

Metisiline Dirençli Stafilokoklarda Azalmış Vankomisin Duyarlılığının Araştırılması*

Investigation of Reduced Vancomycin Susceptibility in Methicillin-Resistant Staphylococci

Ferit KUŞCU¹, Doğan Barış ÖZTÜRK¹, Yunus GÜRBÜZ¹, Emin Ediz TÜTÜNCÜ¹, İrfan ŞENCAN¹, Serdar GÜL²

¹ SB Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara.

¹ Ministry of Health Diskapi Yıldırım Beyazıt Training and Research Hospital, Infectious Diseases and Clinical Microbiology Clinics, Ankara, Turkey.

² SB Sorgun Devlet Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Yozgat.

² Ministry of Health Sorgun State Hospital, Infectious Diseases and Clinical Microbiology Clinics, Yozgat, Turkey.

* Bu çalışma, 6. Ulusal Tanısal ve Moleküler Mikrobiyoloji Kongresi (15-19 Haziran 2010, Ankara)'nde poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 16.08.2010 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 19.01.2011

ÖZET

Vankomisine karşı azalmış duyarlılığa sahip ilk *Staphylococcus aureus* suşu 1996 yılında Japonya'dan bildirilmiş, daha sonra değişik ülkelerden, giderek artan sayıda glikopeptidlere azalmış duyarlılık gösteren stafilokok izolatları rapor edilmeye başlanmıştır. Bu suşların rutin laboratuvar yöntemleriyle saptanması mümkün değildir ve neden oldukları enfeksiyonlarda glikopeptid antibiyotiklerinin kullanımı sonucunda tedavi başarısızlıkları ortaya çıkmaktadır. Bu çalışmada, vankomisine orta düzeyde duyarlı stafilokok (VIS) ve heterojen VIS (hVIS) suşlarının sıklığının agar tarama, makro E-test ve popülasyon analiz profili (PAP-AUC; population analysis profile-area under the curve) yöntemleriyle araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, Kasım 2007-Mayıs 2009 tarihleri arasında, çeşitli klinik örneklerden (48 trakeal aspirat, 48 kan, 39 yara sürüntüsü, sekiz idrar, iki beyin omurilik sıvısı, iki plevra sıvısı, bir kateter ucu örneği) izole edilen 148 metisiline dirençli stafilokok suşu dahil edilmiştir. API Staph kiti (bioMerieux, ABD) ile suşların 107'si *S. aureus*, 41'i ise koagülaz-negatif stafilokok (KNS; 23 *Staphylococcus epidermidis*, altısı *Staphylococcus haemolyticus*, beşi *Staphylococcus chromogenes*, üç *Staphylococcus hominis* ve dördü diğerleri) olarak tanımlanmış; metisilin direnci, oksasilin (1 µg) ve sefoksitin (30 µg) diskleri ile standart disk difüzyon yöntemiyle "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" önerileri doğrultusunda belirlenmiştir. VIS ve hVIS saptanmasında, tarama yöntemi olarak 6 µg/ml vankomisin içeren beyin kalp infüzyon agar (BHI-V6) kullanılmış; bu yöntemle şüpheli VIS/hVIS olarak belirlenen izolatlarla, standart E-test, makro E-test ve PAP-AUC yöntemleri uygulanmıştır. Çalışmaya alınan tüm stafilokok suşlarının %3.4 (5/148)'ü VIS, %1.4

İletişim (Correspondence): Dr. Ferit Kuşcu, Osmanlı Mahallesi Selin Sokak Yediel Sitesi No: 26/14 Sincan, Ankara, Türkiye.
Tel (Phone): +90 505 299 7604, **E-posta (E-mail):** feritkuscugmail.com

(2/148)'ü ise hVIS (%1.4) olarak tanımlanmıştır. KNS suşlarında VIS ve hVIS oranları sırasıyla %9.8 (4/41) ve %2.4 (1/41) olarak bulunurken; *S.aureus* suşlarında sırasıyla %0.9 (1/107) ve %0.9 (1/107) olarak belirlenmiştir. VIS ve hVIS suşları ile enfekte hastalar (n= 7) irdelendiğinde; öyküsüne ulaşılamayan bir hasta hariç hepsinde daha önce glikopeptid antibiyotik kullanımı olduğu ve enfekte diz protezi olan başka bir hasta dışında, diğer hastaların yoğun bakım ünitesinde yatan hastalar olduğu izlenmiştir. Çalışmamızda, makro E-test ve PAP-AUC yöntemleri tüm izolatlara uygulanamadığından elde edilen direnç oranlarının gerçeği yansıtmayabileceği ihtimali bulunmasına rağmen, saptanan VIS ve hVIS prevalansı, ülkemizde daha önce yayınlanan bazı çalışmalardan daha yüksek görünmektedir. Sonuç olarak, zaman içinde bu suşların görülme oranlarının artma riski nedeniyle, hastanelerin belirli zaman aralıklarında metisiline dirençli stafilokoklarda vankomisine direnç oranlarını araştırmalarının gerekli olduğu düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Staphylococcus aureus*; koagülaz-negatif stafilokok; metisilin; vankomisin; direnç; VISA, hVISA.

ABSTRACT

The first *Staphylococcus aureus* strain with reduced susceptibility to vancomycin was reported from Japan in 1996, and since then an increasing numbers of cases had been reported from various countries. Along with the unfeasibility in the identification of these strains with routine laboratory methods, the use of glycopeptid antibiotics in infections due to these strains may result in therapeutic failure. The aim of this study was to investigate the prevalence of vancomycin intermediate staphylococcus (VIS) and heterogenous VIS (hVIS) strains with the use of agar screening, macro E-test, and population analysis profile (PAP-UC; population analysis profile-area under the curve) methods. A total of 148 methicillin-resistant staphylococcus strains isolated from different clinical samples (48 tracheal aspirate, 48 blood, 39 wound swabs, eight urine, two cerebrospinal fluid, two pleural fluid, one catheter tip sample) between November 2007 and May 2009, were included in the study. Of the isolates 107 were identified as *S.aureus* and 41 were coagulase-negative staphylococci (CNS; 23 *Staphylococcus epidermidis*, six *Staphylococcus haemolyticus*, five *Staphylococcus chromogenes*, three *Staphylococcus hominis* and four others) by API Staph kit (bioMerieux, USA). Methicillin resistance has been determined by standard disk diffusion method with oxacillin (1 µg) and cefoxitin (30 µg) disks, according to "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" guidelines. For the identification of VIS and hVIS strains, brain-heart infusion agar plates containing 6 µg/ml vancomycin (BHI-V6) were used for screening. The suspected VISA/hVISA strains which grew in this agar were further tested by macro E-test and PAP-AUC methods. Total VIS and hVIS rates among the tested isolates, were found as 3.4% (5/148) and 1.4% (2/148), respectively. These rates for CNS strains were 9.8% (4/41) and 2.4% (1/41), and for *S.aureus* strains were 0.9% (1/107) ve 0.9% (1/107), respectively. In the evaluation of the seven patients who were infected with VISA/hVISA strains, it was detected that all had history of use of glycopeptid antibiotics except one whose history was not reached, and all were hospitalized in intensive care units, except one who had an infected knee prosthesis. Since macro E-test and PAP-AUC methods could not be performed for all of the isolates, there was a probability that our resistance rates did not reflect the real results, nevertheless VIS and hVIS prevalence that we found in our study, seemed to be higher than those data reported previously from our country. In conclusion, since the number of VISA/hVISA strains may increase in time, surveillance for vancomycin resistance in methicillin-resistant staphylococci should be carried out in hospitals periodically.

Key words: *Staphylococcus aureus*; cogulase-negative staphylococci; methicillin; vancomycin; resistance; VISA; hVISA.

GİRİŞ

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşları, beta-laktam antibiyotiklere dirençli olmakla birlikte, aynı zamanda makrolidler, kinolonlar, tetrasiklinler, linkozamid-

ler ve aminoglikozidlere de direnç gösterebilmektedir. Dolayısıyla MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılacak seçenekler, çoğu zaman sadece glikopeptidler ile sınırlı kalmaktadır. İlk kez Japonya'dan Hiramatsu ve arkadaşları¹ tarafından vankomisine orta düzeyde duyarlı (MİK= 8 µg/ml) *S.aureus* suşunun bildirilmesiyle, literatüre "vancomycin-intermediate *S.aureus* (VISA, Mu50)" kavramı girmiştir¹. Daha sonra başka bir hastada, yine aynı araştırmacılar tarafından, vankomisin MİK değeri 2 µg/ml olan ve Mu3 olarak adlandırılan farklı bir izolat saptanmıştır. Bu izolatta, milyonda bir hücrede (10^{-6}) görülme üzere vankomisin MİK değeri, duyarlı sınır değerinin üstünde belirlenmiştir. Bu direnç paternine heterojen direnç adı verilmiş ve bakteri "heterojen VISA (hVISA)" olarak adlandırılmıştır².

Stafilokoklarda, vankomisine orta düzeyde direncin nedeni, peptidoglikan biyosentezindeki değişikliğe bağlı olarak hücre duvarının kalınlaşması ve düzensiz hale gelmesidir³. Buna ek olarak, penisilin bağlayan protein (PBP) 2 üretiminin aşırı artması ve PBP4 ekspresyonunun olmamasının da, direnç mekanizmasında etkili olabileceği bildirilmiştir⁴⁻⁶. Bugüne kadar saptanan ve farklı duyarlılık paternlerine sahip VISA izolatlarının, vankomisine uzun süre maruziyet sonrası ortaya çıktığı ileri sürülmektedir^{7,8}.

VISA/hVISA suşlarının, laboratuvarlarda uygulanan rutin duyarlılık testleriyle saptanması güçtür. Glikopeptid grubu antibiyotiklere karşı yalancı duyarlı olarak saptanmaları, bu suşlarla gelişen enfeksiyonların tedavisinde başarısızlığa yol açabilmektedir. Bu izolatların saptanması amacıyla, vankomisin içeren (4-6 mg/L) beyin-kalp infüzyon agar (BKİA) ile tarama, E-test, makro E-test ve PAP-AUC (population analysis profile-area under the curve; popülasyon analiz profili-eğri altında kalan alan) olmak üzere farklı yöntemler kullanılmıştır. Popülasyon analiz profili (PAP), bu suşların tespitinde halen altın standart yöntemdir⁹⁻¹². Bu izolatların özellikle glikopeptid kullanımı yoğun olan merkezlerdeki prevalanslarının bilinmesi, tedavilerin düzenlenmesine yardımcı olabilir. Bu çalışmada, agar tarama, makro E-test ve PAP-AUC yöntemleriyle VIS ve hVIS izolatlarının sıklığının araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Suşlar ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Çalışmaya, Kasım 2007-Mayıs 2009 tarihleri arasında, çeşitli klinik örneklerden (48 trakeal aspirat, 48 kan, 39 yara sürüntüsü, sekiz idrar, iki beyin omurilik sıvısı, iki plevra sıvısı, bir kateter ucu örneği) izole edilen 148 metisiline dirençli stafilokok suşu alındı. İzolatların tanımlanması, API Staph (bioMerieux, ABD) ticari kiti ile yapıldı.

Metisilin direnci, Müeller-Hinton agar besiyerinde standart disk difüzyon yöntemiyle araştırıldı. Bu amaçla oksasilin (1 µg) ve sefoksitin (30 µg) diskleri kullanıldı. Sonuçlar "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" önerileri doğrultusunda yorumlandı¹³.

Metisilin direnci saptanan stafilokok suşlarında, vankomisin ve teikoplanin duyarlılığı E-test (AB Biodisk, İsveç) yöntemiyle belirlendi. CLSI önerileri doğrultusunda vankomisin MİK değerleri, *S.aureus* için ≤ 2 µg/ml duyarlı, 4-8 µg/ml orta duyarlı, ≥ 16 µg/ml di-

rençli; koagülaz-negatif stafilokoklar (KNS) için ≤ 4 µg/ml duyarlı, 8-16 µg/ml orta duyarlı, ≥ 32 µg/ml dirençli kabul edildi. Teikoplanin için MİK değerleri, ≤ 8 µg/ml duyarlı, 16 µg/ml orta duyarlı, ≥ 32 µg/ml dirençli olarak değerlendirildi¹³.

Agar Tarama Yöntemi

Bu yöntem, "Centers for Disease Control and Prevention (CDC)" önerileri doğrultusunda 6 µg/mL vankomisin içeren beyin kalp infüzyon agar (BHI-V6) (Oxoid) besiyerinde yapıldı. 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlanan bakteri süspansiyonlarından 10'ar µl alınarak BHI-V6 besiyerine ekimler gerçekleştirildi ve plaklar 35°C'de normal atmosfer koşullarında toplam 48 saat inkübe edildi. Tarama besiyerlerinde 24. saatte üreyebilen bakteriler, kuşkulu vankomisine duyarlılığı azalmış stafilokok suşu (VIS), 48. saatte üreyen bakteriler ise kuşkulu heterojen vankomisine duyarlılığı azalmış stafilokok suşu (hVIS) olarak kabul edildi. Üreme göstermeyen izolatlar ise vankomisine duyarlı olarak değerlendirildi¹⁴.

Makro E-test Yöntemi

Walsh ve arkadaşları¹⁵ tarafından tarif edildiği şekilde, 2 McFarland bulanıklığına ayarlanan bakteri süspansiyonlarından 200 µl alınarak BHI agar besiyerlerinin yüzeyine yayıldı. Besiyeri yüzeyinin kuruması için 10 dakika beklendikten sonra, vankomisin (0.016-256 µg/ml) ve teikoplanin (0.016-256 µg/ml) E-test şeritleri yerleştirildi ve 35°C'de 48 saat inkübe edildi. Sonuçlar yorumlanırken, vankomisin ve teikoplanin MİK değerleri ≥ 8 µg/ml olan ya da sadece teikoplanin MİK değeri ≥ 12 µg/ml olan izolatlar VIS/hVIS olarak yorumlandı¹⁵.

Popülasyon Analiz Profili

PAP-AUC yöntemi, BHI-V6 besiyerinde üreyen şüpheli hVIS/VIS izolatlarının duyarlılık düzeylerini doğrulamak amacıyla uygulandı. Şüpheli izolatların 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlanmış süspansiyonlarından ve 10 kat seri dilüsyonlarından 50'şer µl, 1, 2, 4, 5, 6, 8 ve 10 µg/ml vankomisin içeren BHI agar besiyeri yüzeylerine yayıldı. Bakteriler, 35°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra, koloni sayımları gerçekleştirildi. Plaklarda her bir konsantrasyonda üreyen kolonilerin sayıları y eksenine, antibiyotik konsantrasyonları ise x eksenine yerleştirilerek grafikleri çizildi. Her bir suş için eğri altındaki alan (AUC) Microsoft Excel programıyla hesaplandı. Elde edilen değer, standart hVISA suşu olan Mu3 için hesaplanan AUC değerine bölünerek bir oran elde edildi. Bu oran ≤ 0.90 ise vankomisine duyarlı stafilokok, 0.90-1.3 ise hVIS, ≥ 1.3 ise VIS olarak kabul edildi¹⁴⁻¹⁶.

Çalışmada kontrol olarak, Mu3 (hVISA), Mu50 (VISA), ATCC 29213 ve ATCC 43300 suşları kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmaya alınan klinik izolatların 107'si *S.aureus*, 23'ü *S.epidermidis*, altısı *S.haemolyticus*, beşi *S.chromogenes*, üçü *S.hominis* ve birer adedi olmak üzere *S.sciuri*, *S.capitis*, *S.cohnii* spp. *urealyticum* ve *S.saprophyticus* olarak tanımlanmıştır. *S.aureus* ve KNS izolatlarında elde edilen MİK aralıkları ile MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo I. İzolatların MİK Aralıkları ile MİK₅₀ ve MİK₉₀ Değerleri

İzolat	MİK aralıkları (µg/ml)		MİK ₅₀ (µg/ml)		MİK ₉₀ (µg/ml)	
	Vankomisin	Teikoplanin	Vankomisin	Teikoplanin	Vankomisin	Teikoplanin
<i>S.aureus</i>	0.25-2	0.19-6	1	2	1.5	4
KNS	0.5-3	0.13-6	1	2	1.5	4

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu, KNS: Koagülaz-negatif stafilkok.

Agar tarama yöntemi ile BHI-V6 besiyerlerine ekilen 148 stafilkok suşundan ilk 24 saatte sadece beş tanesinde üreme gözlenmiştir. İnkübasyon süresi 48 saate uzatıldığında beş izolatta daha üreme saptanmıştır. Agar tarama yöntemi ile üreme tespit edilen 10 stafilkok izolatına ileri inceleme olarak, makro E-test ve PAP-AUC yöntemleri uygulanmıştır. Makro E-test ile 1, 3, 4 ve 7 nolu izolatlar vankomisine duyarlı bulunurken, diğer izolatların vankomisin duyarlılığında azalma tespit edilmiştir (Tablo II). PAP-AUC yöntemiyle ise 3 *S.aureus* izolatından biri (3 no) vankomisine duyarlı, biri (10 no) hVISA ve biri de (9 no) VISA izolatı olarak saptanmıştır (Şekil 1). KNS'lerde ise iki izolat (2 ve 4 no) vankomisine duyarlı, bir izolat (5 no) hVIS ve 4 izolat (1, 6, 7 ve 8 no) VIS olarak belirlenmiştir.

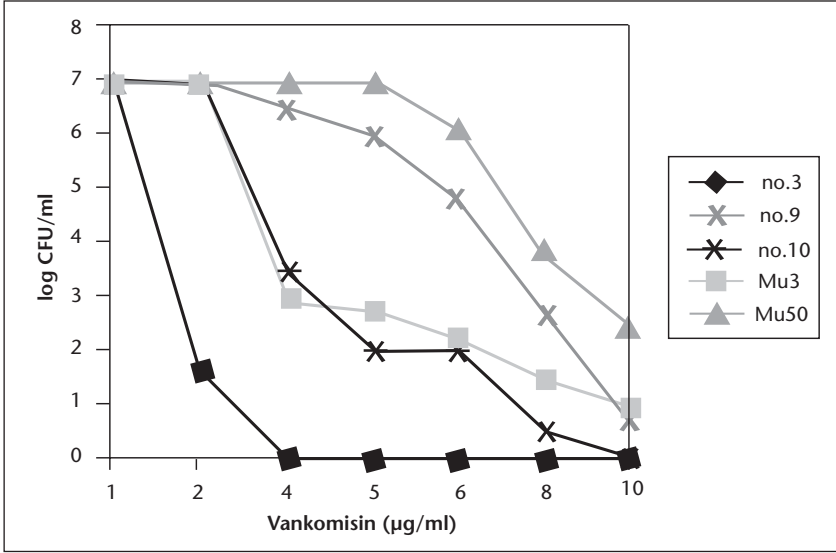
İzolatlardan 1 ve 7 numaralı suşlar makro E-test ile vankomisine duyarlı bulunurken, PAP-AUC yöntemiyle VIS olarak; 2 numaralı suş ise makro E-test yöntemiyle hVIS, PAP-AUC yöntemiyle ise vankomisine duyarlı olarak saptanmıştır. VIS ve hVIS olarak tespit edilen izolatların sayıları ve prevalansları Tablo III'te belirtilmiştir.

VIS ve hVIS üreyen hastaların klinik verileri gözden geçirildiğinde, bir hasta hariç hep-sinde daha önce glikopeptid antibiyotik kullanımı öyküsü olduğu izlenmiştir. Bir hasta-

Tablo II. BHI-V6'da Üreyen İzolatlarda Agar Tarama, E-test ve Makro E-test ile Elde Edilen Sonuçlar

No	Tür	Agar tarama		Van/Tec standart E-test MİK (µg/ml)		Makro E-test MİK (µg/ml)	
		24 s	48 s	24 s		Van 48 s	Tec 48 s
1	<i>S.epidermidis</i>	-	+	3/3		6	3
2	<i>S.hominis</i>	+	+	2/2		3	24
3	<i>S.aureus</i>	-	+	1/3		2	8
4	<i>S.epidermidis</i>	+	+	1.5/6		2	6
5	<i>S.haemolyticus</i>	+	+	0.75/3		1.5	24
6	<i>S.haemolyticus</i>	+	+	3/3		6	32
7	<i>S.hominis</i>	-	+	1.5/1.5		3	6
8	<i>S.haemolyticus</i>	+	+	2/3		3	96
9	<i>S.aureus</i>	-	+	2/4		4	16
10	<i>S.aureus</i>	-	+	2/4		3	16

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu, Van: Vankomisin, Tec: Teikoplanin, s: Saat.



Şekil 1. S.aureus izolatlarının PAP-AUC grafiği.

Tablo III. VIS ve hVIS Olarak Saptanan İzolatlar

İzolatlar (n)	VIS Sayı (%)*	hVIS Sayı (%)*
S.aureus (107)	1 (0.93)	1 (0.93)
KNS (41)	4 (9.8)	1 (2.4)
Toplam (148)	5 (3.4)	2 (1.4)

* Satır yüzdesidir.

KNS: Koagülaz-negatif stafilocok.

nın daha önce yatmış olduğu hastanede, ne kadar süre yattığına ve glikopeptid kullanım öyküsünün olup olmadığına dair bilgi elde edilememiştir. Enfekte diz protezi olan bir hasta dışında, diğer hastaların yoğun bakım ünitesinde yatan hastalar olduğu belirlenmiştir. Hastaların klinik özellikleri Tablo IV'te özetlenmiştir.

TARTIŞMA

VISA suşlarındaki direnç mekanizması, *vanA* geni olmaksızın, genetik mutasyonların ve belirli genlerin farklı şekilde ifade edilmesi sonucu hücre fizyolojisindeki değişiklik ve vankomisin molekülünün hedefine ulaşmasını engelleyecek şekilde hücre duvarının kalınlaşmasıdır². Farklı yedi ülkeden 16 VISA (BSC kriterlerine göre VRSA) izolatıyla yapılan bir çalışmada, bu izolatların 10-84 gün antibiyotiksiz ortamda pasajlanmaları sonrası vankomisin MİK değerlerinin düştüğü (MİK < 4 mg/L) gözlenmiştir¹⁷. Ancak 16 suştan biri hariç hepsinde, popülasyon analizi ile vankomisine dirençli alt popülasyonların hala bulunduğu gösterilmiştir. Bu bulgular, vankomisinin seçici baskısı kaldırıldıktan sonra bi-

Tablo IV. VISA veya hVISA Saptanan Hastaların Glikopeptid Kullanım Durumları ve Klinik Özellikleri

No	İzole edilen bakteri	Yaş	Örnek	Tanı ve altta yatan hastalıklar	Yatış süresi (gün)	GP kullanımı (gün)	Sonuç
1	<i>S.epidermidis</i>	70	BOS	Hidrocefali nedeniyle iki kez VP şant operasyonu	20	14	Ex
5	<i>S.haemolyticus</i>	33	Yara	Trafik kazası sonrası laparotomi	99	17	Sağ
6	<i>S.haemolyticus</i>	53	Yara	Fournier gangreni nedeniyle debridman, açılan kolostominin ikinci ameliyatla kapatılması, ÜŞİ, DM	61	21	Sağ
7	<i>S.hominis</i>	59	Kan	Solunum yetmezliği, mekanik ventilasyon	9	-	Ex
8	<i>S.haemolyticus</i>	58	Kan	Solunum yetmezliği, mekanik ventilasyon	78	30	Ex
9	<i>S.aureus</i>	71	Yara	SVO, HT, nefrektomi, beyin anevrizması nedeniyle stent yerleştirme operasyonu	15	4*	Ex
10	<i>S.aureus</i>	78	Yara	Diz protezi enfeksiyonu, üç kez diz artroplastisi, HT	86	49	Sağ

* Hastanın anevrizma stenti başka bir hastanede yerleştirildiğinden, o hastanede yatış süresi ve GP kullanıp, kullanmadığına dair verilere ulaşılamadı.
GP: Glikopeptid, BOS: Beyin omurilik sıvısı, SVO: Serebrovasküler olay, DM: Diabetes mellitus, HT: Hipertansiyon, ÜŞİ: Üriner sistem enfeksiyonu, Ex: Eksitus.

le, pasajlanmış suşlarda vankomisine dirençli hücrelerin sıklıkla oluştuğunu göstermektedir. Dolayısıyla hücre duvarı kalınlaşmasının, klinik VISA suşlarında yaygın bir fenotipik özellik olduğu ve *S.aureus* suşlarında fenotipik bir belirleyici faktör olabileceği belirtilmektedir¹⁷.

hVISA suşları ilk kez Japonya'dan rapor edildikten sonra, birçok ülkeden bu konuyla ilgili geriye dönük epidemiyolojik çalışmalar yapılmıştır. Çalışmalarda kullanılan yöntemlerin farklılığı, hVISA suşlarının prevalanslarının karşılaştırılmasında zorluklar yaşanmasına neden olmaktadır¹⁸. Hiramatsu ve arkadaşları¹⁴ sekizi üniversite hastanesi olmak üzere 203 hastaneden, 1149 MRSA izolatında yaptıkları çalışmada, üniversite hastanelerinde hVISA prevalansını %9.3, diğerlerinde ise %1.3 olarak bulmuşlardır. Song ve arkadaşları¹⁹ tarafından, 12 Asya ülkesindeki merkezlerden toplanan 1357 MRSA izolatıyla yapılan çalışmada ise, 347 izolat (%25.6), 4 µg/ml vankomisin içeren BHI agar plaklarında ürerken, bunlardan 58 (%4.3)'i hVISA olarak saptanmıştır. Fransa'da yapılan bir çalışmada, 30 izolattan hiçbirinde VISA suşu tespit edilemezken, yine aynı ülkeden yapılan başka bir çalışmada, 1983-2002 yılları arasında toplanan 1445 MRSA izolatından sadece biri VISA olarak tespit edilmiştir^{20,21}. Avrupa genelinde, 20 üniversite hastanesinden, 302 MRSA izolatında yapılan prevalans araştırmasında ise hVISA ya da VISA suşu saptanmamıştır²². İtalya'da 179 MRSA suşundan 2 (%1.1)'si; Tayland'da ise 155 MRSA suşundan 3 (%1.9)'ü hVISA olarak bulunmuştur^{23,24}.

Türkiye’de de değişik hastanelerde, hVISA/VISA prevalansının araştırıldığı çalışmalar yapılmıştır. Ankara’dan Sancak ve arkadaşlarının²⁵ çalışmasında, klinik örneklerden izole edilen 256 MRSA izolatu değerlendirilmiş; makro E-test ve 4 mg/L vankomisin içeren BHI agar (BHI-V4) tarama yöntemleriyle izolatların 46 (%17.9)’sı hVISA olarak tespit edilmiş ve bu suşlar popülasyon analizi ile doğrulanmıştır. İstanbul’dan Naki-poğlu ve arkadaşları²⁶, klinik örneklerden ve sağlık çalışanlarının el kültürlerinden izole edilen 81’i *S.aureus*, 54’ü KNS olmak üzere toplam 135 metisiline dirençli ve duyarlı stafilokok suşunda yaptıkları çalışmada, *S.aureus* suşlarından sadece birinde teikoplanine azalmış duyarlılık tespit etmiş; buna karşın altı KNS suşunda hem vankomisin hem de teikoplanine, bir KNS suşunda da sadece vankomisine heterojen direnç bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda, metisiline dirençli 148 stafilokok izolatının 5 (%3.4)’i VIS, 2 (%1.4)’si ise hVIS olarak tanımlanmıştır. *S.aureus* suşları dikkate alındığında ise, VISA (1/107) ve hVISA (1/107) prevalansı benzer olarak %0.9 oranında bulunmuştur. Değişik çalışmalarda saptanan prevalans oranları arasındaki farklılıkların başlıca nedeni, kullanılan yöntemlerin farklı olmasıdır. Bugün için kabul edilen altın standart PAP yöntemidir. Ancak bu yöntemin oldukça zahmetli ve zaman alıcı olması nedeniyle, çoğu çalışmada değişik oranlarda vankomisin ya da teikoplanin içeren tarama plakları kullanılmıştır. Buna karşın tarama plaklarının kullanılması sonucunda elde edilen yalancı negatiflik oranları oldukça yüksektir¹⁴. Bizim çalışmamızda da, ön tarama amacıyla kullanmış olduğumuz 6 µg/ml vankomisin içeren plaklar, hVISA suşlarının tespit edilmesini engellemiş olabilir.

Walsh ve arkadaşları¹⁵, 284 MRSA ve vankomisine duyarlılığı azalmış 45 stafilokok izolatuyla yaptıkları çift-kör çalışmada, agar dilüsyon, sıvı mikrodilüsyon, standart E-test, makro E-test, agar tarama yöntemi ve popülasyon analiz çalışmaları gibi farklı yöntemlerin, duyarlılık ve özgüllüğünü karşılaştırmışlardır. Bu yöntemlerin sonuçlarını, Wootton ve arkadaşlarının¹⁶ tarif ettiği PAP-AUC metodu ile karşılaştırmışlar ve BHI-V6 ile agar tarama yönteminin duyarlılığını %22, özgüllüğünü %97; 5 µg/ml vankomisin içeren Müeller-Hinton agar tarama yönteminin duyarlılığını %20, özgüllüğünü %99; basitleştirilmiş popülasyon analizi metodunun duyarlılığını %71, özgüllüğünü %88; standart E-test için duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %82 ve %93; makro E-test için ise bu oranları sırasıyla %96 ve %97 olarak bildirmişlerdir¹⁵. Vankomisin duyarlılık sınırları, CLSI kriterlerine göre değerlendirildiğinde, agar dilüsyon yönteminin duyarlılığı ve özgüllüğü %20’ye %100, sıvı mikrodilüsyon yönteminin ise %11’e %100 olduğu gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada, makro E-test yöntemi için en uygun besiyerinin beyin-kalp infüzyon agar olduğu vurgulanmıştır¹⁵.

Yapılan çalışmalar, VISA ve hVISA suşlarının neden olduğu enfeksiyonların gelişiminde, bazı risk faktörlerinin varlığını işaret etmektedir. Glikopeptidlerin yaygın kullanımıyla seçici baskı, vankomisin düşük doku konsantrasyonlarının olması, vankomisin tedavi başarısızlıkları; diyabet, immünsüpresyon, malignite, son dönem böbrek yetmezliği gibi altta yatan hastalıklar; hVISA tespit edilmeden önceki sekiz hafta içinde cerrahi operasyon geçirmiş olmak; endokardit, derin apseler ve ortopedik alet ile ilişkili enfeksiyonlar gibi yük-

sek bakteri yükü barındıran enfeksiyonlar, tanımlanmış risk faktörlerindedir^{17,27-29}. Bizim çalışmamızda da, VIS ve hVIS olarak tanımlanan suşların izole edildiği hastalar incelendiğinde, üreme öncesi glikopeptid kullanımı olduğu ve bazılarının büyük cerrahi işlemlere maruz kaldıkları tespit edilmiştir.

Stafilokoklarda, glikopeptid duyarlılığının azalmasındaki temel mekanizmanın, hücre duvarı kalınlaşması olduğu ve genetik temelleri tam olarak aydınlatılamasa da bu fenotipik özelliğin, glikopeptidlere maruziyetle ilişkili olduğu gösterilmiştir. Bu bilgiler ışığında, glikopeptid antibiyotiklerin akılcı kullanımının, hVIS ve VIS izolatlarının ortaya çıkmasını engellemede en önemli yol olduğu görülmektedir. Ayrıca enfeksiyon kontrol önlemlerinin etkinliği de, bu bakterilerin hastane içi yayılımını önlemede bir diğer önemli faktördür.

KAYNAKLAR

1. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. J Antimicrob Chemoter 1997; 40(1): 135-6.
2. Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. Lancet Infect Dis 2001; 1(3): 147-55.
3. Appelbaum PC. MRSA- the tip of the iceberg. Clin Microbiol Infect 2006; 12(Suppl 2): S3-10.
4. Moreira B, Boyle-Vavra S, de Jonge BL, Daum RS. Increased production of penicillin-binding protein 2, increased detection of other penicillin-binding proteins, and decreased coagulase activity associated with glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemoter 1997; 41(8): 1788-93.
5. Finan JE, Archer GL, Pucci MJ, Climo MW. Role of penicillin-binding protein 4 in expression of vancomycin resistance among clinical isolates of oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemoter 2001; 45(11): 3070-5.
6. Shorr AF. Epidemiology of staphylococcal resistance. Clin Infect Dis 2007; 45(Suppl 3): S171-6.
7. Sancak B. *Staphylococcus aureus*'ta metisilin ve vankomisin direnci. Hacettepe Tıp Dergisi 2007; 38: 127-34.
8. Rahman M. Alternatives to vancomycin in treating methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. J Antimicrob Chemoter 1998; 41(3): 325-8.
9. Moreillon P, Que Y, Glauser MP. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock), pp: 2321-51. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Principles and Practice of Infectious Disease. 2005, 6th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia.
10. Guerin F, Buu-Hoi A, Mainardi JL, et al. Outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to glycopeptides in a Parisian hospital. J Clin Microbiol 2000; 38(8): 2985-8.
11. Fridkin SK. Vancomycin-intermediate and -resistant *Staphylococcus aureus*: what the infectious disease specialist needs to know. Clin Infect Dis 2001; 32(1): 108-15.
12. Tenover FC, Biddle JW, Lancaster MV. Increasing resistance to vancomycin and other glycopeptides in *Staphylococcus aureus*. Emerg Infect Dis 2001; 7(2): 327-32.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Antimikrobik Duyarlılık Testleri için Uygulama Standartları. Onsekizinci Bilgi Eki, M100-S18, 2008. Gür D (Çeviri ed), Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, İstanbul.
14. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. Lancet 1997; 350(9092): 1670-3.
15. Walsh TR, Bolmström A, Qvarnström A, et al. Evaluation of current methods for detection of staphylococci with reduced susceptibility to glycopeptides. J Clin Microbiol 2001; 39(7): 2439-44.
16. Wootton M, Howe RA, Hillman R, Walsh TR, Bennett PM, MacGowan AP. A modified population analysis profile (PAP) method to detect hetero-resistance to vancomycin in *Staphylococcus aureus* in a UK hospital. J Antimicrob Chemoter 2001; 47(4): 399-403.

17. Cui L, Ma X, Sato K, et al. Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2003; 41(1): 5-14.
18. Liu C, Chambers HF. *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin: epidemiology, clinical significance, and critical assessment of diagnostic methods. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47(10): 3040-5.
19. Song JH, Hiramatsu K, Suh JY, et al. Emergence in Asian countries of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(12): 4926-8.
20. Bobin-Dubreux S, Reverdy ME, Nervi C, et al. Clinical isolate of vancomycin-heterointermediate *Staphylococcus aureus* susceptible to methicillin and in vitro selection of a vancomycin-resistant derivative. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(1): 349-52.
21. Robert J, Bismuth R, Jarlier V. Decreased susceptibility to glycopeptides in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a 20 year study in a large French teaching hospital, 1983-2002. J Antimicrob Chemother 2006; 57(3): 506-10.
22. Schmitz FJ, Krey A, Geisel R, Verhoef J, Heinz HP, Fluit AC. Susceptibility of 302 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from 20 European university hospitals to vancomycin and alternative antistaphylococcal compounds. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1999; 18(7): 528-30.
23. Marchese A, Balistreri G, Tonoli E, Debbia EA, Schito GC. Heterogeneous vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in a large Italian hospital. J Clin Microbiol 2000; 38(2): 866-9.
24. Trakulsomboon S, Danchaiwijitr S, Rongrungruang Y, et al. First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Thailand. J Clin Microbiol 2001; 39(2): 591-5.
25. Sancak B, Ercis S, Menemenlioglu D, Colakoglu S, Haşçelik G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin in a Turkish university hospital. J Antimicrob Chemother 2005; 56(3): 519-23.
26. Nakipoglu Y, Derbentli S, Cagatay AA, Katranci H. Investigation of *Staphylococcus* strains with heterogeneous resistance to glycopeptides in a Turkish university hospital. BMC Infect Dis 2005; 5(1): 31.
27. 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): 1587-8.
28. 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.
29. Howden BP, Ward PB, Charles PG, et al. Treatment outcomes for serious infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with reduced vancomycin susceptibility. Clin Infect Dis 2004; 38(4): 521-8.