daptomisin, gram negatif bakterilerin dış membranını geçememesi nedeniyle, sadece gram pozitif bakterilere etkili bir antibiyotiktir (78). *Food and Drug Administration* (FDA) tarafından duyarlı gram pozitif bakterilerin neden olduğu komplike deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, *S.aureus* bakteriyemileri ve *S.aureus*'a bağlı sağ kalp endokarditlerinde kullanılması onaylanmıştır (46).

Yapılan çalışmalarda daptomisinin MRSA izolatlarına karşı yüksek etkinlik gösterdiği saptanmıştır. Dünyanın çeşitli bölgelerinden bildirilen verilere göre MRSA izolatlarının %98.8 – 100'ü daptomisine duyarlı olarak bulunmuştur (79-81). Son derece nadir olarak saptanan direncin ise mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır (82). Bununla birlikte direnç gösteren suşlarda *mprF* ve *yycFG* gibi, bakteri membranının yüzey yükünü düzenleyen genlerde mutasyonlar saptanmıştır. Ayrıca laboratuvar koşullarında elde edilen dirençli suşlarda RNA polimerazın alt ünitelerini kodlayan *rpoB* ve *rpoC* genlerinde mutasyonlar saptanmıştır. Fakat bu mutasyonların saptanamadığı daptomisine dirençli suşlar da mevcuttur (83).

Bazı çalışmalarda ise VISA izolatlarında daptomisin direnci saptanmış fakat bu izolatlarda *mprF* geninde mutasyon saptanamamıştır. Bu nedenle vankomisin ve daptomisin direncinin ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Vankomisine bağlı olarak oluşan hücre duvarı kalınlaşması sonucu daptomisinin hücreye difüzyonunda azalma olabileceği fikri öne sürülmüştür (46).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. İzolatlar

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda dondurularak saklanan MRSA izolatlarıyla ilgili en eski verilerin 2001 senesine ait olduğu saptanmıştır. Dolayısıyla 2001 senesinden günümüze kadar çeşitli klinik örneklerden [kan, kateter, beyin omurilik sıvısı (BOS), bronkoalveolar lavaj (BAL), derin trakeal aspirasyon (DTA), balgam, pü, idrar] izole edilmiş ve -80°C' de %15 gliserollü BHIA içerisinde saklanmış olan MRSA izolatları çalışmamıza dahil edilmiştir. Toplam 94 adet MRSA izolatına ulaşılabilmiş, dondurulan suşlar çözülerek %5 kanlı agara ekimler gerçekleştirilmiştir. Yirmi dört saat 37°C' de inkübasyon sonrasında kültürler değerlendirilmiştir. Tipik *S.aureus* kolonilerine katalaz ve lamda koagülaz testi uygulanarak *S.aureus* oldukları doğrulanmıştır. Lamda koagülaz testiyle negatif sonuç veren kolonilere ise tüpte koagülaz testi uygulanmış; bu testin sonucu esas alınmıştır.

3.2. MRSA İzolatlarının Vankomisin ve Daptomisin MİK Değerlerinin Saptanması

Çalışmamıza dahil edilen MRSA izolatlarının vankomisin ve daptomisin MİK değerlerinin saptanması amacıyla sıvı mikrodilüsyon ve standart Etest yöntemleri kullanılmıştır.

3.2.1. Mikrodilüsyon yöntemi

Vankomisinin Mueller-Hinton sıvı besiyerinde 64 µg/ml'den 0.125 µg/ml'ye kadar olmak üzere çift kat sulandırımı yapılmıştır. Ardından her *S.aureus* suşunun Mueller-Hinton sıvı besiyerinde standart inokulumu (0.5 McFarland yoğunluğunda) hazırlanmıştır. Elde edilen bakteri süspansiyonundan 50 µl alınarak 4950 µl Mueller-Hinton sıvı besiyerine eklenmiş, böylece 50 kez seyreltilmesi sağlanmıştır. Seyreltilen bu bakteri süspansiyonu, vankomisinin 2 kat artan sulandırımını içeren her bir kuyucuğa eşit miktarda eklenmiştir. En sondaki 2 kuyucuktan ilkinde antibiyotik eklenmemiş ve bu kuyucuk üreme kontrolü olarak değerlendirilmiştir. En

sondaki kuyucuğa ise bakteri süspansiyonu eklenmemiş ve bu kuyucuk besiyerinin sterilizasyon kontrolü olarak değerlendirilmiştir. Otuz beş derecede 24 saat inkübasyondan sonra kuyucuklar, bakteri üremesini gösteren bulanıklık yönünden incelenmiştir. Gözle görünür bir bulanıklığın olmadığı en düşük ilaç konsantrasyonu vankomisin MİK değeri olarak belirlenmiştir. CLSI önerileri doğrultusunda vankomisin MİK değeri ≤ 2 µg/ml olan izolatlar duyarlı, 4-8 µg/ml olanlar orta duyarlı (VISA) ve ≥ 16 µg/ml olanlar dirençli kabul edilmiştir (54).

Daptomisin MİK değerlerinin sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle değerlendirilmesi için, CLSI önerileri doğrultusunda Mueller-Hinton sıvı besiyerine, son konsantrasyonu 50 mg/L olacak şekilde kalsiyum eklenmiştir (54). Daptomisin antibiyotığının kalsiyum eklenmiş Mueller-Hinton sıvı besiyerinde 8 µg/ml'den 0.015 µg/ml'ye kadar olmak üzere çift kat sulandırımı yapılmıştır. Ardından her *S.aureus* suşunun yine kalsiyum eklenmiş Mueller-Hinton besiyerinde standart inokulumu (0.5 McFarland yoğunluğunda) hazırlanmıştır. Bundan 50 µl alınarak 4950 µl hacimdeki aynı besiyerine eklenmiş, böylece bakteri süspansiyonunun 50 kez seyreltilmesi sağlanmıştır. Seyreltilen bu bakteri süspansiyonu, daptomisin 2 kat artan sulandırımını içeren her bir kuyucuğa eşit miktarda eklenmiştir. En sonda bulunan kuyucuklar ise sırasıyla üreme ve besiyerinin sterilizasyon kontrol kuyucukları olarak değerlendirilmiştir. Otuz beş derecede 24 saat inkübasyondan sonra kuyucuklar, bakteri üremesini gösteren bulanıklık yönünden incelenmiştir. Gözle görünür bir bulanıklığın olmadığı en düşük ilaç konsantrasyonu daptomisin MİK değeri olarak belirlenmiştir. Daptomisin MİK değeri <2 µg/ml olarak saptanan izolatlar duyarlı olarak kabul edilmiştir (54).

3.2.2. Standart Etest yöntemi

Vankomisin ve daptomisin MİK değerlerinin standart Etest yöntemi ile saptanması için 0.016-256 µg/ml aralığında vankomisin ve daptomisin içeren Etest şeritleri (*AB Biodisk*, İsveç) kullanılmıştır. Etest şeritleri, kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Standart Etest yöntemi için, 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonu Mueller-Hinton besiyeri üzerine steril bir eküvyon ile yayılmıştır. Agar yüzeyinin kuruması beklendikten sonra, oda sıcaklığına getirilmiş Etest şeritleri agar yüzeyine yerleştirilmiştir. Yirmi dört saat 35°C'de inkübasyondan sonra vankomisin ve daptomisin MİK sonuçları değerlendirilmiştir. Elips şeklindeki inhibisyon bölgesiyle Etest şeridinin kesiştiği bölgedeki değer, MİK değeri olarak kabul edilmiştir. Etest ile elde edilen MİK değerlerinin, mikrodilüsyon yönteminde uygulanan çift kat seri dilüsyon değerlerine tam denk gelmediği durumlarda, elde edilen MİK değeri bir üst ilaç konsantrasyonuna yükseltilmiştir.

3.3. Heterojen VISA İzolatlarının Saptanması

Heterojen VISA izolatlarının saptanması amacıyla Etest makrometod ve PAP-AUC yöntemi kullanılmıştır (13).

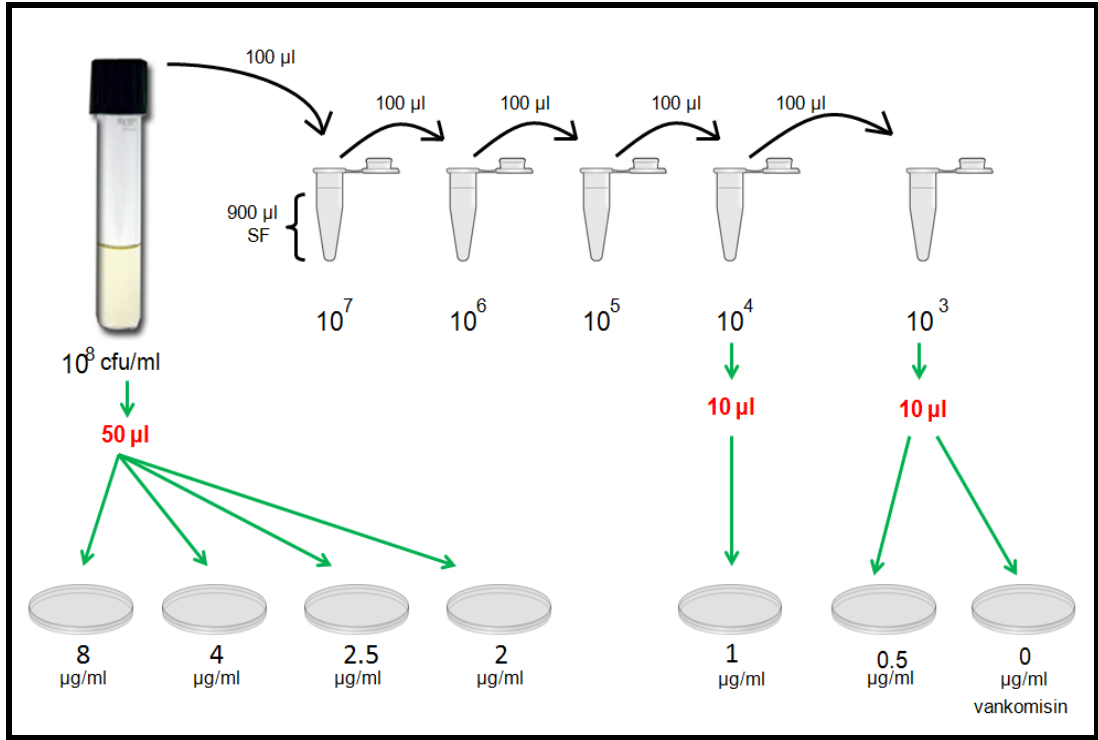
3.3.1. Etest makrometod

Etest makrometod, üretici firma (AB Biodisk, İsveç) önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla test edilecek *S.aureus* suşunun sıvı besiyerinde 2 McFarland bulanıklığında süspansiyonu hazırlanmıştır. Bu süspansiyondan 100 µl alınarak BHIA yüzeyine yayılmış, 15-20 dk sonra besiyeri üzerine vankomisin ve teikoplanin içeren Etest şeritleri yerleştirilmiştir. Kırk sekiz saat 35°C'de inkübasyonun ardından vankomisin ve teikoplanin için MİK sonuçları değerlendirilmiştir. Vankomisin ve teikoplanin MİK değerlerinin ≥ 8 µg/ml olması durumunda veya sadece teikoplanin MİK değerinin ≥ 12 µg/ml olması durumunda izolat hVISA olarak kabul edilmiştir.

3.3.2. 'Popülasyon analizi profili - eğri altında kalan alan' yöntemi

Bu yöntemde test edilmek istenen *S.aureus* suşlarının sıvı besiyerinde hazırlanan süspansiyonlarından, artan konsantrasyonlarda vankomisin içeren (0, 0.5, 1, 2, 2.5, 4, 8 µg/ml) BHIA besiyerlerine ekimler yapılmıştır.

Test edilecek izolatın $\sim 10^8$ cfu/ml(A) bakteri içeren süspansiyonu hazırlanmıştır. Aynı bir tarafta 1.5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplerine (Eppendorf) 900'er µl serum fizyolojik (SF) dağıtılmıştır. Her bir izolat için 5 adet, 900 µl SF içeren mikrosantrifüj tüpü kullanılmıştır. Ana bakteri süspansiyonu vorteks ile karıştırılmış ve bu süspansiyondan 100 µl alınarak, 900 µl SF içeren ilk mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Böylece bakteri süspansiyonu 10 kat seyreltilerek ilk mikrosantrifüj tüpünün $\sim 10^7$ cfu/ml kadar bakteri içermesi sağlanmıştır. Bu mikrosantrifüj tüpü de vorteks ile karıştırılmış ve 100 µl alınarak ikinci mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Bu işlem beşinci mikrosantrifüj tüpüne kadar devam ettirilerek 10^7 (B), 10^6 (C), 10^5 (D), 10^4 (E) ve 10^3 (F) cfu/ml'lik bakteri süspansiyonları elde edilmiştir. 'F' tüpünden (10^3 cfu/ml) 10'ar µl alınarak vankomisin içermeyen (0 µg/ml) ve 0.5 µg/ml vankomisin içeren BHIA besiyerlerine aktarılmış ve süspansiyon öze ile yayılmıştır. 'E' tüpünden (10^4 cfu/ml) 10 µl alınarak 1 µg/ml vankomisin içeren BHIA besiyerine aktarılmış ve yayılmıştır. Ana bakteri süspansiyonundan ise (A) (10^8 cfu/ml) 50'şer µl alınarak 2, 2.5, 4 ve 8'er µg/ml vankomisin içeren BHIA besiyerlerine aktarılmış ve öze yardımıyla besiyerleri üzerine yayılmıştır. Bu işlem her bir MRSA izolatı için tekrar edilmiştir. Plaklar 48 saat 35°C 'de inkübe edildikten sonra farklı konsantrasyonlarda vankomisin içeren plaklarda üreme gösteren bakteri kolonileri sayılmıştır. Bir grafik çizilerek bu grafiğin 'y' eksenine üreyen koloni sayılarının logaritmalari; 'x' eksenine ise antibiyotik konsantrasyonları yazılmış ve her bir suş için bir eğri elde edilmiştir. Test edilen her bir suş için elde edilen eğrinin altında kalan alan (*Area under the curve* [AUC]), referans hVISA suşu olan 'Mu3' suşu için elde edilen eğri altındaki alana bölünerek bir oran elde edilmiştir. Elde edilen sonuç ≤ 0.9 ise izolat VSSA, 0.9 -1.3 arasında ise hVISA, ≥ 1.3 ise VISA olarak değerlendirilmiştir. Şekil 3.1'de PAP-AUC yönteminin yapılış şekli görülmektedir.



Şekil 3.1. PAP-AUC yönteminin yapılış şekli

3.4. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızdaki MRSA izolatlarının vankomisin MİK değerlerinde, ilerleyen yıllarla birlikte olası bir artışın saptanması amacıyla ‘*Spearman testi*’ kullanılmıştır.

Çalışmamızda Etest makrometod ve PAP-AUC yöntemi ile saptanan hVISA izolatlarının, vankomisin MİK değerleriyle ilişkisinin saptanması amacıyla ‘Ki-kare testi (*Linear by linear association*)’ kullanılmıştır.

İstatistiksel anlamlılık sınırı 0.05 olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. MRSA İzolatlarının İzole Edildiği Klinik Örnekler ve Yıllara Göre Dağılımı

Çalışmamızda 2001'in Ocak ayından 2011 Kasım ayına kadar, çocuk hasta grubu klinik örneklerinden izole edilen toplam 94 adet MRSA izolatına ulaşılmıştır. Bu izolatların 13'ü 2001, 8'i 2002, 4'ü 2003, 7'si 2004, 9'u 2005, 16'sı 2006, 9'u 2007, 10'u 2008, 13'ü 2009, 3'ü 2010 ve 2'si 2011 yılına aittir. Çalışmamıza, her hastaya ait tek MRSA izolatu dahil edilmiştir. Bu izolatların izole edildiği klinik örnekler ve bunların yıllara göre dağılımı Tablo 4.1'de görülmektedir.

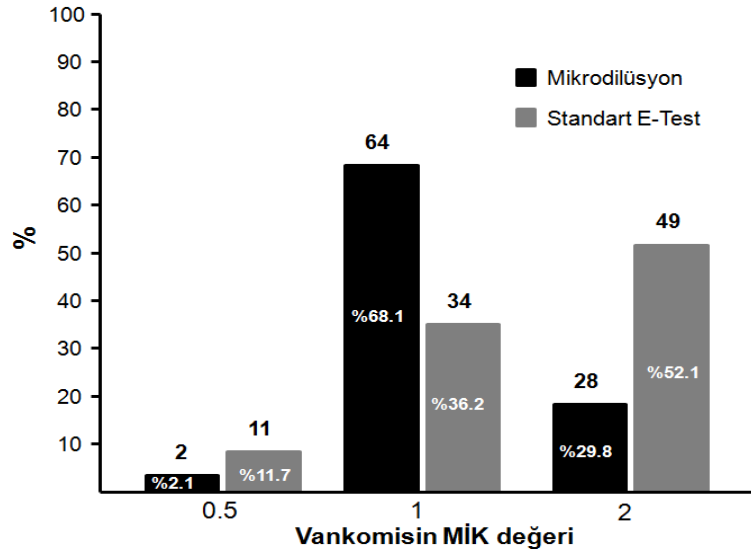
Tablo 4.1. MRSA izolatlarının izole edildiği klinik örnekler ve bunların yıllara göre dağılımı

	Kan	Kateter	Kemik iliği	BOS	Püy	Yara yeri	BAL	DTA	Balgam	İdrar	Gaita	Diğer	Toplam
2001	12		1										13
2002	8												8
2003	4												4
2004	4				1	1		1					7
2005	4	1			2	1		1					9
2006	4	2			2		2	3	1		1	1	16
2007	5			1	1			2					9
2008		1		2	4			1				2	10
2009	7			1	3							2	13
2010	1				1							1	3
2011					1					1			2

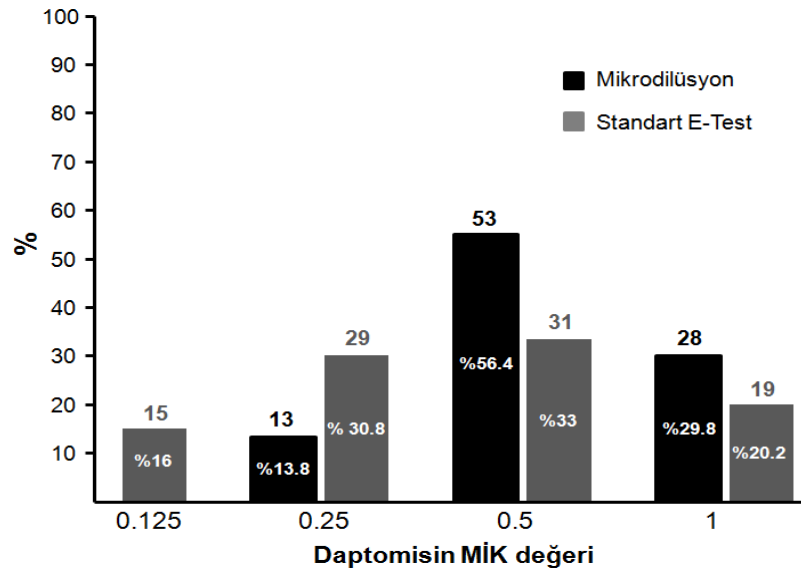
4.2. MRSA İzolatlarının Vankomisin ve Daptomisin MİK Değerleri

Çalışmamızdaki MRSA izolatlarının vankomisin ve daptomisin MİK değerleri, her iki antibiyotik için hem mikrodilüsyon hem de standart Etest yöntemiyle saptanmıştır. Kullanılan in vitro duyarlılık yöntemine göre (mikrodilüsyon ve Etest) ortaya çıkan MİK dağılımı her iki antibiyotik için de

ayrı ayrı hesaplanmıştır. Vankomisin için elde edilen sonuçlar Şekil 4.1'de; daptomisin için elde edilen sonuçlar ise Şekil 4.2'de görülmektedir.



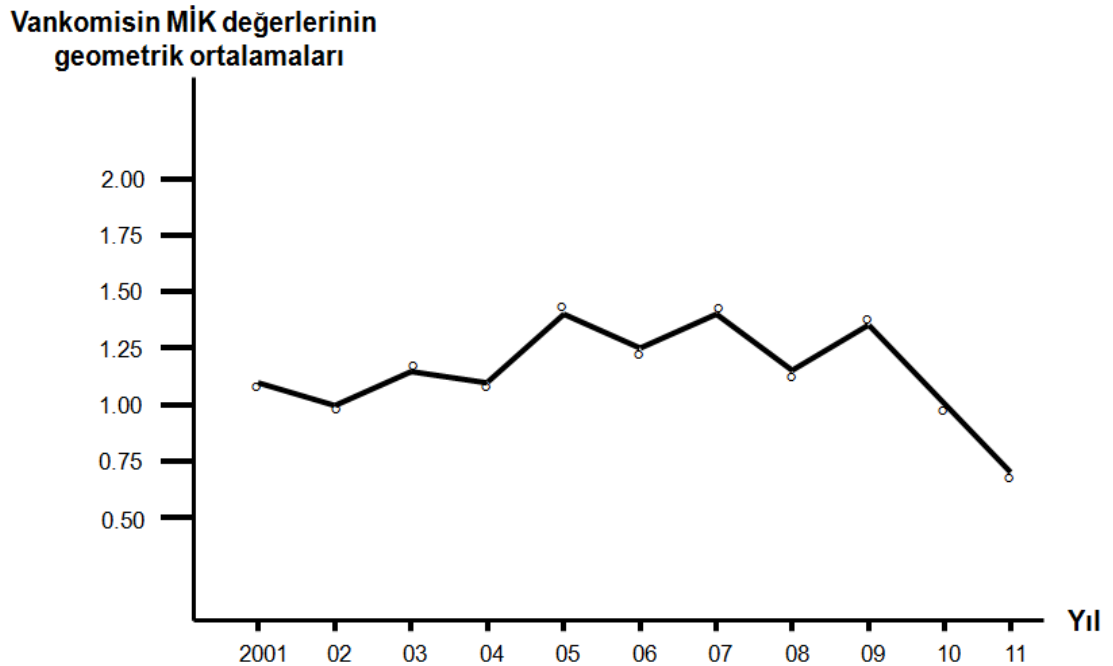
Şekil 4.1. MRSA izolatlarının vankomisin MİK değerlerinin, kullanılan in vitro duyarlılık yöntemine göre (mikrodilüsyon ve Etest) dağılımı (Sütunların içerisinde izolat oranları; sütunların üzerinde ise izolat sayıları belirtilmiştir)



Şekil 4.2. MRSA izolatlarının daptomisin MİK değerlerinin, kullanılan in vitro duyarlılık yöntemine göre (mikrodilüsyon ve Etest) dağılımı (Sütunların içerisinde izolat oranları; sütunların üzerinde ise izolat sayıları belirtilmiştir)

4.3. Yıllara Göre MRSA İzolatlarının Vankomisin MİK Değerlerinde Görülen Değişiklik

Metisiline dirençli *S.aureus* izolatlarının vankomisin MİK değerlerinin yıllara göre artıp artmadığını saptamak amacıyla Ocak 2001'den Kasım 2011 tarihine kadar, her bir sene boyunca izole edilen MRSA izolatlarının vankomisin MİK değerlerinin geometrik ortalaması alınmıştır. Mikrodilüsyon ile belirlenen vankomisin MİK değerlerinin geometrik ortalamalarının yıllara göre değişimi Şekil 4.3'te görülmektedir. 2001 ve 2011 yılları arasında vankomisin MİK değerlerinde artış (*MIC creep*) saptanmamıştır ($p=0.79$, *Spearman* testi).



Şekil 4.3. Vankomisin MİK değerlerinin geometrik ortalamalarının yıllara göre dağılımı

4.4. MRSA İzolatlarının Vankomisin ve Daptomisin İçin Elde Edilen MİK Aralığı, MİK50 ve MİK90 Değerleri

İzolatların vankomisin ve daptomisin için elde edilen MİK değerleri kullanılarak, her iki antibiyotik için de MİK aralığı, MİK50 ve MİK90 değerleri

hesaplanmıştır. İzolatların vankomisin için hem mikrodilüsyon hem de Etest yöntemiyle, MİK aralığı 0.5-2 µg/ml olarak saptanmıştır. Daptomisin için ise mikrodilüsyon yöntemiyle MİK aralığı 0.25-1 µg/ml olarak saptanırken; Etest yöntemiyle 0.125-1 µg/ml olarak bulunmuştur. Tüm MRSA izolatları hem mikrodilüsyon hem de Etest yöntemiyle vankomisin ve daptomisine duyarlı olarak saptanmıştır. Sonuçlar Tablo 4.2’de görülmektedir.

Tablo 4.2. MRSA izolatlarının vankomisin ve daptomisin için elde edilen MİK aralığı, MİK50 ve MİK90 değerleri

	Mikrodilüsyon			Etest		
	MİK aralığı (µg/ml)	MİK50 (µg/ml)	MİK90 (µg/ml)	MİK aralığı (µg/ml)	MİK50 (µg/ml)	MİK90 (µg/ml)
Vankomisin	0.5 - 2	1	2	0.5 - 2	2	2
Daptomisin	0.25 - 1	0.5	1	0.125 - 1	0.5	1

4.5. MRSA İzolatlarının Mikrodilüsyon ve Etest Yöntemleri ile Belirlenen MİK Değerleri Arasındaki Uyum

İzolatların mikrodilüsyon ve Etest yöntemleri ile belirlenen MİK değerleri arasındaki uyum incelendiğinde, çoğu izolatın vankomisin için Etest ile saptanan MİK değerinin mikrodilüsyona eşit veya 1 dilüsyon daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Standart Etest yöntemiyle saptanan vankomisin MİK değeri, mikrodilüsyon yöntemiyle saptanan MİK değerinden 1 dilüsyon yüksek olan izolat oranı %28.7 olarak bulunmuştur. İzolatların %56.4’ünün MİK değeri her iki yöntemle de eşit olarak saptanmıştır. Mikrodilüsyon yöntemiyle elde edilen MİK değeri, standart Etest yöntemiyle elde edilen MİK değerinden 1 dilüsyon yüksek olan izolat oranı ise %14.9 olarak bulunmuştur. Referans yöntem olan mikrodilüsyona göre vankomisin Etest MİK değerlerinin dağılımı Tablo 4.3’te görülmektedir. Vankomisin için ± 1 dilüsyon farkı dikkate alındığında, Etest ve mikrodilüsyon ile elde edilen MİK değerleri arasındaki uyum %100 olarak bulunmuştur.

Tablo 4.3. Vankomisin için, mikrodilüsyon yöntemine göre Etest yöntemiyle elde edilen MİK değerlerinin dağılımı

Vankomisin Etest			
MİK dilüsyon farkları	-1	0	+1
İzolat sayısı (oranı)	14 (14.9)	53 (56.4)	27 (28.7)

Daptomisin için ise, izolatların büyük kısmında Etest ile belirlenen MİK değerlerinin, mikrodilüsyon ile elde edilen MİK değerlerinden 1 dilüsyon düşük veya eşit olduğu saptanmıştır. Referans yöntem olan mikrodilüsyona göre daptomisin Etest MİK değerlerinin dağılımı Tablo 4.4'te görülmektedir. Daptomisin için ± 1 dilüsyon ve ± 2 dilüsyon farkı dikkate alınarak Etest ile mikrodilüsyon MİK değerleri arasındaki uyum incelendiğinde, uyum oranları sırasıyla %88.3 ve %100 olarak bulunmuştur.

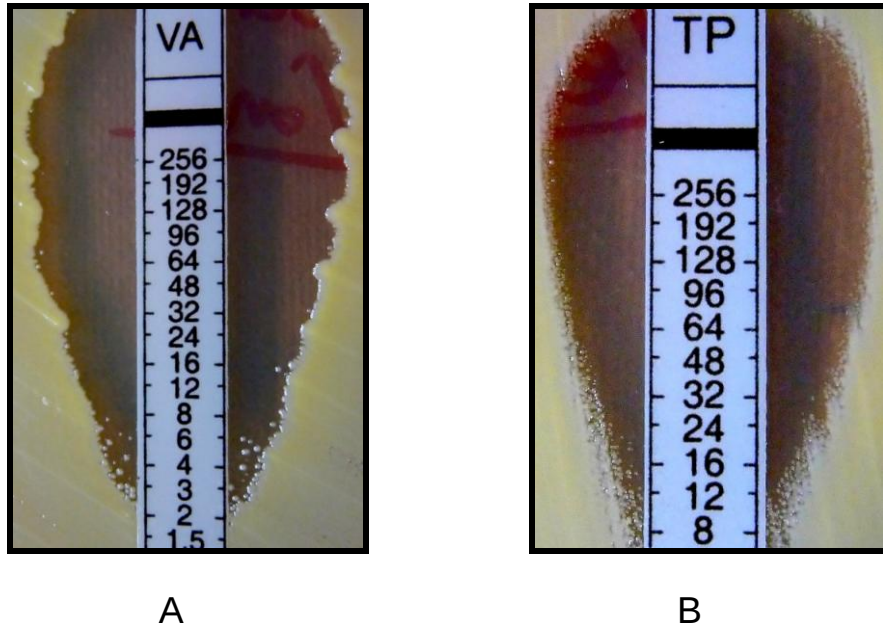
Tablo 4.4. Daptomisin için, mikrodilüsyon yöntemine göre Etest yöntemiyle elde edilen MİK değerlerinin dağılımı

Daptomisin Etest				
MİK dilüsyon farkları	-2	-1	0	+1
İzolat sayısı (oranı)	11 (11.7)	45 (47.9)	26 (27.6)	12 (12.8)

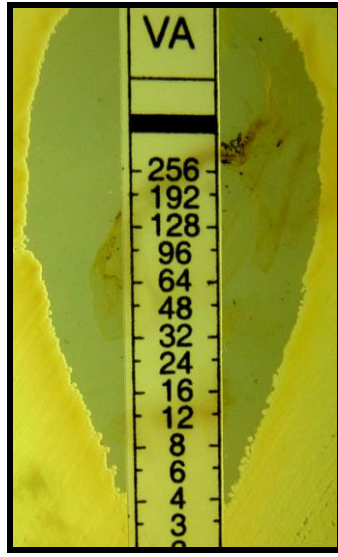
4.6. Etest Makrometoda Göre hVISA Olarak Saptanan İzolatlar

Etest makrometoda göre hVISA olarak saptanan izolat sayısı 19 (%20.2) olarak bulunmuştur. Şekil 4.4'te Etest makrometod sonucu pozitif bulunan bir MRSA izolatının Etest makrometod fotoğrafları görülmektedir.

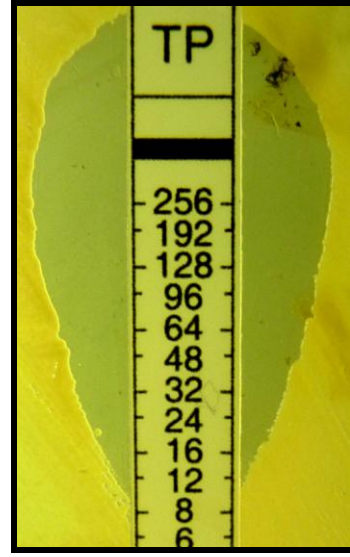
Etest makrometod ile hVISA olarak saptanan diğer bir izolatın fotoğrafları ise Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Teikoplanin Etest şeridinin bulunduğu plaktaki inhibisyon bölgesine daha yakından bakıldığında, şeridin sol tarafında 32 ile 48 değerleri arasına denk gelen hizada, periferik yerleşimli küçük bir koloni dikkati çekmektedir (Şekil 4.6). İnhibisyon bölgesi içerisinde bulunan bu koloni kanlı agara pasajlanmış, üreyen kolonilerin 24 ve 48. saatte fotoğrafı çekilmiştir. Fotoğraflar Şekil 4.7'de gösterilmiştir. Büyüklü küçüklü üremenin VISA/hVISA izolatları için tipik olduğu bilinmektedir. Küçük kolonilerin 24. saat sonunda belirgin değilken, 48. saatte daha belirgin bir hal aldıkları; fakat yine de standart *S.aureus* kolonisi boyutuna erişemedikleri gözlemlenmiştir.



Şekil 4.4. Etest makrometod ve PAP-AUC yöntemiyle hVISA olarak saptanan bir MRSA izolatının Etest makrometod fotoğrafları (Vankomisin ve teikoplanin inhibisyon bölgeleri içerisindeki üremeler dikkati çekmektedir) A) Vankomisin MİK: 6 µg/ml, B) Teikoplanin MİK: 16 µg/ml

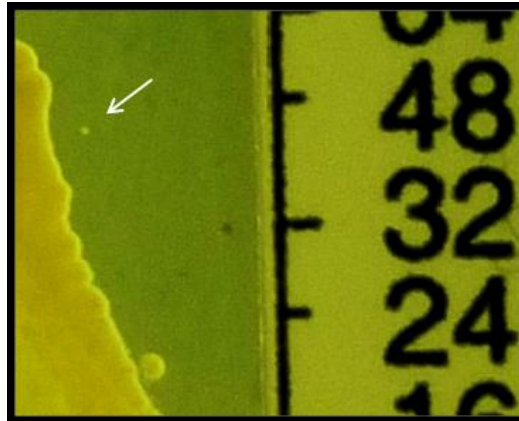


A



B

Şekil 4.5. Etest makrometod ve PAP-AUC yöntemiyle hVISA olarak saptanan bir MRSA izolatının Etest makrometod fotoğrafları
A) Vankomisin MİK: 6 µg/ml, B) Teikoplanin MİK: 12 µg/ml



Şekil 4.6. Şekil 4.5 B'de gösterilen fotoğrafın büyütülmüş şekli (Teikoplanin Etest şeridinin sol tarafında, inhibisyon bölgesi içerisinde üreyen küçük bir koloni dikkati çekmektedir)



24. saat



48. saat

Şekil 4.7. Şekil 4.6'da görülen, inhibisyon bölgesi içerisindeki küçük koloninin kanlı agara pasajlanması sonucu oluşan kolonilerin 24. ve 48. saatteki görünüşleri

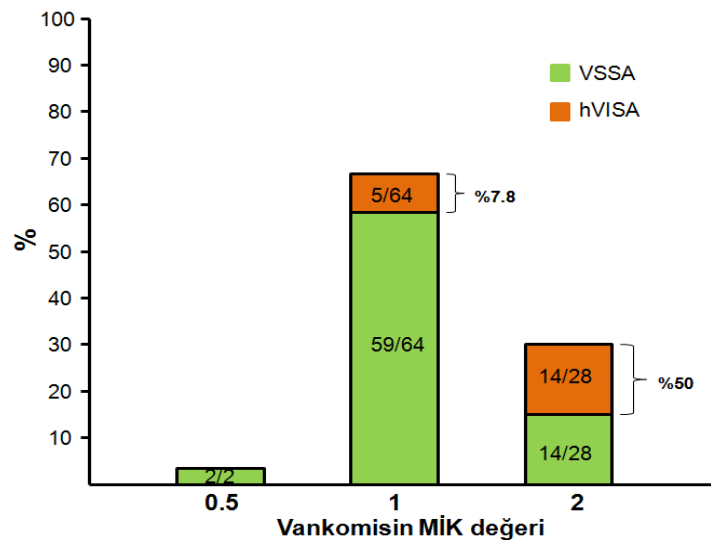
Püý örneğinden izole edilen ve hVISA olarak saptanan başka bir suşun teikoplanin Etest (Etest makrometod) inhibisyon bölgesi içerisinde üreyen bir kolonisi kanlı agara pasajlanmıştır. Kanlı agarda üreyen koloniler Şekil 4.8'de gösterilmiştir. Büyük beyaz koloniler ile küçük sarı kolonilerin birlikte üremesi dikkati çekmektedir.



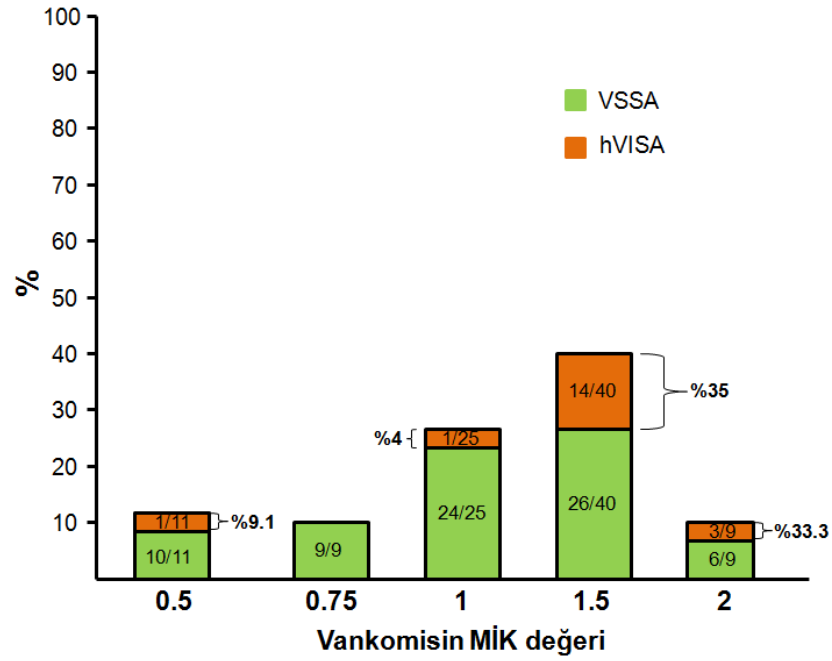
Şekil 4.8. Püý örneğinden izole edilen bir hVISA suşunun teikoplanin Etest (Etest makrometod) inhibisyon bölgesindeki bir kolonisinden alınan pasaj sonrasında büyük beyaz ve küçük sarı kolonilerin birlikte üremesinin gösterilmesi

4.7. Etest Makrometoda Göre hVISA Olarak Saptanan İzolatların, Vankomisin MİK Değerleri ile İlişkisi

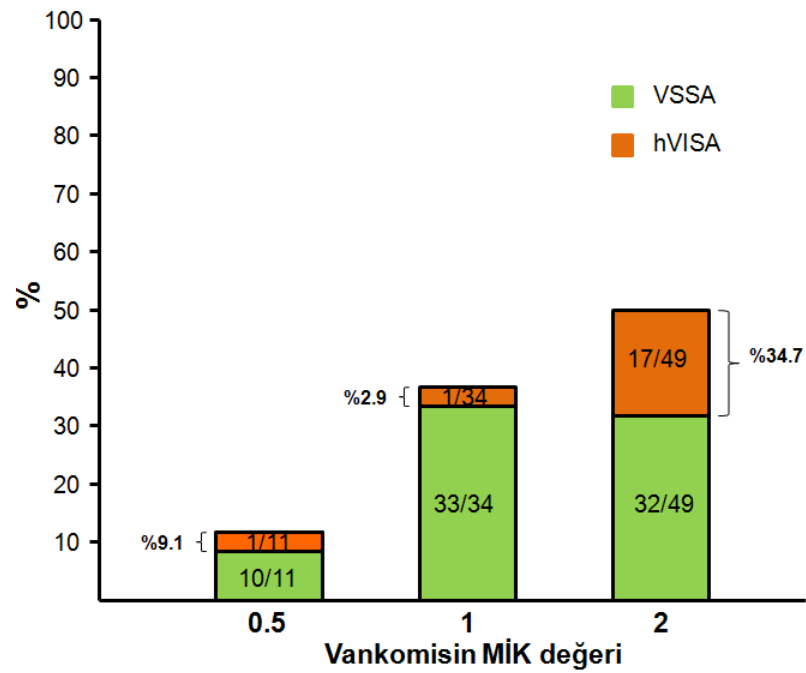
Çalışmamızda, artan vankomisin MİK değerleri ile Etest makrometoda göre hVISA olarak bulunan izolatların oranının da arttığı saptanmıştır. Mikrodilüsyon yöntemiyle saptanan vankomisin MİK değerleri ile Etest makrometod pozitifliği arasındaki ilişki Şekil 4.9'da; standart Etest yöntemiyle saptanan vankomisin MİK değerleri ile Etest makrometod pozitifliği arasındaki ilişki Şekil 4.10'da görülmektedir. Etest ile saptanan vankomisin MİK değerlerinin yuvarlanması sonucu ortaya çıkan değerlerle, Etest makrometod pozitifliği arasındaki ilişki ise Şekil 4.11'de gösterilmiştir. Her MİK değerine karşılık gelen sütundaki izolat sayıları belirtilmiştir. Yeşil renkli sütunların içerisinde VSSA izolatlarının; turuncu renkli sütunların içerisinde ise hVISA izolatlarının sayısı gösterilmiştir. Ayrıca hVISA izolatlarının oranları belirtilmiştir. Her üç grafik için de (Şekil 4.9, 4.10 ve 4.11), Etest makrometod ile hVISA olarak saptanan izolatların oranının, artan vankomisin MİK değerlerine paralel olarak artış gösterdiği saptanmıştır. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Ki-Kare testi; Şekil 4.9: $p < 0.001$, Şekil 4.10: $p = 0.005$, Şekil 4.11: $p = 0.002$).



Şekil 4.9. Etest makrometod ile hVISA olarak saptanan izolatların, mikrodilüsyon yöntemiyle elde edilen vankomisin MİK değerleri ile ilişkisi



Şekil 4.10. Etest makrometod ile hVISA olarak saptanan izolatların, standart Etest yöntemiyle elde edilen vankomisin MİK değerleri ile ilişkisi

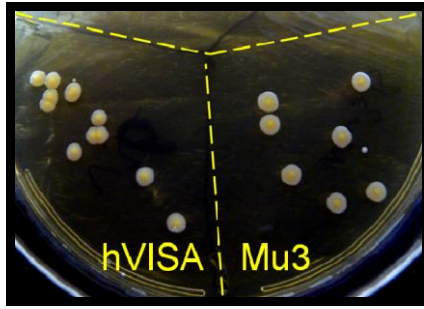


Şekil 4.11. Etest makrometod ile hVISA olarak saptanan izolatların, standart Etest yöntemiyle elde edilen vankomisin MİK değerlerinin yuvarlanması sonucu oluşan değerler ile ilişkisi

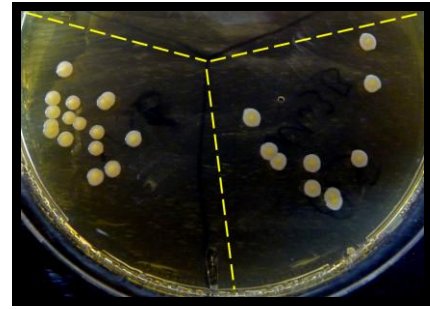
4.8. ‘Popülasyon Analizi Profili - Eğri Altında Kalan Alan’ Yöntemine Göre hVISA Olarak Saptanan İzolatlar

Metisiline dirençli *S.aureus* izolatları arasındaki gerçek hVISA oranının saptanması amacıyla çalışmamıza dahil edilen suşların tümüne PAP-AUC yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemle 94 izolattan 20’si (%21.3) hVISA olarak saptanmıştır. Şekil 4.12’de referans hVISA suşu olan Mu3 ile çalışmamızda saptanan bir hVISA izolatının 0, 0.5, 1, 2, 2.5, 4 ve 8 µg/ml’lik vankomisin konsantrasyonuna sahip BHIA’lardaki üremelerinin fotoğrafları görülmektedir. Bu izolat ve Mu3 suşunun, artan konsantrasyonlarda vankomisin içeren BHIA’da üreyen kolonileri sayılmış ve elde edilen sayısal değerlerin logaritmik değerleri hesaplanmıştır. Elde edilen değerler bir grafiğe aktarılmıştır. Çalışmamızda saptanan bu hVISA izolatının eğri altında kalan alanı, Mu3 izolatının eğri altındaki alanına bölündüğünde sonuç 1.286 olarak bulunmuştur. Bu sonuç 0.9 ile 1.3 arasında olduğu için, izolatın bir hVISA izolatı olduğunu göstermektedir.

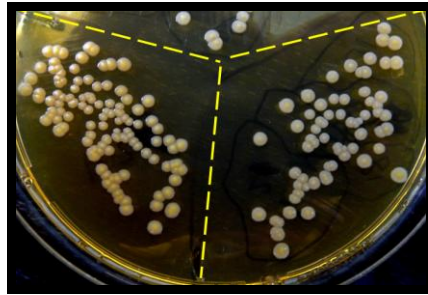
Şekil 4.13’te ise Mu3 izolatı ile, çalışmamızda hVISA olarak saptanan bir izolatın PAP-AUC grafikleri gösterilmiştir. Saptanan bu hVISA izolatının eğri altında kalan alanı, Mu3 suşunun eğri altında kalan alanına bölündüğünde sonuç 1.044 olarak bulunmuştur. Elde edilen grafik dikkatli incelendiğinde eğri altında kalan alanlar arasındaki fark gözle de görülebilmektedir.



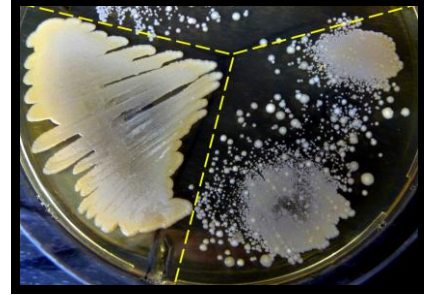
0 µg/ml vankomisin



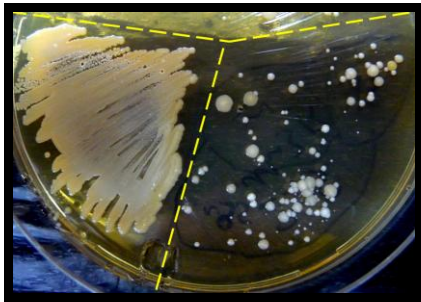
0.5 µg/ml vankomisin



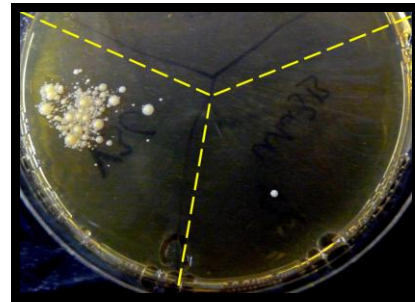
1 µg/ml vankomisin



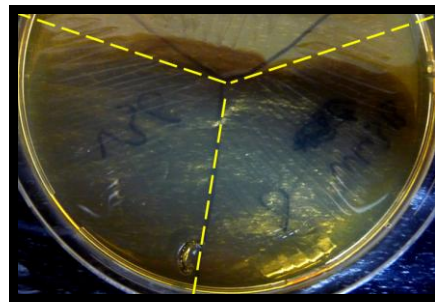
2 µg/ml vankomisin



2.5 µg/ml vankomisin

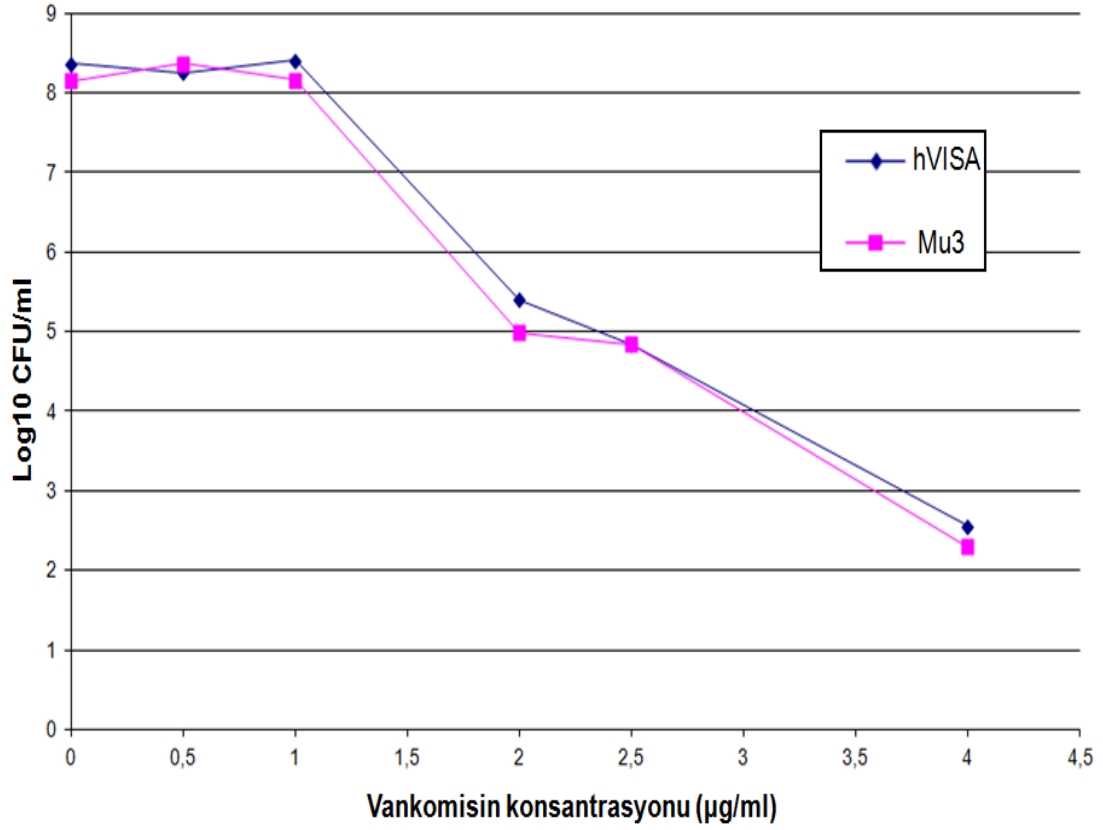


4 µg/ml vankomisin



8 µg/ml vankomisin

Şekil 4.12. Heterojen VISA olarak saptanan bir izolatın (Şekil 4.5) ve referans hVISA suşu olan Mu3'ün, PAP-AUC yöntemi için hazırlanan 0, 0.5, 1, 2, 2.5, 4 ve 8 µg/ml vankomisin içeren BHIA'da 48. saat sonunda üreyen kolonileri



Şekil 4.13. Mu3 suşu ve çalışmamızda saptanan bir hVISA izolatının PAP-AUC grafikleri (Eğri altında kalan alanlar her iki izolat için de hesaplandığında $AUC_{hVISA}/AUC_{Mu3} = 1.044$ olarak bulunmuş, bu değer de 0.9 ile 1.3 arasında olduğu için izolat hVISA olarak kabul edilmiştir)

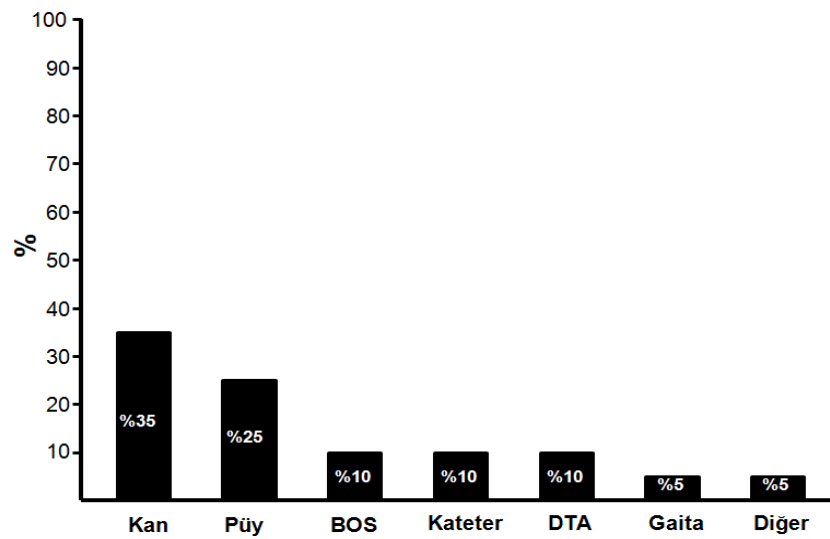
Çalışmamızda PAP-AUC yöntemiyle hVISA olarak saptanan suşların izole edildikleri klinik örnekler, izolasyon yılları, vankomisin ve daptomisin MİK değerleri ile Etest makrometod sonuçları Tablo 4.5'te gösterilmiştir.

Tablo 4.5. PAP-AUC yöntemiyle hVISA olarak saptanan suşların izole edildikleri klinik örnekler, izolasyon yılları, vankomisin ve daptomisin MİK değerleri ile Etest makrometod sonuçları

İzolat no.	Klinik örnek türü	İzole edildiği tarih	Vankomisin		Daptomisin		E-Test Makrometod sonucu *
			Mikrodilüsyon	E-Test	Mikrodilüsyon	E-Test	
1	Kan	2001	2	1.5	0.5	0.19	N
2	Kan	2003	2	1.5	1	0.5	P
3	Kan	2005	2	1.5	1	0.75	P
4	Kan	2006	2	2	0.5	0.75	P
5	Kateter	2006	2	1	1	0.5	N
6	DTA	2006	2	1.5	1	0.75	P
7	Püy	2006	1	1.5	0.5	0.75	N
8	Gaita	2006	2	1.5	1	0.75	P
9	Püy	2006	1	1.5	1	1	N
10	Kateter	2006	1	1.5	0.25	0.38	N
11	Kan	2007	2	1.5	0.5	0.75	P
12	BOS	2007	2	1.5	1	0.38	N
13	Püy	2007	1	1.5	0.25	0.125	N
14	DTA	2007	2	2	1	1	N
15	Diğer	2008	1	1.5	0.5	0.5	P
16	Püy	2008	2	1.5	0.5	0.25	P
17	Kan	2009	2	2	0.5	0.19	P
18	Kan	2009	2	1.5	1	0.75	P
19	BOS	2009	2	1	0.5	0.38	P
20	Püy	2009	2	1.5	1	0.38	P

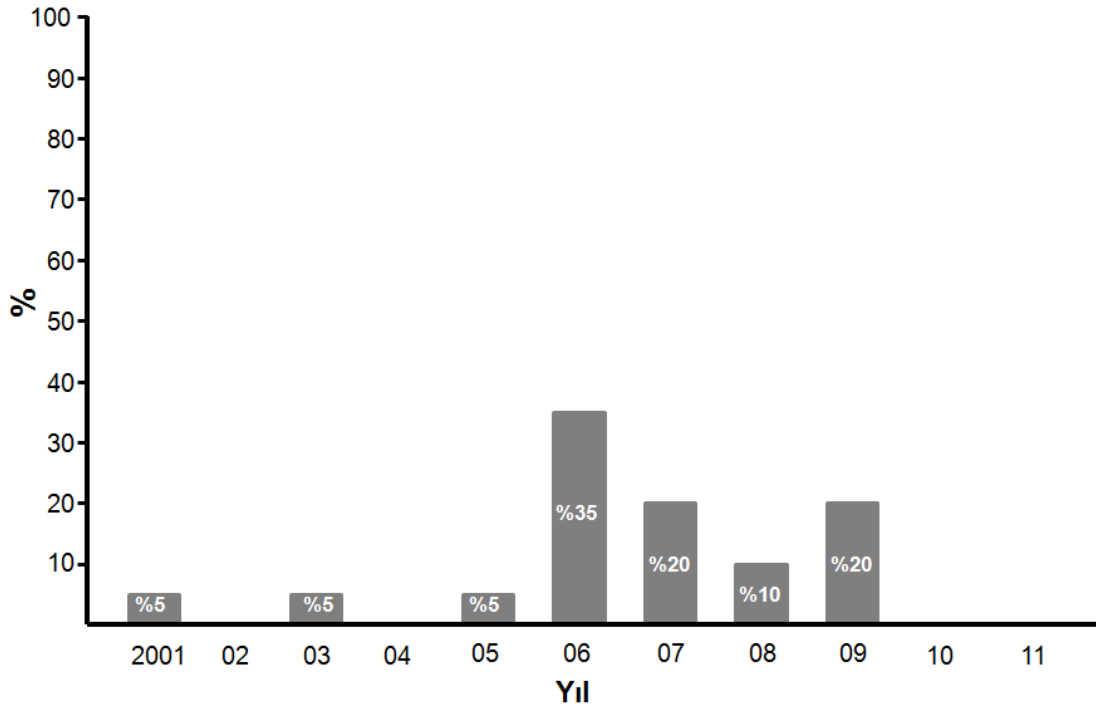
* P : Pozitif ; N : Negatif

Yirmi adet hVISA suşunun 7'si kan, 5'i püy, 2'si BOS, 2'si kateter, 2'si DTA ve 1'i gaita örneğinden izole edilmiştir. Bir adet hVISA suşunun ise izole edildiği klinik örnek türü bulunamamış ve 'diğer' olarak sınıflandırılmıştır. Heterojen VISA suşlarının, izole edildiği klinik örnek türlerine göre dağılımı Şekil 4.14'te görülmektedir.



Şekil 4.14. Heterojen VISA suşlarının, izole edildiği klinik örnek türüne göre dağılımı

En fazla hVISA izolatının saptandığı yıl, 7 izolatla 2006 yılı olmuştur. Dört hVISA izolatı 2007, 4 hVISA izolatı da 2009 yılında elde edilmiştir. Diğer hVISA izolatlarının 2'si 2008, 1'i 2001, 1'i 2003 ve 1'i de 2005 yılında elde edilmiştir. İzolatların yıllara göre dağılımı Şekil 4.15'te görülmektedir.

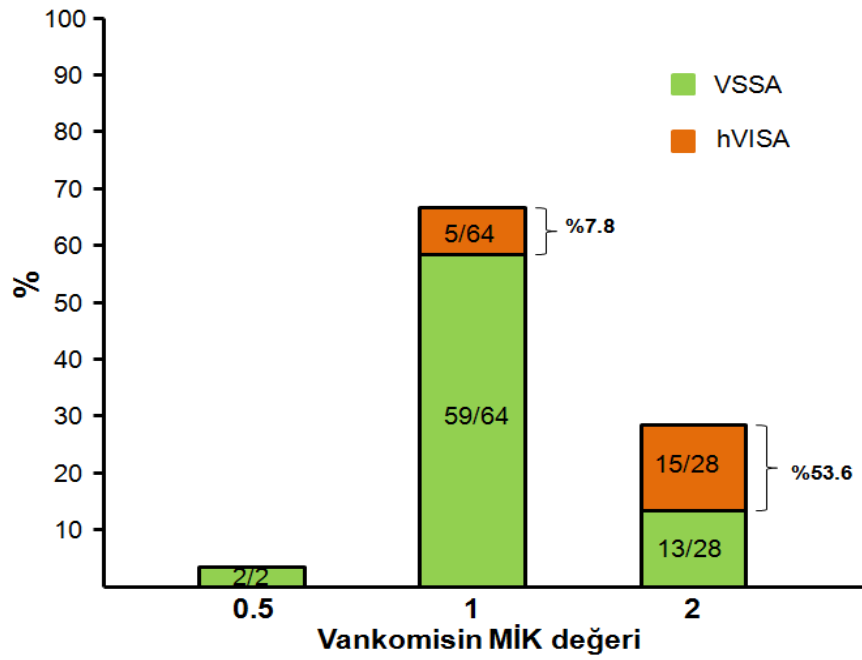


Şekil 4.15. Heterojen VISA izolatlarının yıllara göre dağılımı

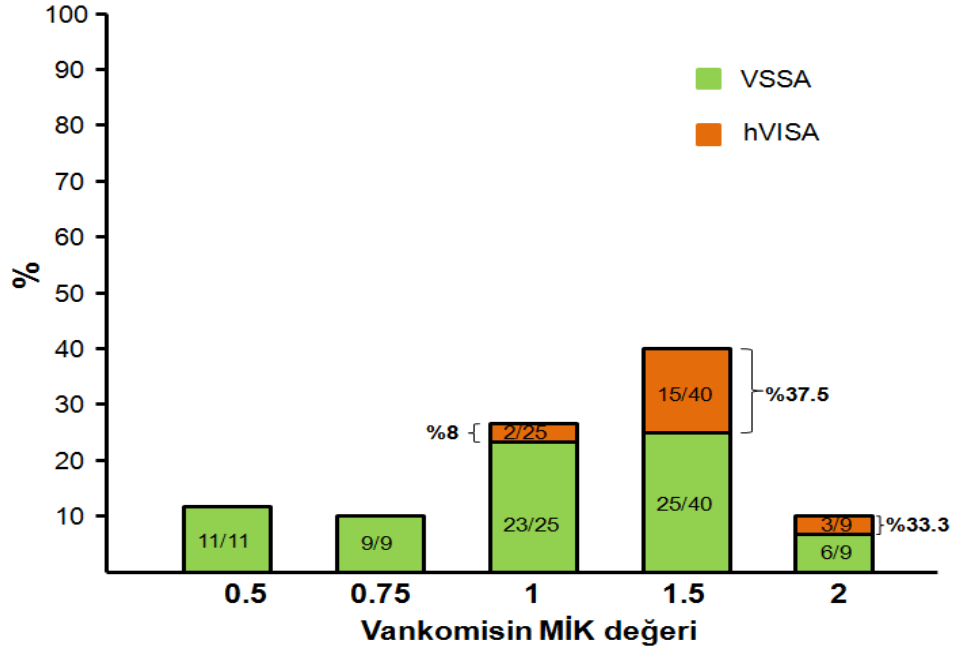
4.9. ‘Popülasyon Analizi Profili - Eğri Altında Kalan Alan’ Yöntemine Göre hVISA Olarak Saptanan İzolatların, Vankomisin MİK Değerleri ile İlişkisi

Mikrodilüsyon yöntemiyle saptanan vankomisin MİK değerleri ile; PAP-AUC yöntemine göre hVISA olarak saptanan izolatlar arasındaki ilişki Şekil 4.16’da; bu izolatların standart Etest yöntemi ile saptanan vankomisin MİK değerleri ile ilişkisi ise Şekil 4.17’de görülmektedir. Standart Etest ile saptanan vankomisin MİK değerlerinin yuvarlanması sonucu ortaya çıkan değerlerin hVISA izolatlarıyla ilişkisi Şekil 4.18’de gösterilmiştir. Her MİK değerine karşılık gelen sütundaki izolat sayıları belirtilmiştir. Yeşil renkli sütunların içerisinde VSSA izolatlarının; turuncu renkli sütunların içerisinde

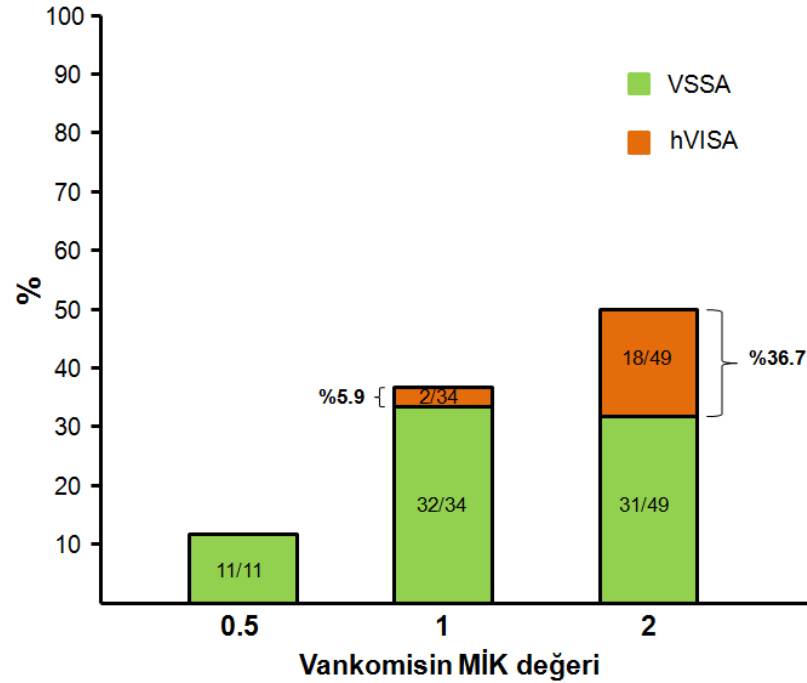
ise hVISA izolatlarının sayısı gösterilmiştir. Ayrıca hVISA izolatlarının oranları belirtilmiştir. Her üç grafik için de (Şekil 4.16, 4.17 ve 4.18), PAP-AUC yöntemiyle hVISA olarak saptanan izolatların oranının, artan vankomisin MİK değerlerine paralel olarak artış gösterdiği saptanmıştır. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Ki-Kare testi; Şekil 4.16: $p<0.001$, Şekil 4.17: $p=0.001$, Şekil 4.18: $p<0.001$).



Şekil 4.16. PAP-AUC yöntemine göre hVISA olarak saptanan izolatların, mikrodilüsyon yöntemiyle saptanan vankomisin MİK değerleri ile ilişkisi



Şekil 4.17. PAP-AUC yöntemine göre hVISA olarak saptanan izolatların, standart Etest yöntemiyle saptanan vankomisin MİK değerleri ile ilişkisi



Şekil 4.18. PAP-AUC yöntemine göre hVISA olarak saptanan izolatların, standart Etest ile saptanan vankomisin MİK değerlerinin yuvarlanması sonucu oluşan değerler ile ilişkisi

4.10. ‘Popülasyon Analizi Profili - Eğri Altında Kalan Alan’ Yöntemi ile Etest Makrometod Sonuçlarının Karşılaştırılması

Heterojen VISA izolatlarının saptanmasında altın standart olarak kabul edilen PAP-AUC yöntemi, çalışmamızda da referans yöntem olarak kabul edilmiş; Etest makrometod bu yöntemle karşılaştırılmıştır. Sonuçlar Tablo 4.6 ve 4.7’de görülmektedir.

Tablo 4.6. PAP-AUC yöntemi ile Etest makrometod sonuçlarının karşılaştırılması

E-Test Makrometod	PAP-AUC		TOPLAM
	+	—	
+	12	7	19
—	8	67	75
TOPLAM	20	74	94

Tablo 4.7. Etest makrometodun duyarlılık ve özgüllük değerleri

	Duyarlılık %	Özgüllük %
E-Test Makrometod	71.4	91.4

$$\left. \begin{array}{l} \text{Duyarlılık : } 20 / (20+8) \times 100 = \% 71.4 \\ \text{Özgüllük : } 74 / (74+7) \times 100 = \% 91.4 \end{array} \right\} \text{Tablo 4.6}$$

5. TARTIŞMA

İlk hVISA izolatının 1997 yılında Japonya’da tanımlanmasının ardından, dünyanın çeşitli bölgelerinden hVISA izolatlarının klinik önemini araştıran birçok çalışma yapılmıştır. Bunların önemli bir kısmında hVISA izolasyonu; uzun bakteriyemi, hastanede kalış süresi ve enfeksiyona bağlı gelişen yüksek komplikasyon oranları (endokardit, osteomyelit, kalp yetmezliği) ile ilişkili bulunmuştur (11, 12, 72, 73). Bazı çalışmalarda ise; standart MİK saptama yöntemleriyle vankomisine karşı duyarlı bulunmasına rağmen, yüksek vankomisin MİK değerine sahip izolatlarla gelişen bakteriyemilerin, düşük vankomisin MİK değerine sahip izolatlarla gelişenlere oranla ‘tedavi başarısızlığı açısından’ daha yüksek bir risk taşıdığı vurgulanmıştır (70, 71). Bu bulgular, ‘artan vankomisin MİK değerleriyle birlikte hVISA görülme sıklığı da mı artıyor?’ sorusunu akla getirmiştir. Bugüne kadar yapılmış birçok çalışmada, vankomisin MİK değeri 2 µg/ml olan MRSA izolatları arasında hVISA fenotipi sıklığının arttığı gösterilmiştir (84-86). Dolayısıyla vankomisin MİK değeri 2 µg/ml olan izolat oranının yüksekliği, hVISA riski açısından önemsenmesi gereken bir sonuçtur.

Metisiline dirençli *S.aureus* izolatlarının vankomisin MİK değerleriyle ilgili dünyanın farklı bölgelerinden bildirilen farklı sonuçlar bulunmaktadır. Örneğin 2008 yılında yayınlanan ve ABD’de yapılan bir çalışmada kan, yara, balgam ve idrar örneklerinden izole edilen toplam 92 MRSA izolatının vankomisin MİK değerleri araştırılmıştır (87). MİK değeri 2 µg/ml olarak saptanan izolatların oranı mikrodilüsyon yöntemi ile %9 olarak bulunurken, standart Etest yöntemiyle %68 olarak belirlenmiştir.

Tayvan’da yapılan ve sadece kandan izole edilen MRSA’ların vankomisin MİK değerlerinin mikrodilüsyon yöntemiyle saptandığı bir çalışmada izolatların %21’inin MİK değeri 2 µg/ml olarak saptanmıştır (88).

Ülkemizde yapılan ve yedi farklı merkezden toplanan MRSA kan izolatlarının dahil edildiği bir çalışmada izolatların %40.6'sının vankomisin MİK değeri mikrodilüsyon yöntemiyle 2 µg/ml olarak bulunmuştur (89).

Hastanemizde yapılan ve 1999-2009 yılları arasında erişkin hastalardan izole edilen 299 MRSA kan izolatının dahil edildiği çalışmada izolatların %23.4'ünün vankomisin MİK değeri mikrodilüsyon yöntemiyle 2 µg/ml olarak saptanmıştır (90).

Bizim çalışmamızda ise, vankomisin MİK değerlerinin saptanmasında mikrodilüsyon yöntemi kullanıldığında MRSA izolatlarının %29.8'inin MİK değerinin 2 µg/ml olduğu belirlenmiştir. Standart Etest yöntemi kullanıldığında ise vankomisin MİK değeri 2 µg/ml olan izolatların oranı %52.1 olarak saptanmıştır (Şekil 4.1). Vankomisin MİK değerlerinin saptanmasında kullanılan standart Etest yöntemi ile mikrodilüsyon yöntemi karşılaştırıldığında, izolatların bir kısmı (%56.4) için tam uyum; bir kısmı (%43.6) içinse 1 dilüsyon fark olduğu saptanmıştır. Vankomisin için ± 1 dilüsyon farkı dikkate alınarak standart Etest ve mikrodilüsyon yöntemleri arasındaki uyum incelendiğinde, %100 olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda, vankomisin MİK değeri 2 µg/ml olan izolat oranının yüksekliği (%29.8) dikkati çekmektedir. Bu yüksek oran, hVISA riski açısından da önemsenmesi gereken bir sonuçtur. Çalışmamıza dahil edilen MRSA izolatları arasındaki hVISA oranının saptanması amacıyla tüm izolatlara PAP-AUC yöntemi uygulanmış ve 94 MRSA izolatının 20'si (%21.3) hVISA olarak saptanmıştır. Mikrodilüsyon yöntemiyle vankomisin MİK değeri 2 µg/ml olarak saptanan izolatların yarısından fazlasının (%53.6) hVISA olduğu görülmüştür (Şekil 4.16). Tüm hVISA suşlarının %75'inin, vankomisin MİK değeri 2 µg/ml olan suşlar arasından izole edildiği anlaşılmıştır. Vankomisin MİK değeri 0.5 µg/ml olan suşlarda hVISA izolatı saptanmazken, MİK değeri 1 µg/ml olan suşlar arasında %7.8, MİK değeri 2 µg/ml olan suşlar arasında ise %53.6 oranında hVISA izolatı saptanmıştır. Dolayısıyla artan MİK değerleriyle birlikte hVISA oranının da arttığı gözlenmiş, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.16, $p < 0.001$).

Daha önce de belirtildiği gibi, hVISA suşlarının görülme sıklığı ile ilgili, %0.71 ile %65 arasında olmak üzere farklı çalışmalarda oldukça farklı oranlar bildirilmektedir (6, 9-11, 61, 63-66).

Avustralya'da yapılan ve 12 yıl boyunca kan kültürlerinden izole edilen MRSA izolatlarının dahil edildiği çalışmada hVISA oranı %12 ; VISA oranı ise %1 olarak saptanmıştır (86).

Kanada'da yapılan çok merkezli ve 1995-2006 yılları arasında izole edilen MRSA'ların dahil edildiği bir çalışmada hVISA oranı %1.3 olarak bulunmuştur (91). Bu çalışmada VISA izolatı ise saptanmamıştır. Fakat bu çalışmada tüm izolatlara PAP-AUC yöntemi uygulanmamış, sadece tarama yöntemleri sonucu hVISA olabileceği düşünülen izolatlara PAP-AUC yöntemi uygulanmıştır.

Çin'de ülke genelinde birçok merkezin katıldığı ve MRSA kan izolatlarının değerlendirildiği çalışmada hVISA prevalansının %13.1; VISA prevalansının ise %0.5 olduğu belirtilmiştir (92).

Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan geniş kapsamlı bir çalışmada ise 1986 ile 2007 yılları arasında izole edilen MRSA izolatları hVISA/VISA prevalansı açısından incelenmiş ve yıllar içerisinde hVISA sıklığında bir artışın olduğuna dikkat çekilmiştir (66). Heterojen VISA / VISA oranları sırasıyla 1986-1993 arasında %2.2/0.4 iken 1994-2002 arasında %7.6/2.3 ve 2003-2007 arasında %8.3/0.3 olarak saptanmıştır. Bu çalışmada da sadece Etest makrometod ile hVISA olarak saptanan izolatlara PAP-AUC yönteminin uygulanmış olması, üzerinde durulması gereken bir noktadır.

Ülkemizde de hVISA/VISA prevalansının araştırıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Sancak ve ark. (9), 2005 yılında yaptıkları ve 256 MRSA izolatını dahil ettikleri çalışmada 46 (%17.97) hVISA suşu saptamışlardır. Bu çalışmada VISA izolatı bulunmamıştır.

Kuşcu ve ark.'nın (93) yaptığı çalışmada ise 107 MRSA suşu hVISA/VISA açısından taranmış ve 1 (%0.9) VISA ile 1 (%0.9) hVISA izolatına rastlanmıştır. Fakat bu çalışmada tarama yöntemi olarak 6 µg/ml vankomisin

içeren BHIA kullanılmış ve sadece bu yöntemle şüpheli olarak belirlenen suşlara PAP-AUC yöntemi uygulanmıştır. Tüm suşlar altın standart olarak kabul edilen PAP-AUC yöntemine tabi tutulmadığı için, direnç gösteren bazı suşların 6 µg/ml vankomisin içeren tarama plaklarıyla yakalanamamış olması mümkündür.

Ülkemizde yapılan ve 2007 yılında yayınlanan bir çalışmada 92 MRSA suşu içerisinde hVISA/VISA'ya rastlanmamıştır (94). Bu çalışmada da yine tarama plağı olarak 6 µg/ml vankomisin içeren BHIA kullanılmıştır. Tarama plağında üreme gösteren izolatlarla standart Etest yöntemi ve Etest makrometod uygulanmıştır. Tarama plağı olarak 6 µg/ml vankomisin içeren BHIA kullanılması ve altın standart olan PAP-AUC yönteminin bu çalışmada kullanılmamış olması hVISA / VISA izolatlarının gözden kaçırılmış olabileceği düşüncesini akla getirmektedir.

Ülkemizdeki çalışmalarda belirtilen oranların da yurt dışında yapılan çalışmalarda olduğu gibi oldukça farklılık gösterdiği görülmektedir. Daha önce belirtildiği gibi farklı çalışmalarda farklı yöntemlerin kullanılması sonuçları doğrudan etkilemekte ve çok farklı oranların ortaya çıkmasına yol açabilmektedir.

Çocuk hasta grubunda ise VISA/hVISA sıklığının araştırıldığı sadece 2 çalışma saptanabilmektedir. İlk çalışmada 71 TK-MRSA izolatına Etest makrometod uygulanmış ve 2 (%2.82) hVISA izolatı saptanmıştır (15). İkinci çalışmada ise; MRSA bakteriyemisi saptanan 22 çocuk hastadan izole edilen suşlar VISA/hVISA sıklığı açısından incelenmiştir. Bu çalışmada da yöntem olarak Etest makrometod kullanılmış ve 1 (%4.54) hVISA izolatı saptanmıştır (16). Her iki çalışmada da hVISA izolatlarının tanımlanmasında altın standart olarak kabul edilen PAP-AUC yöntemi kullanılmamıştır.

Bizim çalışmamız çocuk hastalarda hVISA sıklığının, altın standart yöntem olan PAP-AUC ile araştırıldığı ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır. Saptanan yüksek hVISA oranının bazı sebepleri olduğu düşünülmektedir. Birincisi, birçok çalışmada tüm izolatlarla altın standart olan PAP-AUC yönteminin uygulanmadığı görülmektedir (66, 91, 93). Çeşitli tarama

yöntemlerinin uygulanmasının ardından sadece şüpheli izolatlara PAP-AUC yönteminin uygulanması; hatta bazı çalışmalarda bu yöntemin hiç uygulanmaması (10, 94) hVISA izolatlarının gözden kaçırılmış olabileceğini düşündürmektedir. Bizim çalışmamızdaki izolatların tamamına PAP-AUC yönteminin uygulanması sonucu, daha fazla hVISA izolatının yakalanmış olması mümkündür. İkincisi ise; çalışmamıza her hastadan tek MRSA izolatı dahil edilmesine rağmen, bu izolatların genetik yakınlıkları araştırılmamıştır. Dolayısıyla aynı hVISA izolatlarının birden fazla hastadan izole edilmiş olması mümkündür. Çalışmamızda saptanan hVISA oranı yüksekliğinin nedenlerinden biri de bu olabilir. İzole edilen hVISA suşlarının genetik yakınlığının araştırılması amacıyla uygulanabilecek moleküler yöntemlerin, bu konuda yardımcı olacağı düşünülmektedir.

Çalışmamızda hVISA oranının saptanması amacıyla Etest makrometod da kullanılmıştır. Etest makrometod, hVISA izolatlarının saptanmasıyla ilgili yapılan birçok çalışmada diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında PAP-AUC yöntemine daha yakın duyarlılık ve özgüllük değerlerine sahip bir yöntemdir (9, 14, 55, 61). Çalışmamızda Etest makrometodun sonuçları, altın standart yöntem olan PAP-AUC ile karşılaştırılmış; duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %71.4 ve %91.4 olarak saptanmıştır. Ayrıca artan vankomisin MİK değerleriyle Etest makrometod pozitifliği arasında paralel bir ilişki bulunmuştur. Vankomisin MİK değeri 0.5 µg/ml olan suşlarda Etest makrometod pozitifliği saptanmazken, MİK değeri 1 µg/ml olan suşlar arasında %7.8; MİK değeri 2 µg/ml olan suşlar arasında ise %50 oranında Etest makrometod pozitifliği saptanmıştır. Artan vankomisin MİK değerleriyle, Etest makrometoda göre hVISA olarak bulunan izolat oranı da artış göstermiş, bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Şekil 4.9, $p < 0.001$). Etest makrometodun duyarlılık ve özgüllük değerleri umut verici olmasına rağmen, dünyanın farklı yerlerinde yapılan çalışmalarda bu değerlerde de farklılıklar görülmektedir.

Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan ve sonuçları 2011 yılında yayınlanan bir çalışmada, kandan izole edilen ve mikrodilüsyon yöntemi ile vankomisin MİK değeri 2 µg/ml olarak bulunan 148 MRSA suşu arasındaki

hVISA sıklığı araştırılmıştır (95). Çalışmadaki hVISA oranı PAP-AUC yöntemiyle %15 olarak saptanmıştır. Etest makrometodun sonuçları PAP-AUC yöntemi ile karşılaştırılmış, duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %57 ve %96 olarak bulunmuştur.

Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir diğer çalışmada kandan izole edilen 485 adet MRSA suşu arasındaki VISA/hVISA sıklığı araştırılmış; Etest makrometodun VISA/hVISA saptamadaki duyarlılığı %75, özgüllüğü ise %89 olarak saptanmıştır (96).

Birçok merkezin katıldığı diğer bir çalışmada, daha önceden referans yöntemlerle vankomisin duyarlılıkları belirlenen 5 VSSA, 5 hVISA ve 5 VISA izolatı kullanılmıştır (58). Çalışmaya, bu izolatların her birinden 3'er adet olmak üzere toplam 45 adet izolat dahil edilmiştir (15 VSSA, 15 hVISA, 15 VISA). Bunlara ek olarak, VSSA izolatı olan ATCC 29213, referans hVISA izolatı olan Mu3 ve referans VISA izolatı olan Mu50'den birer adet olmak üzere 3 adet izolat da çalışmaya alınmıştır. Toplam 48 adet izolat, dünyanın çeşitli yerlerinde bulunan ve bu izolatların vankomisin duyarlılık paternlerini bilmeyen 12 adet laboratuvara gönderilmiştir. Laboratuvarlardan bu izolatları vankomisin duyarlılıkları yönünden incelemeleri istenmiştir. Laboratuvarlardan bazı agar tarama yöntemleri ve Etest makrometodu da kullanmaları istenmiştir. Sonuç olarak tüm laboratuvarlardaki sonuçlarının ortalaması alındığında, Etest makrometodun hVISA izolatlarını saptamadaki duyarlılığı %69.3; özgüllüğü ise %89.09 olarak bulunmuştur. Ayrıca agar tarama plaklarıyla elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında, Etest makrometodun sonuçlarının laboratuvarlar arasında daha az değişkenlik gösterdiği vurgulanmıştır.

Etest makrometodun hVISA izolatlarının saptanmasındaki duyarlılık ve özgüllüğü birçok çalışmada diğer yöntemlerden üstün bulunmuştur. Fakat Etest makrometodda da farklı çalışmalarda farklı duyarlılık ve özgüllük değerlerinin ortaya çıktığı görülmektedir. Günümüzde üretici firma tarafından, Etest makrometodda kullanılması önerilen bakteri süspansiyonu hacmi 100 µl'dir. Fakat bazı çalışmalarda 50 µl veya 200 µl hacminde bakteri

süspansiyonlarının kullanıldığı görülmektedir (10, 86). Dolayısıyla farklı hacimlerde kullanılan bakteri süspansiyonlarının (50, 100, 200 µl), duyarlılık ve özgüllük sonuçlarında da farklılıklara neden olabileceği düşünülmektedir. Çalışmamızda Etest makrometodun duyarlılığı (%71.4), özgüllüğüne (%91.4) göre düşük bulunmuştur. Bir tarama testinde aranan özellik duyarlılığının yüksek olmasıdır. Çalışmamızda saptanan duyarlılık oranı (%71.4) çok düşük bir değer olmasa da, bu değer artmasıyla birçok hVISA izolatının daha yakalanabileceği tahmin edilmektedir. Günümüzde, Etest makrometod için üretici firma tarafından önerilen bakteri süspansiyonu hacmi olan 100 µl'nin değiştirilmesi duyarlılığın artmasını sağlayabilir. Bir başka seçenek de Etest makrometodda, hVISA tanısında kullanılan direnç sınır değerlerinin (vankomisin ve teikoplanin MİK ≥ 8 µg/ml veya sadece teikoplanin MİK ≥ 12 µg/ml) değiştirilmesi olabilir. Bu veya başka bazı değişikliklerle Etest makrometodun duyarlılığının artırılabilir ve daha uygun bir tarama testi haline getirilebileceği düşünülmektedir.

Çalışmamızda araştırılan bir diğer konu, MRSA izolatlarının vankomisin MİK değerlerinde yıllar içerisinde bir artış olup olmadığıdır (*MIC creep*). 2001 ile 2011 yılları arasında vankomisin MİK değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı olabilecek bir artış bulunamamıştır ($p=0.79$, *Spearman* testi). Son 2 yılda (2010 ve 2011) izole edilen MRSA suşlarının vankomisin MİK değerlerinin geometrik ortalamaları sırasıyla 1 ve 0.71 olarak bulunmuş; önceki yıllara göre bir düşüş gözlemlenmiştir. 2010 ve 2011 yıllarında sırasıyla sadece 3 ve 2 MRSA suşu izole edilmiştir (Tablo 4.1). Dolayısıyla, izolat sayısının düşük olması nedeniyle vankomisin MİK değerleri ortalamalarının güvenilirliği son 2 yıl için tartışmalıdır. 2001 yılından 2009 yılına kadar, çocuk hastalardan ortalama 10 izolat/yıl MRSA izole edilirken; 2010 ve 2011 yıllarında sırasıyla sadece 3 ve 2 MRSA izole edilmiş olması, dikkati çeken bir noktadır. Son 2 yılda izole edilen MRSA izolatı sayısı önemli oranda düşmüştür. Bu düşüşün nedeni tam olarak bilinmemekle birlikte; enfeksiyon kontrol önlemlerinin sıkı bir şekilde uygulanmaya başlanması, önemli nedenlerden biri olabilir.

Gram pozitif bakteri enfeksiyonlarında vankomisine alternatif antibiyotiklerden birisi olan daptomisin'in etkinliği de çalışmamızda araştırılmıştır. Daptomisin, sadece gram pozitif bakterilere etkili olup, membranda ani bir depolarizasyona yol açmakta; bunu takiben DNA, RNA ve protein sentezinin durmasıyla hücre ölümüne neden olmaktadır. Çalışmamızdaki MRSA izolatlarının tamamı, hem mikrodilüsyon hem de Etest yöntemiyle, daptomisine duyarlı olarak bulunmuştur. Daptomisin için ± 1 dilüsyon ve ± 2 dilüsyon farkı dikkate alınarak mikrodilüsyon ile Etest MİK değerleri arasındaki uyum incelendiğinde, uyum oranları sırasıyla %88.3 ve %100 olarak bulunmuştur.

Dünyanın farklı bölgelerinde yapılan çalışmalarda da bizim çalışmamızla uyumlu olarak, daptomisin'in MRSA izolatlarına karşı yüksek etkinlik gösterdiği saptanmıştır.

Ülkemizin de içinde bulunduğu toplam 11 Avrupa lkesi ve İsrail'in katıldığı geniş bir çalışmada 800 MRSA izolatının tamamı daptomisine duyarlı olarak bulunmuştur (78).

Tayvan'da yapılan ve 2006-2008 yılları arasında kandan izole edilen 470 MRSA izolatının dahil edildiği çalışmada, izolatların %98.8'i daptomisine duyarlı olarak bulunmuştur (79).

Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan, 32 merkezin katılımıyla gerçekleşen ve 2005-2010 yılları arasında izole edilen toplam 22858 (%53.3' MRSA) *S.aureus* izolatının dahil edildiği geniş kapsamlı bir çalışmada *S.aureus* izolatlarının %99.94'ünün daptomisine duyarlı olduğu saptanmıştır (80).

Ülkemizde yapılan ve sırasıyla 175 ve 299 adet MRSA kan izolatının dahil edildiği iki çalışmada daptomisine karşı direnç saptanmamıştır (89, 90). Yine lkemizde yapılan ve 49 MRSA izolatının daptomisin duyarlılıklarının araştırıldığı bir çalışmada, izolatların tamamı daptomisine duyarlı olarak bulunmuştur (97).

Daptomisin, MRSA'ların da içinde olduğu dirençli gram pozitif bakterilere karşı gösterdiği yüksek etkinlik nedeniyle umut verici bir antibiyotik gibi görünmektedir. Metisiline dirençli *S.aureus* izolatlarında ilk seçenek olarak kullanılan glikopeptid sınıfı antibiyotiklere karşı direnç sorununun gündeme gelmesiyle birlikte, daptomisinin alternatif antibiyotikler arasındaki öneminin daha da artacağı kanısındayız.

Sonuç olarak, çalışmamızdaki vankomisin MİK değeri 2 µg/ml olan MRSA izolatlarının %29.8'lik oranının, önemsenmesi gereken bir nokta olduğunu düşünmekteyiz. Vankomisin MİK değeri 2 µg/ml olan izolatların %53.6'sının hVISA olarak saptanması ve tüm hVISA suşlarının %75'inin, vankomisin MİK değeri 2 µg/ml olan suşlar arasından izole edilmesi bu düşüncemizi daha da kuvvetlendirmektedir. Daha önce değinilen ve VISA/hVISA izolasyonunun klinik öneminin vurgulandığı birçok çalışma da göz önünde bulundurulduğunda, bu izolatların saptanmasının büyük önem taşıdığı anlaşılmaktadır. Dolayısıyla vankomisin MİK değeri 2 µg/ml olarak saptanan MRSA izolatlarının hVISA olasılığı açısından incelenmesinin, klinikte uygulanacak tedavinin yönlendirilmesi açısından büyük katkısı olacaktır. Bu izolatların saptanmasında tarama testi olarak Etest makrometodun kullanılabileceği düşünülmekle birlikte bu yöntem ile VSSA olarak saptanan bir izolatın da, aslında hVISA olabileceği akılda tutulmalıdır. Etest makrometodda kullanılan besiyeri, bakteri süspansiyonu hacmi ve/veya direnç sınır değerlerinin değiştirilerek bu yöntemin duyarlılığının artırılabilceği düşünülmektedir. Bununla birlikte; hVISA izolatlarının tanımlanmasında, PAP-AUC yöntemine kıyasla daha az zaman alan, uygulanması kolay ve duyarlılık ile özgüllüğü yüksek başka yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç olduğu görülmektedir. Tüm mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutinde uygulanabilecek standart, uygulaması kolay, maliyeti düşük, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek bir yöntemin bulunmasıyla hem hVISA izolatlarının daha hızlı bir şekilde saptanmasının, hem de hVISA epidemiyolojisinin daha doğru bir şekilde değerlendirilmesinin önü açılacaktır.

KAYNAKLAR

- 1.Cengiz AT. *Staphylococcus*, s: 339-49. Ustaçelebi Ő (ed), Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1999, 1. baskı. Güneş Kitabevi, Ankara.
- 2.Manson L.S. Staphylococci, pp: 316-27. In: Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G (eds), Textbook of Diagnostic Microbiology. 2011, 4th ed. W.B. Saunders Company, Missouri.
- 3.Brumfitt W, Hamilton-Miller J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. New Eng J Med 1989;320(18): 1188-96.
- 4.Shorr AF. Epidemiology of staphylococcal resistance. Clin Infect Dis 2007; 45(Suppl 3): S171-6.
- 5.Sancak B. *S.aureus*'ta metisilin ve vankomisin direnci. Hacettepe Tıp Dergisi 2007; 38(3): 127-34.
- 6.Ariza J, Pujol M, Cabo J, et al. Vancomycin in surgical infections due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin. Lancet 1999; 353(9164): 1587-88.
- 7.Wong SS, Ng TK, Yam WC, et al. Bacteremia due to *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. Diagn Microbiol Infect Dis 2000; 36(4): 261–8.
- 8.Denis O, Nonhoff C, Byl B, Knoop C, Bobin-Dubreux S, Struelens MJ. Emergence of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a Belgian hospital: microbiological and clinical features. J Antimicrob Chemother 2002; 50(3): 383–91.
- 9.Sancak B, Ercis S, Menemenlioglu D, Colakoglu S, Haőelik G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin in a Turkish university hospital. J Antimicrob Chemother 2005; 56(3): 519-23.
- 10.Maor Y, Rahav G, Belausov N, Ben-David D, Smollan G, Keller N. Prevalence and characteristics of heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* bacteremia in a tertiary care center. J Clin Microbiol 2007; 45(5): 1511-4.

- 11.Charles PG, Ward PB, Johnson PD, Howden BP, Grayson ML. Clinical features associated with bacteremia due to heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis 2004; 38(3): 448–51.
- 12.Fong RK, Low J, Koh TH, Kurup A. Clinical features and treatment outcomes of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (hVISA) in a tertiary care institution in Singapore. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2009; 28(8): 983-7.
- 13.Howden BP, Davies JK, Johnson PD, Stinear TP, Grayson ML. Reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*, including vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate strains: resistance mechanisms, laboratory detection, and clinical implications. Clin Microbiol Rev 2010; 23(1): 99-139.
- 14.Appelbaum PC. Reduced glycopeptide susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Int J Antimicrob Agents 2007; 30(5): 398-408.
- 15.Jimenez-Truque N, Thomsen I, Saye E, Creech CB. Should higher vancomycin trough levels be targeted for invasive community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in children? Pediatr Infect Dis J 2010; 29(4): 368-70.
- 16.Welsh KJ, Abbott AN, Lewis EM, et al. Clinical characteristics, outcomes, and microbiologic features associated with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia in pediatric patients treated with vancomycin. J Clin Microbiol 2010; 48(3): 894-9.
- 17.Gümral R. *Staphylococcus, Micrococcus* ve diğer katalaz pozitif koklar, s: 390-411. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA (eds), Başustaoğlu A (çeviri ed), Klinik Mikrobiyoloji, 2009, 9. baskı. Atlas Kitapçılık, Ankara.
- 18.<http://www.bacterio.cict.fr/classificationsz.html>
- 19.<http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>

- 20.Dündar V, Öztürk Dündar D. Stafilokok enfeksiyonları, s: 2065-2077. Topçu A.W, Söyletir G, Doğanay M (eds), Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 2008, 3. baskı. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
- 21.Sancak B. *Staphylococcus*, s: 43-50. Özkuyumcu C (ed), Hacettepe Mikrobiyoloji Serisi-1 Klinik Bakterioloji El Kitabı. 2009, 1.baskı. Güneş Kitabevi, Ankara.
- 22.Jevons MP. Celbenin resistant *Staphylococci*. BMJ 1961; 1(5219): 124-5.
- 23.Appelbaum PC. Microbiology of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis 2007; 45(Suppl 3): S165-70.
- 24.Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect 2007; 13(3): 222-35.
- 25.Hartman BJ, Tomasz A. Expression of methicillin resistance in heterogeneous strains of *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1986; 29(1): 85-92.
- 26.Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev 1997; 10(4): 781-91.
- 27.Mulligan ME, Murray-Leisure KA, Standiford HC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a consensus review of the microbiology, pathogenesis and epidemiology with implications for prevention and management. Am J Med 1993; 94(3): 313-28.
- 28.Appelbaum PC. MRSA--the tip of the iceberg. Clin Microbiol Infect 2006; 12(Suppl 2): 3-10.
- 29.McKenna M. The End of Antibiotics, pp: 175-194. In: The Fatal Menace of MRSA Superbug. 2010, 1st ed. Free Press, New York.
- 30.<http://www.uniprot.org/taxonomy/31958>
- 31.Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J Antimicrob Chemother 1997; 40(1): 135-6.

- 32.Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, et al. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. N Engl J Med 1999; 340(7): 493-501.
- 33.Ploy MC, Grelaud C, Martin C. First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. Lancet 1998; 351(9110): 1212.
- 34.Rahman M. Alternatives to vancomycin in treating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. J Antimicrob Chemother 1998; 41(3): 325-8.
- 35.Hanaki H, Hososaka Y, Yanagisawa C, Otsuka Y, Nagasawa Z, Nakae T, Sunakawa K. Occurrence of vancomycin-intermediate-resistant *Staphylococcus aureus* in Japan. J Infect Chemother 2007; 13(2): 118-21.
- 36.de Lassence A, Hidri N, Timsit JF, et al. Control and outcome of a large outbreak of colonization and infection with glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* in an intensive care unit. Clin Infect Dis 2006; 42(2): 170-8.
- 37.Howe RA, Wootton M, Bennett PM, et al. Interactions between methicillin and vancomycin in methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains displaying different phenotypes of vancomycin susceptibility. J Clin Microbiol 1999; 37(9): 3068-71.
- 38.Rong SL, Leonard SN. Heterogeneous vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: a review of epidemiology, diagnosis, and clinical significance. Ann Pharmacother 2010; 44(5): 844-50.
- 39.Gould IM. VRSA—doomsday superbug or damp squib? Lancet Infect Dis 2010; 10(12): 816-8.
- 40.Howden BP, Johnson PD, Ward PB, Stinear TP, Davies JK. Isolates with low-level vancomycin resistance associated with persistent methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50(9): 3039-47.
- 41.Sola C, Lamberghini RO, Ciarlantini M, et al. Heterogeneous vancomycin-intermediate susceptibility in a community-associated methicillin-resistant

- Staphylococcus aureus* epidemic clone, in a case of infective endocarditis in Argentina. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2011; 10(1): 15.
42. Perazzi B, Bello N, Mollerach M, Vay C, Lasala MB, Famiglietti A. Endocarditis caused by methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin: a case report. *J Med Case Reports* 2011; 5(1): 292.
 43. Cui L, Murakami H, Kuwahara-Arai K, Hanaki H, Hiramatsu K. Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(9): 2276-85.
 44. Boyle-Vavra S, Labischinski H, Ebert CC, Ehlert K, Daum RS. A spectrum of changes occurs in peptidoglycan composition of glycopeptide-intermediate clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(1): 280-7.
 45. Howden BP. Recognition and management of infections caused by vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) and heterogenous VISA (hVISA). *Intern Med J* 2005; 35(Suppl 2): S136-40.
 46. Sancak B. *Staphylococcus aureus* ve antibiyotik direnci. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(3): 565-76.
 47. Hanaki H, Labischinski H, Inaba Y, Kondo N, Murakami H, Hiramatsu K. Increase in glutamine-non-amidated mucopeptides in the peptidoglycan of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain Mu50. *J Antimicrob Chemother* 1998; 42(3): 315-20.
 48. Avison MB, Bennett PM, Howe RA, Walsh TR. Preliminary analysis of the genetic basis for vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus* strain Mu50. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49(2): 255-60.
 49. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=14969#top>
 50. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
 51. Cui L, Iwamoto A, Lian JQ, Neoh HM, Maruyama T, Horikawa Y, Hiramatsu K. Novel mechanism of antibiotic resistance originating in vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(2): 428-38.

- 52.Sieradzki K, Pinho MG, Tomasz A. Inactivated *pbp4* in highly glycopeptide-resistant laboratory mutants of *Staphylococcus aureus*. J Biol Chem 1999; 274(27): 18942-6.
- 53.Sieradzki K, Roberts RB, Haber SW, Tomasz A. The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. N Engl J Med 1999; 340(7): 517-23.
- 54.Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 20th Informational Supplement, Document M100-S20, 2010. CLSI Wayne, PA.
- 55.Walsh TR, Bolmström A, Qwärnström A, et al. Evaluation of current methods for detection of staphylococci with reduced susceptibility to glycopeptides. J Clin Microbiol 2001; 39(7): 2439-44.
- 56.Nonhoff C, Denis O, Struelens MJ. Low prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides in Belgian hospitals. Clin Microbiol Infect 2005; 11(3): 214-20.
- 57.Voss A, Mouton JW, van Elzaker EP, et al. A multi-center blinded study on the efficiency of phenotypic screening methods to detect glycopeptide intermediately susceptible *Staphylococcus aureus* (GISA) and heterogeneous GISA (h-GISA). Ann Clin Microbiol Antimicrob 2007; 6(1): 9.
- 58.Wootton M, MacGowan AP, Walsh TR, Howe RA. A multicenter study evaluating the current strategies for isolating *Staphylococcus aureus* strains with reduced susceptibility to glycopeptides. J Clin Microbiol 2007; 45(2): 329-32.
- 59.Fitzgibbon MM, Rossney AS, O'Connell B. Investigation of reduced susceptibility to glycopeptides among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from patients in Ireland and evaluation of agar screening methods for detection of heterogeneously glycopeptide-intermediate *S.aureus*. J Clin Microbiol 2007; 45(10): 3263-9.
- 60.Nunes AP, Schuenck RP, Bastos CC, Magnanini MM, Long JB, Iorio NL, Santos KR. Heterogeneous resistance to vancomycin and teicoplanin

- among *Staphylococcus* spp. isolated from bacteremia. Braz J Infect Dis 2007; 11(3): 345-50.
- 61.Horne KC, Howden BP, Grabsch EA, et al. Prospective comparison of the clinical impacts of heterogeneous vancomycin-intermediate methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-susceptible MRSA. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53(8): 3447-52.
 - 62.Tenover FC. The quest to identify heterogeneously resistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* strains. Int J Antimicrob Agents 2010; 36(4): 303-6.
 - 63.Kim MN, Hwang SH, Pyo YJ, Mun HM, Pai CH. Clonal spread of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin in a university hospital in Korea. J Clin Microbiol 2002; 40(4): 1376-80.
 - 64.Garnier F, Chainier D, Walsh T, et al. A 1 year surveillance study of glycopeptide-intermediate *Staphylococcus aureus* strains in a French hospital. J Antimicrob Chemother 2006; 57(1): 146-9.
 - 65.Kosowska-Shick K, Ednie LM, McGhee P, et al. Incidence and characteristics of vancomycin nonsusceptible strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at Hershey Medical Center. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(12): 4510-3.
 - 66.Rybak MJ, Leonard SN, Rossi KL, Cheung CM, Sader HS, Jones RN. Characterization of vancomycin-heteroresistant *Staphylococcus aureus* from the metropolitan area of Detroit, Michigan, over a 22-year period (1986 to 2007). J Clin Microbiol 2008; 46(9): 2950-4.
 - 67.Steinkraus G, White R, Friedrich L. Vancomycin MIC creep in non-vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA), vancomycin-susceptible clinical methicillin-resistant *S.aureus* (MRSA) blood isolates from 2001-05. J Antimicrob Chemother 2007; 60(4): 788-94.
 - 68.Mason EO, Lamberth LB, Hammerman WA, Hulten KG, Versalovic J, Kaplan SL. Vancomycin MICs for *Staphylococcus aureus* vary by detection method and have subtly increased in a pediatric population since 2005. J Clin Microbiol 2009; 47(6): 1628-30.

69. Ho PL, Lo PY, Chow KH, Lau EH, Lai EL, Cheng VC, Kao RY. Vancomycin MIC creep in MRSA isolates from 1997 to 2008 in a healthcare region in Hong Kong. *J Infect* 2010; 60(2): 140-5.
70. Sakoulas G, Moise-Broder PA, Schentag J, Forrest A, Moellering RC Jr, Eliopoulos GM. Relationship of MIC and bactericidal activity to efficacy of vancomycin for treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. *J Clin Microbiol* 2004; 42(6): 2398-402.
71. Lodise TP, Graves J, Evans A, Graffunder E, Helmecke M, Lomaestro BM, Stellrecht K. Relationship between vancomycin MIC and failure among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia treated with vancomycin. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(9): 3315-20.
72. Maor Y, Hagin M, Belausov N, Keller N, Ben-David D, Rahav G. Clinical features of heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* bacteremia versus those of methicillin-resistant *S. aureus* bacteremia. *J Infect Dis* 2009; 199(5): 619-24.
73. Bae IG, Federspiel JJ, Miró JM, et al; International Collaboration on Endocarditis-Microbiology Investigator. Heterogeneous vancomycin-intermediate susceptibility phenotype in bloodstream methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from an international cohort of patients with infective endocarditis: prevalence, genotype, and clinical significance. *J Infect Dis* 2009; 200(9): 1355-66.
74. Sauermann R, Rothenburger M, Graninger W, Joukhadar C. Daptomycin: a review 4 years after first approval. *Pharmacology* 2008; 81(2): 79-91.
75. Carpenter CF, Chambers HF. Daptomycin: another novel agent for treating infections due to drug-resistant gram-positive pathogens. *Clin Infect Dis* 2004; 38(7): 994-1000.
76. Steenbergen JN, Alder J, Thorne GM, Tally FP. Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55(3): 283-8.

- 77.Bozkurt GY, Kutlu H, Arslan A, Memikoğlu O. Yeni bir antibakteriyel ajan: Daptomisin. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 2010; 63(3): 85-8.
- 78.Sader HS, Watters AA, Fritsche TR, Jones RN. Daptomycin antimicrobial activity tested against methicillin-resistant staphylococci and vancomycin-resistant enterococci isolated in European medical centers (2005). BMC Infect Dis 2007; 7: 29.
- 79.Kao TM, Wang JT, Weng CM, Chen YC, Chang SC. In vitro activity of linezolid, tigecycline, and daptomycin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* blood isolates from adult patients, 2006-2008: stratified analysis by vancomycin MIC. J Microbiol Immunol Infect 2011; 44(5): 346-51.
- 80.Sader HS, Moet GJ, Farrell DJ, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of daptomycin and comparator agents tested against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci: trend analysis of a 6-year period in US medical centers (2005-2010). Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 70(3): 412-6.
- 81.Shams W, Walker ES, Levy F, Reynolds SA, Peterson SM, Sarubbi FA. Comparative activity of telavancin and other antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates collected from 1991 to 2006. Chemotherapy 2010; 56(5): 411-6.
- 82.Jones T, Yeaman MR, Sakoulas G, et al. Failures in clinical treatment of *Staphylococcus aureus* infection with daptomycin are associated with alterations in surface charge, membrane phospholipid asymmetry, and drug binding. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(1): 269-78.
- 83.Moise PA, North D, Steenbergen JN, Sakoulas G. Susceptibility relationship between vancomycin and daptomycin in *Staphylococcus aureus*: facts and assumptions. Lancet Infect Dis 2009; 9(10): 617-24.
- 84.Chen H, Liu Y, Sun W, Chen M, Wang H. The incidence of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* correlated with increase of vancomycin MIC. Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 71(3): 301-3.

- 85.Richter SS, Satola SW, Crispel EK, et al. Detection of *Staphylococcus aureus* with heterogeneous intermediate-level resistance to vancomycin (hVISA) in the United States. J Clin Microbiol 2011 [Epub ahead of print] PubMed PMID: 21976769.
- 86.van Hal SJ, Wehrhahn MC, Barbaggiannakos T, Mercer J, Chen D, Paterson DL, Gosbell IB. Performance of various testing methodologies for detection of heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in bloodstream isolates. J Clin Microbiol 2011; 49(4):1489-94.
- 87.Hsu DI, Hidayat LK, Quist R, Hindler J, Karlsson A, Yusof A, Wong-Beringer A. Comparison of method-specific vancomycin minimum inhibitory concentration values and their predictability for treatment outcome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections. Int J Antimicrob Agents 2008; 32(5): 378-85.
- 88.Wang JL, Wang JT, Sheng WH, Chen YC, Chang SC. Nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacteremia in Taiwan: mortality analyses and the impact of vancomycin, MIC = 2 mg/L, by the broth microdilution method. BMC Infect Dis 2010; 10: 159.
- 89.Sancak B, Yağcı S, Gür D, ve ark. MRSA kan izolatlarında vankomisin ile daptomisin duyarlılığının araştırılması ve VISA-hVISA taranması. 1.Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi. 12-16 Kasım 2011, Antalya. Sunum no: SS-3.2.
- 90.Sancak B, Yagci S, Mirza HC, Hascelik G. Evaluation of vancomycin and daptomycin MIC trends against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* blood isolates collected in Hacettepe Hospital from 1999 to 2009. 111th General Meeting of American Society for Microbiology. May 21-24, 2011, New Orleans, Louisiana. Abst. No. C-100.
- 91.Adam HJ, Louie L, Watt C, et al; Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program. Detection and characterization of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates in Canada: results from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program, 1995-2006. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(2): 945-9.

- 92.Sun W, Chen H, Liu Y, et al. Prevalence and characterization of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates from 14 cities in China. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53(9): 3642-9.
- 93.Kuşcu F, Öztürk DB, Gürbüz Y, Tütüncü EE, Sencan I, Gül S. Metisiline dirençli stafilocoklarda azalmış vankomisin duyarlılığının araştırılması. Mikrobiyol Bul 2011; 45(2): 248-57.
- 94.Hoşgör Limoncu M, Ermertcan S, Taşlı H, Kurutepe S. Metisiline dirençli stafilocok izolatlarında glikopeptid direncinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2007; 41(4): 511-6.
- 95.Satola SW, Farley MM, Anderson KF, Patel JB. Comparison of detection methods for heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*, with the population analysis profile method as the reference method. J Clin Microbiol 2011; 49(1): 177-83.
- 96.Riederer K, Shemes S, Chase P, Musta A, Mar A, Khatib R. Detection of intermediately vancomycin-susceptible and heterogeneous *Staphylococcus aureus* isolates: comparison of Etest and agar screening methods. J Clin Microbiol 2011; 49(6): 2147-50.
- 97.Öksüz L, Gürler N. Klinik örneklerden izole edilen metisiline dirençli stafilocok suşlarının son yıllarda kullanıma giren antibiyotiklere in-vitro duyarlılık sonuçları. ANKEM Derg 2009; 23(2): 71-7.