

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**METİSİLİNE DİRENÇLİ STAFİLOKOKLARDA
VANKOMİSİNE KARŞI AZALMIŞ DUYARLILIĞIN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr.Emine TUNÇ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Çiğdem KUZUCU**

MALATYA- 2014

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**METİSİLİNE DİRENÇLİ STAFİLOKOKLARDA
VANKOMİSİNE KARŞI AZALMIŞ DUYARLILIĞIN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

**Dr.Emine TUNÇ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Çiğdem KUZUCU**

**Bu tez, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
2012-52 no'lu proje numarası ile desteklenmiştir.**

MALATYA- 2014

TEŞEKKÜR

Asistanlığım süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren Sayın Doç.Dr.Barış OTLU, tez danışmanın Prof.Dr.Çiğdem KUZUCU , diğer bölüm hocalarım ve birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunuyorum.

Uzmanlık eğitimim süresince bana destek olan kıymetli eşim Şeyhmus TUNÇ, en değerli varlıklarım oğullarım Kağan TUNÇ ve Emir TUNÇ, hayatım boyunca hep yanımda olan canım annem Güllü KORKUT ve babam Ömer KORKUT 'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
KISALTMALAR.....	vi
TABLO, GRAFİK VE RESİM LİSTESİ.....	vii
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Stafilokoklar.....	3
2.1.1. Tarihçe.....	3
2.1.2. Morfoloji ve tanımlama.....	4
2.1.3. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un virulans faktörleri.....	5
2.1.3.1.Kapsül ve Slime Tabakası.....	5
2.1.3.2.Hücre Duvarı Yapısı	6
2.1.3.2.1.Peptidoglikan tabaka.....	6
2.1.3.2.2. Teikoik asit.....	6
2.1.3.2.3.Protein A.....	7
2.1.3.3. Toksinler.....	7
2.1.3.3.1.Sitolitik veya Membran Hasarı Yapan Toksinler.....	7
2.1.3.3.1.1.Alfa Toksin.....	7
2.1.3.3.1.2.Beta toksin.....	8
2.1.3.3.1.3.Delta toksin.....	8
2.1.3.3.1.4.Gamma Toksin.....	8
2.1.3.3.1.5.Panton – Valentin Lökositin (PVL)	9
2.1.3.3.2.Eksfoliyatif Toksinler.....	9
2.1.3.3.3.Enterotoksin.....	9
2.1.3.3.4.Toksik Şok Sendrom Toksini-1 (TŞST1)	10

2.1.3.4.Enzimler.....	10
2.1.3.4.1.Katalaz.....	10
2.1.3.4.2.Koagülaz.....	11
2.1.3.4.3.Lipaz.....	11
2.1.3.4.4.Hyalurininidaz	12
2.1.3.4.5.Deoksiribonükleaz (DNaz)	12
2.1.3.4.6.Fibrinolizin.....	12
2.1.3.4.7.Penisilinaz (β laktamaz)	12
2.1.4. <i>S.aureus</i> ' un Neden Olduğu Enfeksiyonlar.....	14
2.1.4.1. Deri/ mukoza ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları.....	14
2.1.4.1.1.Folikülit.....	14
2.1.4.1.2.Fronkül.....	14
2.1.4.1.3.Karbonkül.....	14
2.1.4.1.4.İmpetigo.....	14
2.1.4.1.5.Süpüratif Hidraadenit.....	15
2.1.4.1.6.Mastit.....	15
2.1.4.1.7.Yara Enfeksiyonları.....	15
2.1.4.2. Sistemik Enfeksiyonlar	15
2.1.4.2.1. Kemik ve Eklem Enfeksiyonları.....	15
2.1.4.2.2. Solunum Sistemi Enfeksiyonları.....	15
2.1.4.2.3. Endokardit.....	16
2.1.4.2.4.Bakteriyemi	16
2.1.4.2.5. Menenjit	16
2.1.4.3. Toksinlere Bağlı Olarak Gelişen Enfeksiyonlar	16
2.1.4.3.1. Stafilokokal Besin Zehirlenmesi	16
2.1.4.3.2. Stafilokokal Haşlanmış Deri Sendromu.....	17
2.1.4.3.3. Toksik Şok Sendromu (TŞS)	17

2.1.5. <i>Staphylococcus Aureus</i> 'ta Antimikrobiyal Direnç	17
2.1.5.1. <i>S.aureus</i> 'ta Penisilin Direnci	17
2.1.5.2.Metisilin Direnci.....	18
2.1.5.2.1.Metisilin Direnç Fenotipini Etkileyen Diğer Faktörler.....	21
2.1.5.2.1.1. Beta Laktamaz Plazmidi.....	22
2.1.5.2.1.2. <i>Fem</i> Faktörleri.....	23
2.1.5.2.1.3. Otolitik Aktivite.....	23
2.1.5.2.1.4. Çevresel Koşullar.....	23
2.1.5.2.2. Metisilin Direncinin Belirlenmesi.....	24
2.1.5.2.2.1. Disk Difüzyon Yöntemi.....	24
2.1.5.2.2.2.Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi.....	24
2.1.5.2.2.3.Agar Tarama Yöntemi	24
2.1.5.2.2.4.E-Test Yöntemi.....	25
2.1.5.2.2.5.Lateks Aglütinasyon Yöntemi.....	25
2.1.5.2.2.6.Kromojenik Besiyerleri.....	25
2.1.5.2.2.7.Moleküler Yöntemler.....	25
2.1.5.3. <i>S.aureus</i> 'ta Vankomisin Direnci.....	26
2.1.6.Epidemiyoloji.....	27
2.1.7.MRSA Tedavi Seçenekleri.....	33
2.1.7.1.Daptomisin.....	33
2.1.7.2.Kinupristin/ Dalfopristin.....	35
2.1.7.3.Linezolid.....	36
2.1.7.4.Tigesiklin.....	37
2.1.7.5.Oritavansin.....	37
2.1.7.6.Telavansin.....	38
2.1.7.7.Ramoplanin.....	38
2.1.7.8.Dalbavansin.....	38

2.1.7.9.Seftobiprol.....	38
2.1.7.10.İklaprim.....	39
3. MATERYAL VE METOD.....	40
3.1.Bakteri Suşları.....	40
3.2.Mikrobiyolojik Kültür ve İdentifikasyon İşlemleri.....	40
3.3.Multipleks PZR İle <i>mecA</i> , <i>nuc</i> ve 16S Gen Bölgelerinin Çoğaltılması.....	41
3.3.1.DNA'nın Elde Edilmesi.....	41
3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Hedef Bölgenin Çoğaltılması.....	41
3.3.3.DNA'nın Görüntülenmesi.....	42
3.4.Buyyon Mikrodilüsyon.....	42
3.5.Standart E test	43
3.6.Vankomisin Agar Tarama.....	43
3.7.Makro E Test Metod.....	43
3.8. Popülasyon Analiz Profili.....	44
4. BULGULAR.....	45
5. TARTIŞMA.....	51
6.SONUÇLAR.....	60
7.ÖZET.....	61
8.SUMMARY.....	62
9.KAYNAKLAR.....	63

KISALTMALAR

KNS	: Koagülaz-Negatif Stafilokok
MRSA	: Metisiline Dirençli <i>S. aureus</i>
MRKNS	: Metisiline Dirençli Koagülaz Negatif Stafilokok
MSSA	: Metisiline Duyarlı <i>S. aureus</i>
MSKNS	: Metisiline Duyarlı Koagülaz Negatif Stafilokok
PBP	: Penisilin Bağlayan Protein
VISA	: Vankomisine Orta Derecede Dirençli <i>S. aureus</i>
PAP-AUC	: Popülasyon Analiz Profili -Eğri Altındaki Alan
PMNL	: Polimorfonükleer lökositler
TŞST	: Toksik Şok Sendromu Toksini
PVL	: Panton-Valentin Lökosidin
DNaz	: Deoksiribonükleaz
SCCmec	: Stafilokokal Kaset Kromozom mec
MHA	: Mueller-Hinton Agar
VRE	: Vancomycin Resistant Enterococci
hVISA	: Vankomisine Heterojen Orta Derecede Dirençli <i>S. aureus</i>
VRSA	: Vankomisine Dirençli <i>S.aureus</i>
BHIA	: Beyin-Kalp İnfüzyon Agar
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
NAG	: N-Asetil Glukozamin
NAMA	: N-Asetil Muramik asit
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
CDC	: Center For Disease Control and Prevention
PCR	: Polymerase Chain Reaction

TABLO, GRAFİK VE RESİM LİSTESİ

Tablo 1. <i>Staphylococcus Aureus</i> 'un Virulans Faktörleri	12
Tablo 2. <i>S.aureus</i> Suşlarında Tanımlanmış Olan SCC mec Tipleri.....	21
Tablo 3. Örnek Tipine Göre MRSA Suşlarının Dağılımı.....	45
Grafik 1. Servislere Göre MRSA Suşlarının Dağılımı.....	45
Grafik 2. 52 Adet mecA Pozitif <i>S.aureus</i> Suşunun E-test ve Broth Mikrodilüsyon Yöntemiyle Yapılan Yıllara Göre MİK Ortalamaları.....	47
Grafik 3. 11.,17. ve 18.Suşların PAP-AUC Grafikleri.....	49
Grafik 4. 24.,36.,37.,43.,48.,49. Suşların PAP-AUC Grafiği.....	49
Grafik 5. Mu3(hVISA), Mu50 (VISA), Standart <i>S.aureus</i> Suşu (ATCC 29213) PAP-AUC Grafiği.....	49
Resim 1. 1-12. Örneğin PZR Görüntüleri.....	46
Resim 2. 13-22. Örneğin PZR Görüntüleri.....	46
Resim 3. 48 Nolu Örneğin 1,2,3,4,5,6,8,10 mg/l Vankomisin İçeren BHİA da 35°C’de 48 Saat İnkübasyon Sonucu Üreme Görüntüleri.....	48

1.GİRİŞ

Staphylococcus aureus, tüm dünyada toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlara yolaçan en önemli etkenlerden biridir. Özellikle yoğun bakım ünitelerinde olmak üzere metisilinedirençli *S.aureus* (MRSA) enfeksiyonları giderek artan oranlarda rapor edilmektedir (1,2).

Günümüzde MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde en sık kullanılan ilaçlar vankomisin ve teikoplanin olmak üzere glikopeptid grubu antibiyotiklerdir. Glikopeptidlerin yanı sıra linezolid, daptomisin ve tigesiklin gibi yeni antibiyotikler de kullanılmaktadır. Ancak ne yazık ki stafilokoklarda antibiyotiklere karşı görülen hızlı direnç gelişimi hem glikopeptid grubu ilaçlara hem de yeni geliştirilen ilaçlara karşı da ortaya çıkmıştır (3).

Bindoküzyüzdoksanaltı yılında VISA (Vancomycin-intermediate *S.aureus*) izolatları VISA suşlarının ortaya çıkmasından kısa bir süre sonra 1997 yılında Hiramatsu ve arkadaşları, "heterojen VISA (hVISA)" olarak adlandırılan yeni bir vankomisin direnç tipi tanımlamışlardır. "Mu 3" olarak adlandırılan ilk hVISA izolatından sonra birçok ülkeden değişen oranlarda olmak üzere hVISA izolatları bildirilmiştir . Stafilokoklarda gözlenen bu direnç gelişimini takiben ilk kez 2002 yılında Michigan'da bir diyaliz hastasında vankomisine dirençli *S.aureus* (VRSA) izolatı tanımlanmıştır. Bugüne kadar, tüm dünyada VRSA enfeksiyonunun görüldüğü 11 olgu mevcuttur (4,5,6,).

VRSA da bakteriler vankomisine karşı çok yüksek MİK değerlerine sahip olduğundan, rutin duyarlılık testlerinde tespit edilebilmektedir. VISA/hVISA suşlarının ise laboratuvarlarda uygulanan rutin duyarlılık testleriyle saptanması güçtür. Glikopeptid grubu antibiyotiklere karşı yalancı duyarlı olarak saptanmaları, bu suşlarla gelişen enfeksiyonların tedavisinde başarısızlığa yol açabilmektedir. Bu izolatların saptanması amacıyla, vankomisin içeren beyin-kalp infüzyon agar (BHIA) ile tarama, standart 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-AUC), bu suşların tespitinde halen altın standart yöntemdir. Bu izolatların özellikle glikopeptid kullanımı yoğun olan merkezlerdeki prevalanslarının bilinmesi, tedavilerin düzenlenmesine yardımcı olabilir (7,8,9).

Bu çalışmaya İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezine 2009-2013 ağustos tarihleri arasında polikliniklerden başvuran ve hastanede yatan hastalardan rutin olarak Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 52 MRSA suşu

alınmıştır. Bu suşlarda agar tarama, standart E test, makro E-test, buyyon mikrodilüsyon ve PAP-AUC yöntemleriyle VISA ve hVISA izolatlarının sıklığının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Stafilocoklar

2.1.1. Tarihçe

Staphylococcus'ları 1878'de Robert Koch tanımlamış, 1880'de Pasteur sıvı besiyerinde üretmiş ve 1881'de Alexander Ogston fare ve kobaylar için patojen olduklarını vurgulamıştır. Rosenbach 1884'de beyaz renkli kolonileri *Staphylococcus albus*, sarı-portakal rengi kolonileri ise *Staphylococcus aureus* olarak isimlendirmiştir. Kraus ve Clairmont tarafından bakterinin 1900'de alfa toksini, Glenny ve Stevens tarafından 1935'de beta toksini bulunmuştur. Todd ve arkadaşlarınca 1978'de yeni bir hastalık olarak "Toksik Şok Sendromu:TŞS" tanımlanmıştır (10).

Staphylococcus cinsi ismini, hücrelerinin üreme esnasında üzüm salkımı görünümünde üremelerinden almıştır. Buna karşılık klinik örneklerde bakteriler tek tek, çiftler halinde veya kısa zincirler şeklinde görülebilirler. Stafilocokların çoğu 0,5-1,5 µm çapında, hareketsiz, fakültatif anaerobik, yüksek konsantrasyonda tuz içeren besiyerlerinde (örn: % 10 NaCl) ve 18-40 °C aralıklarında üreyebilmektedirler. Bu bakteriler insanların deri ve mukoz membranlarında bulunabilmektedirler. Örneğin *S.aureus* insanda burun deliklerinde, *S.capitis* yağ bezlerinin bulunduğu yerlerde (örn:alın), *S.haemolyticus* ve *S.hominis* apokrin bezlerinin bulunduğu yerlerde (örn:koltuk altları) bulunurlar. Stafilocoklar insan için önemli patojenlerden olup deri yumuşak doku, kemik, üriner sistem enfeksiyonlarına ayrıca fırsatçı enfeksiyonlar gibi hayatı tehdit eden sistemik hastalıklara neden olmaktadır (11).

S.aureus'ların antibiyotik direnci ilk kez, 1930'lu yıllarda klinik kullanıma giren sülfonamid grubu antibiyotiklere karşı tanımlanmış ve bu direnç günümüzde linezolid, daptomisin gibi yeni antibiyotiklere kadar uzanmıştır. *S.aureus* izolatları ile meydana gelen enfeksiyonlarda görülen mortalite hızı 1941 yılında penisilin G'nin klinikte kullanıma girmesinden önce % 80'leri bulmuştur. Penisilin G kullanıma girdikten sonra sonra *S.aureus*'a bağlı ölümcül enfeksiyonlar, dramatik olarak azalma göstermiştir. Bu süreç çok uzun sürmemiş, ilk kez 1942 yılında penisilinaz enzimi sentezleyen izolat saptanmıştır. Bunu takip eden yıllarda sadece hastane kaynaklı değil toplum kaynaklı izolatlarda da penisilin direnci görülmeye başlanmıştır.Daha sonraki yıllarda penisilinaz üreten izolatların sayısı giderek artış göstermiş, günümüzde % 90-95'lere ulaşmıştır. Penisilinaz enziminin yol açtığı bu direnç sorunu, 1959 yılında beta-laktamaz enzimine dayanıklı yarı sentetik bir penisilin olan metisilin ile ortadan kaldırılmıştır. Ancak,

metisilin kullanımının başlamasından sadece 2 yıl sonra, 1961 yılında İngiltere’de Colindale Hastanesinde ilk MRSA izolatı (COL izolatı) tanımlanmıştır. Bunu takip eden yıllarda hastane kaynaklı MRSA izolatları tüm dünyada görülmeye başlanmıştır. Bindokuyüzdoksanlı yıllardan sonra ise toplum kaynaklı MRSA izolatları ortaya çıkmıştır(12). 1956 yılında vankomisin kullanıma girmiş, ancak ilk yıllarda saf preparatlarının hazırlanamamış olmasından ve yan etkilerinden dolayı bir süre sonra terkedilmiş, ancak MRSA grubu bakterilerin yaygın hale gelmesiyle 1980’li yılların başında tekrar kullanılmaya başlanmış ve bu enfeksiyonların başarıyla tedavi edilmesini sağlamıştır (13). Ancak stafilokoklar, bu ilaca karşı da direnç geliştirmeye başlamış ve vankomisin orta derece duyarlı(intermediate) *S.aureus* (VISA) ilk suş 1997’de Japonya’dan bildirilmiş; takip eden yıllarda ABD, Fransa, Kore, Güney Amerika, Brezilya ve İskoçya gibi pek çok ülkeden azalmış vankomisin duyarlılığını bildiren çalışmalar rapor edilmiş; bu da stafilokoklarda vankomisin direncinin global bir sorun olduğuna işaret etmiştir(14). İkibiniki yılına gelindiğinde ilk kez vankomisin-dirençli (resistant) *S.aureus* (VRSA) suşu tanımlanmıştır(15).

2.1.2. Morfoloji ve tanımlama

Stafilokoklar gram pozitif birden fazla düzlemde bölündükleri için üzüm salkımı görünümünde düzensiz kümeler yapan küresel hücrelerdir. Sıvı kültürlerde tekli, ikili, tetrat veya zincir yapmış olarak da görülürler. Bakteri 0,5-1,5 µm çapında, hareketsiz, sporsuz, aerobik, fakültatif anaerobik, yüksek konsantrasyonda tuz içeren besiyerlerinde (örn: % 10 NaCl) ve 18-40 °C aralıklarında üreyebilmektedir. Streptokoklardan ayırt edilmelerinde kullanılan katalaz enzimi üretirler. Gaz oluşturmada laktik asit üreterek karbohidratları yavaş hızla fermante ederler (16).

Birçok rutin besiyerinde üreyebilirler, ancak en tipik üremeleri kanlı agardadır. Kanlı agar 18-24 saatte 1-4 mm çapında yuvarlak, düzgün, kabarık, mat, S tipinde koloniler oluştururlar. *S.aureus* kökenlerinin çoğunda sarı pigment ve β hemoliz görülür. *S. epidermidis* ve *S. Saprophyticus*’un bazı kökenlerinde de sarı veya turuncu pigment ve hemoliz görülebilir (11). Kolonilere altın sarısı rengini karotenoid pigmentleri vermektedir. Mikrokapsüle sahip suşlar mukoid koloni oluşturabilirler.

Klinik materyalden stafilokokları izole etmek için selektif besiyeri olarak mannitol salt agar kullanılabilir. Bu agar % 10 NaCl, mannitol ve pH indikatörü olarak fenol kırmızısını içerir. Bu

besiyerinde yüksek konsantrasyonda NaCl varlığında üreyebilen *S. aureus* mannitolu fermente ederek sarı hale ile çevrili koloniler oluşturur. % 5 koyun kanlı agarda 24 saatte ürerken, mannitol ve NaCl agar ve diğer selektif besiyerlerinde üreme için en az 48–72 saat inkübasyon gerekli olabilmektedir (17,18). Stafilocoklar kuruluğa, ısıya (50 °C ısıya 30 dk dayanırlar) ve % 9 sodyum klorüre dirençlidirler, fakat % 3 heksaklorofen gibi belirli bazı kimyasallarla hemen inhibe olurlar (16).

Doğada yaygın olarak bulunan stafilocok'lar; *Planococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* ve *Staphylococcus*'un da içinde bulunduğu *Micrococcaceae* ailesi içinde yer alan 4 cinsten biridir. Ancak DNA-r RNA hibridizasyon, 16S rRNA sekans analizi ve kemotaksonomik analizler (hücre duvar yapısı, hücresel yağ asitleri) sonrasında stafilocoklar; *Gamella*, *Macrococcus* ve *Salinicoccus* ile birlikte *Firmicutes* filum'un da aile V, genus 1'de (*Staphylococcaceae*) yer almıştır (17,19,20,21,22).

Staphylococcus cinsinde en az 35 tür vardır. Klinik önemi olan üç tür *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, ve *Staphylococcus saprophyticus*'tur. *Staphylococcus aureus* diğer iki türden koagulaz pozitif oluşuyla ayrılır (16). *Staphylococcus spp* DNA'sında guanin +sitozin oranı (G+S) % 30-40 arasında değişmektedir. *S. aureus*'un genomunun guanin-sitozin (G+C) oranı % 32 dir. Yaklaşık 2400 baz çiftli gen taşıyan 2.8 Mb'lık sirküler bir kromozom, genomun % 84.5'ini oluşturan 2600 *Open Reading Frame (ORF)* bölgesi, profajlar, plazmidler ve transpozonlara sahiptir. Bakteri en sık transdüksiyon yolu ile virülans ve dirençten sorumlu genlerini aktarır (23,2).

2.1.3.Staphylococcus aureus'un virulans faktörleri

2.1.3.1.Kapsül ve Slime Tabakası

S.aureus suşlarında 11 kapsül serotipi belirlenmiştir. Stafilocokların çoğu polisakkarit yapıda bir mikrokapsüle sahiptirler. Kapsül in vivo ortamda daha belirgindir, ancak in vitro koşullarda da saptanabilir. Kapsül bakteriyi polimorfonükleer lökositlerin (PMNL) fagositozunu engelleyerek korumaktadır. Serotip 1 ve 2 insanda nadiren hastalık oluşturan tipler ile ilişkilidirler ve çok kalın bir kapsül ve mukoid görünüşlü koloniler oluşturur. Serotip 5 ve 8 insan enfeksiyonlarına en sık neden olan tiplerdir ve insan enfeksiyonlarının yaklaşık % 75'inden sorumludur. Tip 8'in Toksik Şok Sendromu Toksini (TŞST) üretimi, tip 5' in ise metisilin direnci ile ilişkili oldukları gösterilmiştir (30,31).

Slime tabakası ilk kez Christensen ve arkadaşları tarafından gösterilmiş gevşek bağlı ve suda çözünen bir film tabakasıdır. Daha çok KNS'larda (Koagülaz Negatif Stafilokokların) bulunur. Monosakkaritler, proteinler ve küçük peptidler içerir ve stafilokokların çoğu tarafından farklı miktarlarda yapılmaktadır, çok kuvvetli antijenik yapıdadır. Bakterinin eklem, doku, kateter, greft, şant, prostetik kapak gibi yabancı cisimlere tutunmasını sağlamaktadır. Slime tabakası oluşturabilen KNS suşlarının daha virülen ve antibiyotiklere daha dirençli oldukları bildirilmektedir (30,32).

2.1.3.2.Hücre Duvarı Yapısı

Stafilokokların hücre duvarı; peptidoglikan, teikoik asit ve protein A komponentlerinden oluşur. Hücre duvarının ana komponenti duvarın % 50'sini oluşturan peptidoglikandır. (10,17,21).

2.1.3.2.1.Peptidoglikan tabaka

Peptidoglikan, özellikle gram-pozitif hücre duvarının yarısını oluşturur. β 1-4 glikozid bağları ile bağlanan N-asetil glukozamin (NAG) ve N-asetil muramik asit (NAMA) alt gruplarından oluşur. Disakkarid bir yapı ve NAMA'ye bağlı D ve L aminoasitlerinden oluşmuş pentapeptid zincirden oluşmaktadır. Gram-pozitif bakterilerde çok sayıda çapraz bağlanmış katmanlar bulunmakta ve hücreyi daha sağlamlaştırmaktadır. Peptidoglikan tabakasının yapımında görev alan enzimler penisilin bağlayan proteinler adını alır ve penisilin ile diğer beta-laktam antibiyotiklerin hedefidirler. Peptidoglikan endotoksin benzeri aktiviteye sahiptir; endojen pirojenlerin üretimini stimule eder, komplemanı, monositlerden interlökin-1 üretimini ve PMNL'lerin (polimorfonükleer lökositlerin) agregasyonunu aktive eder (30,33).

2.1.3.2.2. Teikoik asit

Teikoik asit hücre duvarının % 30–50'sini oluşturan diğer bir önemli komponenttir. Fosfodiester bağları ile bağlı ribitol fosfat polimerlerinden oluşur. Ribitol teikoik asit *S. aureus* için özgüdür. Teikoik asit yalnızca gram pozitif bakterilerin hücre duvarında peptidoglikana tutunmuş halde bulunur. Hücre yüzeyinde negatif yük oluşturarak çeşitli metal iyonlarının, kationların lokalizasyonunda rol oynar, hücrenin bölünmesini sağlayan otolitik enzimlerin aktivitesini kontrol eder (17,21,34,35). Teikoik asit mukozalarda bulunan özgül reseptörler

(fibronektin, fibrinojen, laminin, trombospondin, vitronektin, elastin, sialoprotein ve kollajen) ile birleşerek *S. aureus*'un konağa adherensini sağlar. İnflamatuvar hücrelerin kemotaksisini inhibe etme, antikor üretimini stimüle etme gibi virülans faktörü olarak ve hücre duvarlarının rijit ve çabuk yenilenebilir olmasında önemli rol oynar (21,34,35).

2.1.3.2.3. Protein A

S. aureus'ta üç tip stafilokokal protein A (SpA) saptanmıştır. *S. aureus*'un hücre duvarında bulunur. Kovalent olarak peptidoglikan tabakaya bağlanmıştır. Protein A'nın kemotaktik, antikomplemanter ve antifagositik etkileri vardır. IgG3 dışındaki tüm IgG ve IgA2 ile bazı IgM'in Fc reseptörlerine bağlanır. Protein A immunojeniktir. Ekstraselüler Protein A'nın antikora bağlanması aynı zamanda immün kompleks oluşumu ve sonrasında da komplemanın tüketimine neden olur. *S. aureus*'ta Protein A'nın varlığı koaglutinasyon test prosedürlerinin temelini oluşturur. Bu teknik farklı antijenlere yönelik olan antikorların nonspesifik taşıyıcısı olarak laboratuvarlarda organizmaların tanımlanması için kullanılır (10,17,21).

2.1.3.3. Toksinler

S. aureus beş farklı sitolitik veya membran hasarı yapan toksin (alfa, beta, delta, gama ve Panton-Valentin Lokosidin (PVL)), iki eksfoliyatif toksin, sekiz enterotoksin (A-G, G-I) ve toksik şok sendrom toksin-1 (TSST-1) gibi çok sayıda toksin üretebilmektedir (30).

2.1.3.3.1. Sitolitik veya Membran Hasarı Yapan Toksinler:

Sitolitik toksinler daha önceden hemolizinler olarak tanımlanmıştır ancak bu yanlış bir tanımlamadır. Alfa, beta, delta, gama toksinin etkisi sadece kırmızı kan hücreleri ile sınırlı değildir. Sitotoksinler nötrofilleri de hemoliz ederler (30).

2.1.3.3.1.1. Alfa Toksin:

S. aureus'un bir çok suşu tarafından üretilir. İlk kez 1900'de Kraus ve Clairmont tanımlamıştır. Hem bakteriyel kromozom hem de plazmid tarafından kodlanabilen 33.000 Da polipeptidten oluşur. Bu toksin, kan damarlarındaki düz kasları, eritrosit, lökosit, hepatosit ve trombositleri parçalar. Monositler bu toksine dirençlidir. Memeli hücrelerinde porlar oluşturarak inflamatuvar yanıtı indükler. Por oluşumunu takiben, hücreden hızlı bir şekilde K⁺ atılımı ve

hücreye Na⁺, Ca²⁺ ve diğer küçük moleküllerin alımı gerçekleşir. Sonuçta hücrelerde şişme ve parçalanma meydana gelir. Eritrositler alfa-toksine en duyarlı hücrelerdir. Potansiyel nörotoksindir, subkutan olarak verilirse nekroza yol açar. Koyun kanlı agarda üreyen bazı *S.aureus* kolonilerinin etrafında gözlenen β - hemoliz zonundan bu toksin sorumludur (30,31,32).

2.1.3.3.1.2.Beta toksin

Sfingomyelinaz C olarak da adlandırılan 35 kD'lık ısıya duyarlı bir proteindir. İlk kez 1935'te Glenny ve Stevens tarafından tanımlanmıştır. Beta hemolizin sfingomiyelin ve lizofosfotidilkolin için spesifiteye sahiptir ve eritrosit, fibroblast, lökosit ve makrofajları da içeren çoğu hücre için toksiktir. Alfa hemolizinle birlikte stafilokokal hastalıkların karakteristik özelliği olan abse formasyonu oluşumundan ve doku yıkımından sorumludur (17,21,36).

2.1.3.3.1.3.Delta toksin

Bu toksin koagülaz negatif stafilokokların % 50-70'inde ve *S.aureus* suşlarının % 97'sinden fazlası tarafından üretilen 3 kD'lık bir polipeptittir. İlk kez 1947'de Williams ve Harper tarafından tanımlanmıştır. Nispeten ısıya dayanıklıdır. Antijenik özelliği yoktur. Eritrositleri ve diğer memeli hücreleri olduğu kadar, hücre içi membran yapılarını da etkileyen geniş spektrumlu sitolitik aktiviteye sahiptir. Delta hemolizin kısmi nonspesifik membran toksisitesi ile deterjan benzeri etki göstererek, hücre membranında porlar oluşturur. Ayrıca adenilat siklazı aktive ederek cAMP salınımına neden olur (17,21,29,37).

2.1.3.3.1.4.Gamma Toksin:

İlk kez 1938' de Smith ve Price tarafından tanımlanmış, Mollby Wadstron tarafından elde edilmiştir. Gama toksin ve PVL bikomponent toksinlerdir. S (slow eluting proteins) ve F (fast eluting proteins) olmak üzere iki polipeptid zincirinden oluşurlar. Altı S protein (LukSPV, LukE, LukM, HlgA, HlgC, LukSI) ve 5 F protein (LukFPV, LukD, LukF'PV, HlgB, LukFI) tanımlanmıştır. Bu toksinlerin nötrofil, makrofaj lizisi ve hemolitik aktiviteleri vardır. Por oluşumunu takiben permeabilite artışı ve osmotik geçirgenliğin bozulması sonucu hücre lizisi gerçekleşir(29,31,32,38).

2.1.3.3.1.5.Panton – Valentin Lökositidin (PVL)

Panton-Valentin lökositidini (PVL), insan polimorfonükleer hücreleri ve lökositler üzerindeki özgül litik aktivitesiyle por oluşturarak lökositlerin yıkımına ve doku nekrozuna yol açar. PVL'ini kodlayan genler, Prevost ve arkadaşları tarafından klonlanıp, sekanslanarak *lukS-PV* ve *lukF-PV* olarak adlandırılmıştır. PVL toksini lökotoksiktir, ancak hemolitik etki göstermez. Hastane ortamında saptanan MRSA suşlarının en az % 5'inde saptanırken toplum kökenli MRSA suşlarının tamamında saptanmaktadır (30,32,39).

2.1.3.3.2.Eksfoliyatif Toksinler

İlk kez 1971'de bulunan toksin Eksfoliyatif toksin A (ETA) ve Eksfoliyatif toksin B (ETB) olmak üzere 24 kDa ağırlığında iki proteinden meydana gelen bir toksindir. Stafilokokal enfeksiyonların veziküler ve eksfoliyatif deri lezyonlarından (Stafilokokal haşlanmış deri sendromu) sorumludur. *S.aureus* türlerinde toksin üretiminin prevalansı coğrafik çeşitlilik göstermekle birlikte genellikle % 5-10'dan azdır. Bu iki protein biyokimyasal ve immünolojik olarak farklıdır, fakat biyolojik aktiviteleri birbirine benzer. ETA ısıya dirençli ve kromozomal iken, ETB ısıya duyarlı ve plazmid kaynaklıdır. Ortak özellikleri süperantijen olmaları ve proteolitik aktiviteye sahip olmalarıdır. Epidermiste stratum granulozum tabakasındaki hücreler arasındaki bağlanmayı sağlayan desmoglein I'ı parçalarlar. Sonuçta stratum granulozum derinin alt tabakalarından ayrılır. ETA ve ETB'den her ikisini veya sadece birini salgılayan *S.aureus* suşları stafilokokal haşlanmış deri sendromu (SHDS)'na neden olur. Toksinin sitolitik ve inflamasyon oluşturuucu etkisi yoktur. Bu yüzden lezyonlarda bakteri ve lökosit görülmez. Epidermisin toksin ile karşılaşması sonrasında, koruyucu nötralizan antikorlar gelişir. Stafilokokal haşlanmış deri sendromu, küçük çocuklarda daha sık görülür, yetişkin ve büyük çocuklarda nadir görülür (30,37,38).

2.1.3.3.3.Enterotoksin

S.aureus'ta 8 farklı enterotoksin (A-E, G-I) ve enterotoksin C'nin 3 subtipi tanımlanmıştır. Bütün *S.aureus* suşlarının % 30-50'si bu toksinleri üretmektedir. Enterotoksinler 100 °C'de 30 dakika ısıtmaya ve gastrik-jejunal enzimlerle hidrolize dirençlidir. Bu nedenle besin maddesi bir kere enterotoksin üreten stafilokoklarla kontamine olduktan sonra, yiyeceğin

tekrar ısıtılması veya sindirim süreci, besin zehirlenmesi oluşumunu önlemez. Stafilokoklar ile kontamine olmuş (dondurma, et gibi) besinlerin alınmasından sonra 2-8 saatte kusma görülür, bazen ishal de bu tabloya eşlik edebilir. Enfeksiyon 24-48 saatte kendini sınırlar ve yalnızca destek tedavisi yeterlidir. Enterotoksin A hastalıkla en fazla ilişkisi olan toksindir. Enterotoksin C ve D kontamine süt ürünlerinde bulunmuştur. Enterotoksin B stafilokokal pseudomembranöz enterokolit etkenidir. Belirli bir hayvan modeli bulunmadığından toksin aktivitesinin kesin mekanizması tam anlaşılamamıştır. Bu toksinler süperantijen özelliği gösterirler. T hücrelerinin ve sitokin salınımının nonspesifik aktivasyonuna neden olurlar. Mide ve jejunumdaki karakteristik histolojik değişiklikler; epitelyum ve lamina propria altında nötrofil infiltrasyonu ve jejunumda fırçamsı sınır kaybını içerir. Mast hücrelerinden inflamatuvar mediatörlerin salınımının, stafilokokal besin zehirlenmesinin özelliği olan kusmadan sorumlu olabileceği düşünülmektedir (19,27,29,40).

2.1.3.3.4.Toksik Şok Sendrom Toksini-1 (TŞST-1)

İlk kez 1978 yılında tanımlanmıştır. Kromozomal kodlanır 22.000-Da ağırlığında proteolize dayanıklı, ekzotoksindir. TŞST-1 bir süperantijendir, makrofaj ve T-lenfositlerden nonspesifik sitokin salınımının uyarılmasına neden olur. Toksik şok sendromu ateş, hipotansiyon, eritrodermi, mental konfüzyon ile karakterize multisistemik bir hastalıktır. Hastalık ilk olarak hiperabsorbant tampon kullanan kadınlarda tesbit edilmekteyken günümüzde menstrasyonla ilişkilendirilemeyen TŞS olguları artmıştır. TŞST-1 düşük konsantrasyonlarda endotelial hücrelerden sızıntıya neden olur, yüksek konsantrasyonlarda ise hücrelere sitotoksik etki gösterir. TŞS da hipovolemik şok sonucu gelişen organ yetmezliği nedeniyle ölüm meydana gelebilir. TSST-1 vajina veya yara bölgesinden mukozal bariyerlere penetre olabilir. Bu yüzden sistemik etki ile TŞS tablosuna neden olur (21,33).

2.1.3.4.Enzimler

2.1.3.4.1.Katalaz

Bu testle bakterinin katalaz enzimi içerip içermediği araştırılır. Katalaz hidrojen peroksidi oksijen ve suya parçalar. Lam üzerine bir damla % 3 lük hidrojen peroksit damlatılır, üzerine bakteri kolonisinden bir miktar alınıp konulur.

Oksijen serbestlenmesini gösteren kabarcıkların oluşması testin pozitif olduğunu gösterir. Katalaz testi stafilokok ve mikrokokların (micrococcaceae) streptokok ailesinden ayırtedilmesini sağlar. Kan içermeyen besiyerinde üreyen bakteri kolonileri ile yapılır (16,33).

2.1.3.4.2.Koagülaz

S.aureus hücre duvarında bulunan (clumping faktor-bağılı koagülaz) ve ekstrasellüler olarak salınan (stafilokinaz- serbest koagulaz) iki çeşit koagulaz enzimine sahiptir. Bağlı koagülaz salınmayan hücre duvarına bağlı bulunan bir yüzey proteindir. Bu faktör fibrinojene direkt bağlanarak fibrin ağları meydana getirir, böylece bakterinin kümeleşmesine yol açar. Serbest koagülaz ekstra sellüler olarak salınan hücre dışı bir proteindir. Plazma globulini olan coagulase reacting factor (CRF) ile birleşerek onu aktive eder, stafilotrombini oluşturur. Stafilotrombinde trombin benzeri aktivite göstererek fibrinojeni fibrine dönüştürür ve plazma pıhtılaşır. Koagülazın abse çevresinde fibrin ağı oluşturup enfeksiyonu lokalize ettiği ve bakteriyi fagositoza karşı koruduğu düşünülmekle beraber virülanstaki rolü tam anlaşılamamaktadır. Serbest koagülaz 'tüp koagülaz', bağlı koagülaz 'lam koagülaz' olarak bilinir. Tüp koagülaz testinde serum fizyolojik ile 1:5 oranında sulandırılmış tavşan plazmasına 24 saatlik kanlı agar plağında oluşmuş koloni eklenip emülsifiye edilir, 37°C lik su banyosuna bırakılarak 1,2,4,8 ve 24. saatlerde pıhtının oluşması takip edilir. Lam koagülaz için temiz bir lam üzerine iki damla saf su damlatılır, şüpheli kolonilerden alınarak bu iki damlaya karıştırılıp homojen hale getirilir. Süspansiyonların birine bir damla plazma diğerine bir damla serum fizyolojik damlatılıp elde çevirerek karıştırılır, 10-30 saniye sonra pozitif örnekte kümeleşme olur, kontrol damla homojen kalır (16,17,28).

2.1.3.4.3.Lipaz

S. aureus suşlarının tamamı koagülaz negatif stafilokokların % 30'u bir kaç farklı lipaz enzimi salgırlar. Lipitleri hidrolize ederek stafilokokların vücudun sebase dokularında barınmasını sağlayarak kutanöz ve subkutanöz dokularda yüzeysel cilt enfeksiyonu gelişmesinde rol oynarlar (17,21).

2.1.3.4.4.Hyaluridaz

Bağ dokusunun hücre olmayan matriksinde bulunan hyaluronik asidi parçalar. *S. aureus* suşlarının % 90'ından fazlası bu enzimi salgılarlar ve bakterinin bağ dokusunda yayılmasını kolaylaştırır(21,27).

2.1.3.4.5.Deoksiribonükleaz (DNaz)

Deoksiribonükleaz (DNaz) ekzo ve endonükleaz aktivitesi gösteren nükleik asitleri 3'-fosfomononükleotidlere parçalayan, bir fosfodiesterazdır. Diğer bazı türler de bu enzimi üretiliyor olabilir ancak *S. aureus* için bu enzimin üretimi önemli bir göstergedir (17,21,28).

2.1.3.4.6.Fibrinolizin

Aynı zamanda stafilokinaz olarak da isimlendirilir. Isıya dirençli olan, plazmada bulunan plazminojeni plazmine çevirerek aktive eden bir enzimdir. Hemen hemen tüm *S.aureus* türlerince üretilen fibrinolizin, dokulardaki fibrini eriterek enfeksiyonun yayılımını kolaylaştırır, virülansla ilişkili bir enzimdir (10,17,21).

2.1.3.4.7.Penisilinaz (β laktamaz)

Stafilokoklar β laktam grubu antibiyotiklere penisilinaz enzimi üreterek direnç geliştirir. Penisilin ilk kullanıma girdiği 1941'de stafilokoklar büyük oranda penisiline duyarlı iken günümüzde bakterinin salgıladığı bu enzim sayesinde % 90'ın üzerinde bir direnç mevcuttur. Yapılan immünolojik çalışmalarda *S. aureus*'un en az üç farklı tip beta laktamaz salgıladığı gösterilmiştir, direncin genetik aktarımı plazmid ve transpozonlarla gerçekleşir (29).

Tablo 1 . *Staphylococcus aureus* 'un Virulans Faktörleri (40)

a-Yapısal bileşenler

Kapsül	Kemotaksisi, fagositozu ve mononükleer hücrelerin proliferasyonunu inhibe eder, adheransı kolaylaştırır.
Peptidoglikan	Osmotik dengeyi korur, endojen pirojenlerin üretimini stimüle eder (endotoksine benzer aktivite). Lökosit kemoatraktanıdır. Fagositozu inhibe eder.
Teikoik asit	Hücre membranındaki katyonik konsantrasyonu düzenler, fibronektine bağlanır.

Protein A	IgG1, IgG2 ve IgG4'ün Fc reseptörlerine bağlanarak antikor aracılı atılımı (klirensi) inhibe eder, lökosit kemoatraktanıdır.
Sitoplazmik membran	Osmotik bariyerdir, hücre içi ve dışına transportu düzenler, biyosentetik ve solunum enzimlerini içerir.

b-Toksinler

Sitotoksinler ($\alpha, \beta, \delta, \gamma, P-V$ lökositidin)	Lökosit, eritrosit, makrofaj, trombosit ve fibroblastları içeren birçok hücreye toksik etki gösterir.
Eksfoliatif toksin (ETA, ETB)	Serin proteazlar, epidermisin stratum granulosum tabakasındaki intersellüler köprülerin ayrılmasına neden olurlar.
Enterotoksinler (A-E, G-I)	Süperantijenlerdir (sitokin salınımını ve T hücrelerin proliferasyonunu stimüle ederler); mast hücrelerinden inflamatuvar mediatörlerin salınımını uyarırlar; bulantı-kusma, intestinal peristaltizmde artma ve sıvı kaybına neden olurlar
Toksik Şok Sendrom Toksin-1	Süperantijendir. Endotelial hücrelerde sızıntı veya hücre yıkımına neden olurlar.

c-Enzimler

Koagülaz	Fibrinojeni fibrine çevirir.
Katalaz	Hidrojen peroksiti su ve oksijene katalize eder.
Hyaluridaz	Bağ dokuda bulunan hyaluronik asitin hidrolizi ve mikroorganizmanın dokuda yayılımının kolaylaştırılmasını sağlar.
Fibrinolizin	Fibrin kümesinin çözülmesini sağlar.
Lipaz	Lipitleri hidrolize eder.
Nükleaz	DNA'yı hidrolize eder.
Penisilinaz	Penisilini hidrolize eder.

2.1.4. *S.aureus*' un Neden Olduğu Enfeksiyonlar

2.1.4.1. Deri/ Mukoza ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları

S.aureus folikülit, fronkül, karbonkül, impetigo, hidradenitis süpurativa, mastit gibi deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olur. Ekzemalı ya da atopik dermatitli hastalarda sekonder cilt enfeksiyonlarına neden olur. Cerrahi yara enfeksiyonlarında *S.aureus* enfeksiyonu görülme oranı % 15-20 civarındadır. Ayrıca lokalize stafilokok enfeksiyonları selülit, lenfanjit, lenfadenit ya da nekrotizan fasiitle sonuçlanabilir (31,41).

2.1.4.1.1.Folikülit

Kıl folikülleri ve çevresinde sınırlı küçük, kırmızı ve ağrılı lezyonlardır. Sistemik semptomlar bulunmaz (10,27,29,42).

2.1.4.1.2.Fronkül

Kıl folikülünün sınırlarını aşan, özellikle yüz, boyun aksilla ve kalçalarda ağrılı, kırmızı, çevresi endürasyonlu, 1-2 cm çapında, nodüler yapıdadır. Daha sonra lezyonun orta kısmı sarı bir renk alarak kendiliğinden veya cerrahi insizyonla açılır ve pürülan materyal ortaya çıkar. Otoinokülasyonla çevresinde yeni lezyonların oluşmasına yol açar (10,27,42).

2.1.4.1.3.Karbonkül

Birçok kıl folikülünü bir arada tutan, özellikle boyunda deri altı dokulara ilerleyen, daha sonra birden fazla sinüsle dışarı açılan daha büyük lezyonlardır. İyileşmeleri sonrasında sert skar dokusu kalır. Ateş, halsizlik, titreme ile birlikte gidebilir, bakteriyemiye neden olabilir. Bu kişiler sıklıkla *S.aureus* burun taşıyıcısıdır (10,42).

2.1.4.1.4.İmpetigo

Özellikle çocuklarda görülen yüzeysel bir deri enfeksiyonudur. Kırmızı bir makül şeklinde başlar, bu alan üzerinde ortaya çıkan veziküller hızla rüptüre olur, sarımsı bir krut tabakasıyla kaplanır. Skar bırakmadan iyileşir. Sistemik semptomlar görülmez (10,27,29,42).

2.1.4.1.5.Süpüratif Hidraadenit

Apokrin ter bezlerinin süpüratif enfeksiyonudur. Aksilla, perine ve genital bölgede çok sayıda fronküle benzer lezyonlar görülür. Lezyonlar kendiliğinden drene olur. Hipertrofik skar dokusu ile iyileşir (29,42).

2.1.4.1.6.Mastit

Emziren annelerin % 1-3'ünde doğum sonrası ikinci ve üçüncü haftalarda görülür (10,29,42).

2.1.4.1.7.Yara Enfeksiyonları

Cerrahi yara enfeksiyonları ikinci veya ileriki günlerde, ödem, eritem ve ağrı ile ortaya çıkar. Ateş sıklıkla görülür. Deri enfeksiyonları hızla yayılarak sellülit, lenfanjit, lenfadenit ve hatta nekrotizan fasiit'e neden olabilir (29,42).

2.1.4.2. Sistemik Enfeksiyonlar

2.1.4.2.1. Kemik ve Eklem Enfeksiyonları

S.aureus'un travma veya penetran yaralanmalar sonrasında kemik ve eklem dokusuna direkt inokulasyonu enfeksiyona neden olur. Lokalize olarak başlayan enfeksiyon hematogen yayılarak osteomyelit veya septik artrit şeklinde görülebilmektedir. *S.aureus* osteomyelit vakalarının % 50–70 kadarından sorumludur. Çocuk ve erişkin nongonokokal septik artritlerde en sık sorumlu etken *S.aureus* olup, erişkinlerde genelde romatoid artrite sekonder olarak gelişmektedir (10,25,42-45).

2.1.4.2.2. Solunum Sistemi Enfeksiyonları

Toplum kökenli *S.aureus* pnömonisi daha çok viral alt solunum yolu enfeksiyonlarından sonra, immünsuprese, diyabet ve alkolizm gibi predispozan faktörlere sahip hastalarda görülmüştür. Hastane kökenli *S.aureus* pnömonisi ise aspirasyon veya entübasyon ile ilişkili olarak meydana gelmekte ve pulmoner enfeksiyon, abse oluşumu ve plevral ampiyem gibi lokal komplikasyonlara yol açabilmektedir (25,37,42,46) . *S.aureus* pnömonisi ilk olarak İnfluenza'nın bir komplikasyonu olarak tanımlanmıştır. 1918 İnfluenza pandemisi kayıtlarında genç bireylerdeki ölümlerin çoğu *S.aureus*'un neden olduğu süper enfeksiyonlar ile ilişkilendirilmiştir.

S.aureus toplumdan kazanılmış pnömonilerin % 10'undan, hastanede kazanılmış pnömonilerin ise % 20–30'undan sorumludur (46,51).

2.1.4.2.3. Endokardit

Akut bakteriyel endokarditin en sık nedeni *S.aureus*'dur. Bakteriyel endokardit olgularının % 20-30'unda etken stafilokoklar, bunların da % 80-90'ında etken *S.aureus*'dur. *S.aureus* bakteriyemisinin en ciddi komplikasyonlarından biri infektif endokardittir. Romatizmal kalp hastalığı, intravenöz ilaç kullanımı, diyaliz, intravasküler protez, yaşlı hastalarda kapak sklerozu *S.aureus* endokarditi için predispozan faktörlerdir. Mitral veya aort kapak tutulumlarında mortalite % 40'lara kadar varmaktadır (47-49).

2.1.4.2.4. Bakteriyemi

Bakteriyemi lokalize enfeksiyonlara sekonder (abse, yanık, pnömoni gibi) veya direkt olarak kateter, diğer cerrahi girişimler veya intravenöz ilaç bağımlılarında enjektör kullanımına bağlı olarak gelişebilir. *S.aureus* bakteriyemisi; hastane kaynaklı ve toplum kaynaklı bakteriyemi şeklinde iki grupta ele alınabilir. Hem toplum hem de hastane kökenli bakteriyemiler, uygun antibiyotik tedavisine rağmen yüksek morbidite ve mortaliteye sahiptir (17,25,28,43,50).

2.1.4.2.5. Menenjit

S.aureus'a bağlı menenjit olguları genellikle, lokal kafa travmaları veya girişimleri bakteriyemilerin komplikasyonu ya da intratekal şantlara bağlı olarak gelişmektedir (17,21).

2.1.4.3. Toksinlere Bağlı Olarak Gelişen Enfeksiyonlar

2.1.4.3.1. Stafilokokal Besin Zehirlenmesi

Enterotoksin B ve diğer enterotoksinlerle ısıya dirençlidir, kaynatma veya pişirme ile inaktive olmazlar. Bu toksinlerle kontamine gıdaların yenilmesi sonucu besin zehirlenmesi meydana gelir. Uygun olmayan koşullarda saklanmış sütü tatlılar, dondurma, konserveler, etli gıdalar, patates salatası besin zehirlenmesine en sık neden olan gıdalardır. 2–6 saatlik inkübasyondan sonra bulantı, kusma, abdominal kramplar ve ishal bulguları ile hastalık başlar. Karakteristik olarak ateş ve nörolojik bulgusu yoktur. Semptomlar genellikle 8–10 saatte kendiliğinden düzelir ve prognozu iyidir (17,21,36,43).

2.1.4.3.2. Stafilokokkal Haşlanmış Deri Sendromu

İlk kez 1878 yılında Alman doktor Baron Gotfried Ritter Von Rittershain tarafından tanımlanmıştır. “Ritter’in hastalığı” olarakta anılmaktadır. Ciltte geniş büllöz lezyonlar ve süperfisiyal deri katmanında soyulma meydana gelir. Genelde neonatal ve infantlarda görülür. Ciddi sıvı elektrolit kaybı sonucunda hipovolemi ve % 1–10 oranında ölüm görülür. Lezyonda *S.aureus* gösterilemez. Toksin antijenik olduğundan oluşan antikorlar koruyucudur (17,21,25,28,37,52,53).

2.1.4.3.3. Toksik Şok Sendromu (TŞS)

Toksik şok sendromu ilk kez 1978’de Todd tarafından tarif edilmiştir. Multisistem bulgulu klinik bir tablodur. Ateş, titreme, baş dönmesi, baş ağrısı, kusma, hipotansiyon, diyare, eritroderma ve konjunktivit meydana gelir. Bu multisistem hastalığı kadınlarda menstruasyon sırasında tampon kullanımı ile ilişkilendirilmiştir. Bazı vakalarda menstruasyonla ilişkisi olmayan toksik şok sendromu gözlenmiştir. Menstruasyonla ilişkisi olmayan toksik şok sendromunun *S.aureus* enfeksiyonu sonucu oluşan sellülit, abse, lenfadenit, sinüzit, trakeit, pnömoni, ampiyem, artrit ve osteomyelit gibi klinik tablolar ile görülebileceği de bildirilmiştir (25,28,44,54,55,56).

2.1.5.Staphylococcus Aureus’ta Antimikrobiyal Direnç

2.1.5.1.S.aureus 'ta penisilin direnci

Stafilokokkal hücre, peptidoglikan olarak tanımlanan, 20-40 nm kalınlığında ağısı bir yapıyla çevrilidir. Bu yapı, N-asetilmuramik asit (NAM) ve N-asetilglukozamin (NAG) rezidülerinden oluşan bir polimerdir. Her bir NAM rezidüsüne kök peptid olarak adlandırılan bir pentapeptid zinciri tutunmaktadır. Peptidoglikan tabakadaki glikan zincirleri, bir kök peptiddeki L-lizin rezidüsüne ve diğer bir kök peptiddeki D-alanin rezidüsüne tutunmuş olan pentaglisin çapraz köprüsünün son glisin rezidüsü aracılığıyla birbirine bağlanmaktadır. Glisin rezidülerini kök peptidlerin L-lizin rezidülerine bağlayan pentaglisin çapraz köprüleri sitoplazmada oluşturulur. Çapraz peptid köprülerinin oluşumu veya transpeptidasyon reaksiyonu ise sitoplazmik membranın dış yüzeyinde gerçekleşir ve penisilin bağlayan proteinler (PBP) tarafından katalize edilir. Yüksek moleküler ağırlıklı PBP’lerin, biri transpeptidasyonda (çapraz

bağlanma), diğeri transglikozilasyonda (glikan zincirinin uzaması) rol oynayan iki protein“domain”i bulunmaktadır. Penisilin ve diğeri beta-laktam antibiyotikler, kök peptidin terminal D-alanil-D-alanin ucunun analogudur ve transpeptidazın aktif bölgesine bağlanmak üzere yarışarak PBP’lerin transpeptidasyon “domain”ini ve düşük moleküler ağırlıklı PBP’lerin karboksipeptidaz aktivitesini inhibe edip, çapraz bağlanmayı engeller. Peptidoglikan tabakada çapraz bağlanmanın gerçekleşmemesi mekanik olarak zayıf bir hücre duvarı, sitoplazmik içeriğin hücre dışına kaçıışı ve hücrenin ölümü ile sonuçlanır (57-60). *S.aureus*’ta bir beta-laktamaz olan penisilinaz enzimi yapımına bağlı penisilin direnci ilk kez 1944 yılında bildirilmiştir. Beta-laktamaz, genellikle bir plazmid üzerinde taşınan indüklenabilir bir gen olan *bla* tarafından kodlanmaktadır. Penisilinaz, penisilini ve diğeri penisilinaza duyarlı bileşikler inaktif penisiloid aside parçalayan, salınabilir bir enzimdir. *bla* geninin, *blaRI* ve *blaI* olmak üzere iki regülatör determinantı bulunmaktadır. *blaRI*, membran reseptörünü kodlarken, *blaI*, gen represörünü kodlamaktadır. Penisilin varlığında, membran *blaRI* reseptörünün ekstraselüler parçası, intrasitoplazmik parçasının otokatalitik ayrışımını tetikler. Açığa çıkan intrasitoplazmik peptid bir metalloproteinaz gibi davranır, bir represör olan *blaI*’yı ayrıştırarak gen ekspresyonu üzerindeki baskıyı kaldırır ve beta-laktamaz sentezinin gerçekleşmesiyle beta-laktam direnci gelişir. Penisiline dirençli *S.aureus* suşlarının izole edildiği olgular başlangıçta sınırlı sayıda ve sadece hastane kaynaklı iken, dirençli suşların rastlanma sıklığı zaman içinde artmış ve toplum kaynaklı enfeksiyonlardan da izole edilmeye başlanmıştır. Günümüzde, hastane veya toplum kökenli *S.aureus* izolatlarının % 80’i penisilinaz üreten suşlardır (61).

2.1.5.2.Metisilin Direnci

Metisilin duyarlı *S.aureus*’larda (MSSA), beş tane penisilin bağlayan protein (PBP) bulunmaktadır. MRSA izolatlarında ise bunlara ek olarak PBP2a veya PBP2’ olarak adlandırılan 78 kDa ağırlıkta olan farklı bir PBP sentezlenmektedir. PBP2a beta-laktam yapısındaki antibiyotiklere karşı düşük afinite gösterir. Dolayısıyla beta-laktam grubu antibiyotiklerin varlığında, yüksek afiniteli PBP’lerin fonksiyonunu görerek peptidoglikan sentezini devam ettirir (62). PBP2a, 2.1 kb büyüklüğünde olan *mecA* geni tarafından kodlanır. *mecA* geninin ekspresyonu *mecR1* ve *mecI* genleri ile kontrol edilir. *mecR1* geni, sinyal dönüştürücü (signal transducer) bir protein olan MecR1’i, *mecI* geni de represör bir protein olan MecI’yi kodlamaktadır. Beta-laktam grubu antibiyotik ortamda yokken MecI, hem *mecA* hem de *mecR1* genlerinin transkripsiyonunu inhibe eder (63,64). MecR1, transmembran yerleşim gösteren bir

proteindir. Ortamda bulunan beta-laktam yapısındaki antibiyotikleri hücre dışı yerleşim gösteren penisilin bağlayan domaini sayesinde algılar ve otomatik olarak parçalanır. Bunun sonucunda sitoplazmik yerleşim gösteren metalloproteaz domaini aktif hale dönüşür. Metalloproteaz, *mecA* geninin operatör bölgesine bağlı bulunan MecI'yi parçaladıktan sonra *mecA* geninin operatör bölgesine bağlanarak *mecA*'nın transkripsiyonuna yol açar. Hem *mecR1* ve *mecI* geni, IS1272 veya IS431 insersiyon dizileri nedeniyle delesyona uğrayabilirler ki bu da *mecA* geni üzerindeki baskının ortadan kalkması ile sonuçlanır (63-66). *mecA* geni, bakteri kromozomunda stafilokokal kaset kromozomu *mec* (*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*; *SCCmec*) üzerinde yer alır. *S.aureus* izolatlarında *SCCmec* kaseti, her zaman *attB_{sc}* (*bacterial chromosomal attachment site*) olarak adlandırılan kromozomal bölgeye entegre olur. *attB_{sc}*, fonksiyonu bugün için tanımlanmamış olan *orfX* (*open reading frame X*)'in 3' ucunda yerleşim gösterir(67). *SCCmec* kasetinin büyüklükleri 20 kb'dan, 67 kb'a kadar değişkenlik gösterir. *mecA* ise yaklaşık olarak 2 kb büyüklüğünde olup *SCCmec* elementinin küçük bir bölümünü oluşturur (68).

Kaset kromozom rekombinaz (*cassette chromosome recombinases*; *ccr*) ve *mecA* gen komplekslerinde görülen yapısal değişikliklere göre bugün için tanımlanmış 11 farklı (Tip I-XI) *SCCmec* tipi bulunmaktadır. Bunlar arasında sadece *SCCmec* tip II ve III, çoklu antibiyotik direncine yol açan plazmid (pUB110, pI258, pT181) ve transpozonları (Tn554, ΨTn554) içermektedir. pUB110 plazmidi, ant(4') genini taşır ve kanamisin, tobramisin ve bleomisine karşı direnci sağlar. pI258, penisiline ve civa gibi ağır metallere karşı dirençten sorumludur. pT181 ise tetrasiklin direncine yol açar. Tn554 transpozonu *ermA* genini taşır ve konstitütif ve indüklenabilir makrolid, linkozamid ve streptogramin direncinden sorumludur. ΨTn554 ise kadmiyum direncini sağlar (63,65,69).

Stafilokokal kaset kromozom *mec* (*SCCmec*), *mec* gen kompleksi, *ccr* gen kompleksi ve junkyard ya da joining regions olarak adlandırılan J bölgesi olmak üzere üç bölgeden meydana gelir. *S.aureus*'larda tanımlanan *SCCmec* elemanlarının büyük bir bölümü (*orfX*)J3-mec-J2-*ccr*-J1 şeklinde kompozisyon gösterir. *SCCmec* tip VII ve tip IX bu durumun dışında kalır. *SCCmec* tip VII'de *ccr* gen kompleksi J3 ile J2 arasında, *SCCmec* tip IX'da ise *mec* gen kompleksi J2 ve J1 arasında yerleşim gösterir. *SCCmec* kasetleri *ccr* gen kompleksi ve *mec* gen kompleksi farklılıklarına göre tiplere, J bölgesindeki farklılıklara göre de alttiplere ayrılmaktadır (64,67,69). *SCCmec* kasetinde bulunan *ccr* genleri, *S.aureus* genomuna *SCCmec* entegrasyonundan ve ayrılmasından sorumludur. *S.aureus* genomunda open reading frame'in 3' ucuna *SCCmec*

kasetinin entegrasyonunu sağlar. *S.aureus* izolatlarında *ccrA*, *ccrB* ve *ccrC* olmak üzere 3 farklı *ccr* geni bulunmaktadır. DNA dizi analizleri % 50 benzerlik gösterir. *ccr* gen kompleksleri, tanımlandıkları tarih sırasına göre numaralandırılırlar. Bugüne kadar iki farklı grup tanımlanmıştır. Bunların birisi ardışık *ccrA* ve *ccrB* genlerini içerirken diğer grup *ccrC* genini içermektedir. *ccr* genlerinde görülen allel farklılıklarına göre tip 1 (*ccrA1B1*), tip 2 (*ccrA2B2*), tip 3 (*ccrA3B3*), tip 4 (*ccrA4B4*), tip 7 (*ccrA1B6*), tip 8 (*ccrA1B3*) ve tip 5 (*ccrC*) olmak üzere 7 farklı allotip tanımlanmıştır (67,70,71,).

mec gen kompleksi ise *mecA* ve onun regülatuar genleri ile insersiyon dizilerinden meydana gelir. Sınıf A *mec* gen kompleksi (*mecI-mecR1-mecA-IS431*) prototipi oluşturur ve *mecA*, *mecR1*, *mecI* genleri ile *mecA* geninin aşağısında bulunan değişken bölge (hypervariable region [HVR]) ve IS431 adlı insersiyon dizisini içerir. Sınıf A *mec* gen kompleksi ve diğer *mec* gen kompleksleri arasındaki fark, IS1272 ve IS431 IS elemanlarının *mecA* regülatuar genlerinin bulunduğu bölgeye insersiyonları sonucunda *mecI*'nin tamamıyla delesyona uğraması ve *mecR1*'in ise kısmi delesyona uğraması sonucunda ortaya çıkar. Sınıf B *mec* gen kompleksi (IS1272-Δ*mecR1-mecA-IS431*), sınıf A *mec* gen kompleksinden farklı olarak *mecA* geninin yukarısına IS1272'nin insersiyonu sonucunda delesyona uğramış *mecR1* genini bulundurmaktadır. Sınıf C *mec* gen kompleksi (IS431-Δ*mecR1-mecA-IS431*), ise *mecA* geninin yukarısına IS431'nin insersiyonu sonucunda delesyona uğramış *mecR1* genini içerir. Bugüne kadar C1 ve C2 olmak üzere 2 farklı sınıf C *mec* kompleksi tanımlanmıştır. Sınıf C1 *mec* gen kompleksinde *mecA* geninin yukarısına yerleşim gösteren IS431, *mecA* geninin aşağısında yer alan IS431 ile aynı yönde bulunur. Sınıf C2 *mec* gen kompleksinde ise *mecA* geninin yukarısında bulunan IS431, *mecA* geninin aşağısında yer alan IS431 ile ters yönde yerleşim gösterir. Sınıf D *mec* gen kompleksi sadece *S.caprae*'de bulunur. Son olarak 2010 yılında sığırdan izole edilen LGA251 adlı *S.aureus* izolatının DNA dizi analizi sonucunda *blaZ-mecA_{LGA251}-mecR1_{LGA251}-mecI_{LGA251}* yapısı gösteren Sınıf E *mec* gen kompleksi tanımlanmıştır (65,67,69).

SCC*mec* elemanları *mec* ve *ccr* gen kompleksleri dışında junkyard ya da joining regions olarak adlandırılan J bölgelerini içerir. Bu bölgede antimikrobiyal direnç determinantları bulunabilmektedir. J1, sağ kromozomal bağlantısı ile *ccr* gen kompleksi arasında, J2, *ccr* gen kompleksi ile *mec* gen kompleksi arasında ve J3, *mec* gen kompleksi ile sol kromozomal bağlantısı arasında yer alır. J bölgelerinde yer alan farklılıklara göre SCC*mec* alttipleri tanımlanmaktadır (65,69).

Günümüzde SCCmec kaynağı hâlâ bilinmemektedir. *S.aureus*'un *S.sciuri*'den bu elementi kazandığı düşünülmektedir. Hayvanlarda kommensal olarak bulunan *S.fleuretti*'den kazanıldığına dair görüşler de bulunmaktadır. *S.sciuri*'de *mecA* geni bulunur ancak gen ekspresyonu gerçekleşmediği için metisilin duyarlıdır. *S.fleuretti* metisilin dirençlidir ve MRSA N315 izolatu ile % 99.8 oranında nükleotit benzerlik göstermektedir. Bu son bulgular *mecA* kaynağının *S.sciuri*'den ziyade *S.fleuretti* olabileceğini düşündürmektedir (67,72,73).

Tablo 2. *S.aureus* suşlarında tanımlanmış olan SCC mec tipleri

SCCmec tipi	ccr gen kompleksi	mec gen kompleksi	izolatlar
I	1 (A1B1)	B	NCTC10442, COL
II	2 (A2B2)	A	N315, Mu50, Mu3, MRSA252, JH1, JH9
III	3 (A3B3)	A	85/2082
IV	2 (A2B2)	B	CA05, MW2, 8/6-3P, 81/108, 2314, cm11, JCSC4469, M03-68, E-MRSA-15, JCSC6668, JCSC6670
V	5 (C2)	C2	WIS(WBG8318), TSGH17, PM1,
VI	4 (A4B4)	B	HDE288
VII	5 (C1)	C1	JCSC6082
VIII	4 (A4B4)	A	C10682, BK20781
IX	1 (A1B1)	C2	JCSC6943
X	7 (A1B6)	C1	JCSC6945
XI	8 (A1B3)	E	LGA251

2.1.5.2.1. Metisilin Direnç Fenotipini Etkileyen Diğer Faktörler

Metisilin direncinin fenotipik olarak ortaya konması bakteriler arasında değişkenlik göstermektedir. MRSA suşlarının hepsi PBP2a oluşturmalarına rağmen, metisilin direnci değişik derecelerde ortaya çıkmaktadır ya da bir başka şekilde ifade etmek gerekirse, metisilin direnci, homojen ve heterojen olmak üzere iki farklı fenotip olarak görülmektedir (74,75).

Homojen dirençte, hücrelerin hepsi yüksek konsantrasyondaki metisilin varlığında üreyebilme özelliği göstererek yüksek düzeyde direnç ortaya koyarlar. Heterojen dirençte ise, o bakteri topluluğunda bulunan tüm hücreler *mecA* genini taşımalarına rağmen bu topluluğun sadece belirli bir kısmında metisilin direnci görülür. Heterojen direnç gösteren MRSA topluluğunda, hücrelerin çoğunluğu (% 99.9 veya daha fazlası) düşük metisilin konsantrasyonlarına (1-5 µg/ml) duyarlı iken, 10^2 ile 10^8 'de bir sıklıkta olmak üzere hücrelerin bir kısmı yüksek metisilin konsantrasyonlarına ($\geq 50\mu\text{g/ml}$) direnç göstermektedir (74,75).

Heterojen direnç gösteren suşlar, NaCl veya sükrözlu besiyeri kullanılması, düşük sıcaklıkta inkübasyon gibi bazı özel kültür koşullarının sağlanması durumunda homojen direnç gösterir hale gelirler. Farklı ortam koşullarına göre direncin ortaya konulmasında meydana gelen bu değişiklik, geçicidir ve tamamen fenotipiktir. Bu durumdan da anlaşılacağı gibi, metisilin direncinin fenotipik olarak ortaya konulmasının regülasyonu oldukça karışıktır (12).

2.1.5.2.1.1. Beta Laktamaz Plazmidi

Beta-laktamaz enzimi, *blaZ* adlı gen tarafından kodlanır. *blaZ*, *blaR1* ve *blaI* olmak üzere iki gen tarafından kontrol edilir. *blaI* geni, beta-laktamaz geninin transkripsiyonunu inhibe eden BlaI proteinini kodlar. *blaR1* geni ise transmembran yerleşim gösteren BlaR1 proteininin sentezinden sorumludur. BlaR1, beta-laktam yapısındaki bir antibiyotiğin ortamda bulunması durumunda ona bağlanır ve hücre dışından hücre içine sinyal iletimini sağlayarak beta-laktamaz enziminin sentezinin başlamasına yol açar. Yani beta-laktamaz enzimiyle ortaya çıkan direnç indüklenebilir bir dirençtir. *blaZ-blaR1-blaI* sistemi *mecA-mecR1-mecI* sistemiyle benzerlik gösterir. Dolayısıyla, *blaR1* ve *blaI* genlerinin, aynı zamanda metisilin direncinin fenotipik olarak ortaya konmasında da rol aldığı düşünülmektedir. Beta-laktam yapısındaki antibiyotik ile indüksiyon yapıldığında, *blaR1-blaI* sisteminin uyarılması, *mecR1-mecI* sisteminden daha hızlı olmaktadır (Beta-laktamaz ekspresyonu 15 dakika, *PBP2a* yapımı 48 saat). Yani beta-laktam yapısındaki antibiyotik ortamda bulunduğunda *PBP2a*'nın eksprese edilmesi çok yavaş olmaktadır (74-77).

Metisilin dirençli *S.aureus*'ların çoğunda *blaZ*-regülatuar sistemini taşıyan plazmidin bulunması ve *mecR1-mecI* sisteminin defektif olması nedeniyle *mecA* geninin esas olarak *blaZ*-regülatuar sistemiyle indüklendiği düşünülmektedir. Ancak beta-laktamaz genlerini taşıyan plazmid, alıcı hücreye verildiğinde *PBP2a* yapımı konstitütif halden indüklenebilir hale geçmekle

birlikte, *PBP2a* konsantrasyonu ya da direncin indüklenebilir olma durumu ile direnç profili arasında bir ilişki kurulamamıştır. *PBP2a* yapımı konstitütif olabilir ama suş heterojen direnç gösterebilir. Bu da metisilin direncinin fenotipinin belirlenmesinde başka faktörlerin de yer aldığını göstermektedir (75,77).

2.1.5.2.1.2. Fem Faktörleri

Konstitütif ya da indüklenebilir olsun olmasın, *PBP2a* miktarı ile ortaya çıkan metisilin direnç fenotipi (homojen-heterojen) arasında bir ilişkinin gösterilememesi metisilin direncinin ortaya konulmasını etkileyen olası diğer faktörlerin arayışına girilmesine yol açmıştır. Transpozonlarla inaktivasyon yoluyla metisilin dirençli suşlardan duyarlı suşlar elde edilmesi, *mec* dışındaki genlerin tanımlanmasına yol açmıştır. *mec* bölgesi dışında bulunan bu genler, “auxiliary” veya “factors essential for the expression of methicillin resistance” ya da kısaca “fem” genleri olarak tanımlanmıştır. *fem* faktörleri, *mec* A geninden farklı olarak hem duyarlı hem de dirençli suşlarda bulunmaktadır. Bugüne kadar *femX* (*fmbB*), *femA*, *femB*, *femC*, *femD*, *femE* ve *femF* olmak üzere farklı *fem* genleri tanımlanmıştır. Günümüzde *femE* dışındaki genlerin fonksiyonları belirlenmiştir. *fem* faktörleri, hücre duvar sentezinin değişik basamaklarında rol alırlar. Örneğin *femA*, *femB* ve *femX* (*fmbB*) çapraz bağlarda yer alan pentaglisin oluşumunda görev alırlar. Pentaglisin zincirine, FemX ilk glisini, FemA 2 ve 3. glisini, FemB de 4 ve 5. glisini ekler. Dolayısıyla *fem* mutantlarında hücre duvarının peptidoglikan yapısında değişiklikler meydana gelir (74,75,77,78).

2.1.5.2.1.3. Otolitik Aktivite

Homojen metisilin direnci gösteren izolatların heterojen direnç gösterenlere kıyasla daha düşük otolitik aktivite gösterdiği görülmüştür. Bugün için fonksiyonu tanımlanmamış, 38 kDa büyüklüğünde bir protein sentezleyen *llm* geninin inaktivasyonu sonucunda otolizde artış görülmektedir. Yapılan çalışmalarda *llm* mutant suşlarda metisilin direncinde azalma olduğu saptanmıştır (74,75,77,79)

2.1.5.2.1.4. Çevresel Koşullar

Tuz konsantrasyonu, pH, besiyerinin içeriği, ozmolarite ve ortam sıcaklığı gibi çevresel faktörler de metisilin direncini etkilemektedir. Yüksek tuz konsantrasyonu ve düşük sıcaklık gibi bazı koşulların hücre otolizisindeki değişikliklerle ilişkili olduğu düşünülmüştür. Örneğin ortama

% 4 NaCl'ün eklenmesi, PBP2a miktarını arttırmamasına rağmen, direncin eksprese edilmesini arttırmaktadır. Yüksek tuz konsantrasyonunun ya da 30°C'de inkübasyonun, otolizini inhibe ederek etki gösterdiği düşünülmektedir (75,77,79).

2.1.5.2.2. Metisilin Direncinin Belirlenmesi

2.1.5.2.2.1. Disk Difüzyon Yöntemi

Oksasilin Disk Difüzyon Yöntemi

MRSA izolatlarını saptamak için 1 µg oksasilin diski kullanılır. Bakteri süspansiyonu 0,5 McFarland bulanıklığa ayarlanır ve Mueller-Hinton agar (MHA)'a ekim yapılarak 35°C de 24 saat inkübe edilir. CLSI önerilerine göre inhibisyon zon çapı ≥ 13 mm ise duyarlı, 11-12 mm ise orta duyarlı, ≤ 10 mm ise dirençli olarak kabul edilir (113).

Sefoksitin Disk Difüzyon Yöntemi

30 µg sefoksitin diski kullanılmaktadır. Aynı şekilde bakteri süspansiyonu 0,5 McFarland bulanıklığa ayarlanır ve Mueller-Hinton agar (MHA)'a ekim yapılarak 35 °C'de 24 saat inkübe edilir. CLSI tarafından belirlenen direnç sınır değerlerine göre inhibisyon zon çapı ≥ 22 mm ise duyarlı, ≤ 21 mm ise dirençli olarak kabul edilir (113).

2.1.5.2.2.2.Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

Bu yöntemde %2 NaCl içeren katyon katkılı Mueller-Hinton sıvı besiyeri (CAMHB) kullanılır. inokulum miktarı 5×10^5 CFU/ ml olmalıdır ve 35 °C'de 24 saat inkübasyon önerilir. Antibiyotik olarak oksasilin tercih edilmektedir. MİK değeri ≤ 2 µg/ml ise duyarlı, ≥ 4 µg/ml ise dirençli olarak kabul edilir (113).

2.1.5.2.2.3.Agar Tarama Yöntemi

Bu yöntemde, 6 µg/mL oksasilin ve % 4 NaCl içeren MHA kullanılır. Bakteri süspansiyonu 0.5 McFarland bulanıklığa ayarlanarak ekim yapılır, 24 saat 35°C'de inkübe edilir. Herhangi bir koloni üremesi halinde test edilen suş metisiline dirençli olarak kabul edilir. Testin duyarlılık ve özgüllüğü oldukça yüksektir (113).

2.1.5.2.2.4.E-Test Yöntemi

Prensip olarak E-test yöntemi mikrodilüsyon ve disk difüzyon yöntemlerine benzer. Antimikrobiyal duyarlılığı test etmek için ince plastik test stripleri kullanılır. Striplerin alt yüzeyinde antimikrobiyal konsantrasyonlar kademeli olarak bulunur. Üst yüzeyi ise konsantrasyon indeksi veya ölçek ile işaretlenmiştir. Disk difüzyon testine benzer şekilde agar bakterisi inoküle edilir ve stripler yerleştirilir. Bir gece inkübe edilir ve strip etrafındaki elips şeklindeki inhibisyon zonu incelenir. Elipsin E-test sribini kestiği nokta MİK olarak belirlenir (114).

2.1.5.2.2.5.Lateks Aglutinasyon Yöntemi

Lateks aglutinasyon testleri PBP2a'nın lateks ile kaplanmış monoklonal antikorlar ile reaksiyon vermesi esasına dayanır. Kısa bir sürede sonuç verir. Koloni süspansiyonundan PBP2a ekstraksiyonu yapıldıktan sonra lateksle kaplanmış olan monoklonal antikorlarla aglutinasyon tesbit edilir (76).

2.1.5.2.2.6.Kromojenik Besiyerleri

Kromojenik besiyerleri hem seçici hemde ayırt edici besiyerleridir. MRSA saptanması için birçok kromojenik besiyeri bulunmaktadır. İçerisindeki ayıraçlar sayesinde farklı koloni renkleri oluşturarak tür ayrımı yapılmasına olanak sağlarlar. Bir kısmında seçici antibiyotik olarak sefoksitin bulunurken bir kısmında oksasilin bulunmaktadır. Ancak oksasilin kolay bozulabildiği ve sefamisinler PBP2a'yı daha iyi indüklediği için sefoksitin içeren besiyerleri daha çok kullanılmaktadır. Besiyerine ekim yapıldıktan 24 saat sonra MRSA kolonileri renkli görünümüleri ile kolaylıkla ayırt edilebilir. Özgüllüğü yüksektir, bu yüzden 24 saatte doğrulama yapılmasına gerek yoktur. İnkübasyon 48 saate uzatılırsa özgüllük düşer, ayrıca MRSA saptanmasına katkısı da çok azdır (115).

2.1.5.2.2.7.Moleküler Yöntemler

MRSA saptanmasında bir çok PCR tabanlı testler tanımlanmıştır. Bu testler PBP2a'yı kodlayan *mecA* geni ile *S.aureus*' a özgü *nuc*, *coa*, *sa442*, *femA*, *femB* gibi genleri tesbit eden multipleks PCR testleridir (115).

Zhang ve arkadaşları 2004 yılında stafilokok türüne özgü 16S rRNA, *S.aureus* 'a spesifik *nuc* genini, metisilin direncini tesbit etmek için *mecA* genini ve mupirosin direnci için *mupA* genini hedef alan bir primer ve kuadripleks PCR yöntemini geliştirmişlerdir. Bu yöntem *S.aureus*

KNS ayrımını yaparken aynı zamanda metisilin direncini ve MRSA taşıyıcılarının tedavisinde kullanılan mupirosin direncini de belirlemektedir. Yöntemin özgüllüğü ve duyarlılığını % 100 bulmuşlardır (116).

Günümüzde doğrudan sürüntü örneklerinden MRSA saptanmasına imkan sağlayan gerçek zamanlı PCR testleri de tanımlanmıştır. Bu testler klasik PCR yöntemine göre daha hızlı ve daha az kontaminasyon riski taşımaktadır. FDA (Food and Drug Administration) onaylı iki gerçek zamanlı PCR testi bulunmaktadır; GeneOhm MRSA (Becton Dickinson) ve GeneXpert (Cepheid). Bu testlerde *mecA*'yı taşıyan *SCCmec* elemanının çevresindeki *S.aureus*'a özgü diziler hedeflenmektedir. Cepheid GeneXpert *SCCmec* insersiyon bölgesi olan *AttBSc* bölgesini, GeneOhm MRSA ise *SCCmec*'in 3' ucundaki *orfX* bölgesini saptamaktadır. Bu testlerden GeneXpert, özel eğitilmiş bir teknisyen olmaksızın herhangi bir laboratuvarda uygulanabilirken, GeneOhm MRSA ancak eğitilmiş teknisyenlerce uygulanabilecek bir testtir. Ayrıca GeneOhmMRSA yönteminde *S.aureus orf X* ile bazı *Staphylococcus epidermidis orf X* bölgelerinde benzerlik olması nedeniyle yalancı pozitif sonuçlar olabilir. Her iki testin maliyeti de yüksektir. GenoType MRSA Direct (Hain Life Science, Nehren, Almanya) diğer bir ticari moleküler yöntemdir. Bu test hedef olarak *SCCmec* I-IV'un amplifiye edildiği bir revers hibridizasyon testidir. Sonuçlar 6-7 saatte çıkmaktadır (115,117). Bu yöntemlerin dışında PNA-FISH ve Evigene MRSA yöntemleri de bulunmaktadır. PNA-FISH (floresan in situ hibridizasyon) (AdvanDx) KNS/*S.aureus* ayrımı yapılabilen türe özgü ribozomal RNA dizilerine tutunan floresan işaretli peptid nükleik asit problemlerinin kullanıldığı bir yöntemdir. Kan kültüründe üreme saptandıktan ve gram boyalı preparatlarda gram-pozitif kok görüldükten sonra uygulanabilen bir yöntemdir. Ayrıca Evigene MRSA (AdvanDx) ile kuyucuklara kaplanmış problemler ve sinyal amplifikasyon yöntemi ile kısa sürede sonuç alınabilmektedir. ELISA formatında MRSA saptanmasına olanak sağlamaktadır (115).

2.1.5.3.S.aureus'ta Vankomisin Direnci

Vankomisin, yıllar boyunca MRSA'nın neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde etkin bir şekilde kullanılmıştır. Ancak, 1997 yılında Japonya'dan vankomisine orta düzey dirençli ilk *S.aureus* suşu ("vancomycin intermediate resistant *S.aureus* [VISA]") (MİK=8 µg/mL) bildirilmiştir. Bu ilk bildirimin ardından, farklı merkezlerden de VISA olguları rapor edilmiştir. Söz konusu olgularda VISA'nın ortaya çıkışı, MRSA enfeksiyonu için uzun süredir almakta

oldukları vankomisin tedavisi ile ilişkilendirilmiştir. VISA'da direnç gelişim mekanizmasının, bakteriyel hücre duvarında kalınlaşma, buna bağlı olarak vankomisinin hücre duvarının dış yüzeylerinde yakalanarak sitoplazmik membrandaki asıl hedeflerine ulaşamaması olduğu düşünülmektedir. VISA suşlarında hücre duvarı kalın ve düzensizdir. Peptidoglikan biyosentezinde değişiklik, çapraz bağ sayısında azalma vardır. Çapraz bağ sayısı daha az olduğundan serbest D-ala-D-ala rezidülerinin miktarı daha fazladır. Vankomisinin serbest D-ala-D-ala rezidülerine bağlanmasıyla, asıl hedeflerine ulaşmasındaki inhibisyonun orta düzey dirence neden olduğu kabul edilmektedir. VISA suşlarının endojen mutasyon veya antibiyotik baskısına bağlı seleksiyon sonucunda ortaya çıkmış olabileceği düşünülmektedir. Vankomisine dirençli ilk *S.aureus* ("vancomycin resistant *S.aureus* [VRSA]") (MİK=64 µg/mL) izolatı 2002 yılında bildirilmiş ve sonrasında farklı merkezlerden VRSA izolatları rapor edilmeye başlanmıştır. VRSA'da direncin ortaya çıkmasından sorumlu mekanizmanın, vankomisine dirençli enterokokun ("vancomycin resistant enterococci" [VRE]) *vanA* genini içeren Tn1546 transpozonunun entegre olduğu konjugatif plazmidin *S.aureus*'a transferi olduğu düşünülmektedir. Vankomisin, sentezlenmekte olan peptidoglikan zincirinin terminal D-alanin-D-alanin rezidülerine bağlanarak bakteriyel hücre duvar sentezini inhibe etmektedir. *vanA* geni varlığında D-alanin-D-alanin yerine, vankomisinin afinitesinin çok düşük olduğu D-alanin-D-laktat sentezlenmekte ve bu durumda vankomisin direnci ortaya çıkmaktadır. "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" tarafından *S.aureus* için 2007 yılında belirlenen direnç sınır değerlerine göre vankomisin MİK değeri ≤ 2 µg/mL olan izolatlar vankomisine duyarlı; vankomisin MİK değeri 4-8 µg/mL olan izolatlar VISA; vankomisin MİK değeri ≥ 16 µg/mL olan izolatlar ise VRSA olarak kabul edilmektedir (57,61).

2.1.6.Epidemiyoloji

1990'lı yıllarda başlamak üzere hastane kaynaklı MRSA (Hospital acquired MRSA) enfeksiyonlarının yanı sıra toplum kaynaklı MRSA (*Community acquired MRSA*;) enfeksiyonları görülmeye başlanmıştır. Toplum kaynaklı-MRSA, ilk kez 1982 yılında Savoralatz ve ark. tarafından intravenöz ilaç kullanıcılarında tanımlanmıştır. Daha sonra 1993 yılında Udo ve ark. tarafından Batı Avustralya yerlilerinde tanımlanmıştır. Ancak toplum kaynaklı-MRSA'lara dikkatlerin çekilmesi 1997-1999 yılları arasında Minesota ve Kuzey Dakota'da olmak üzere ABD'de dört sağlıklı çocukta toplum kaynaklı-MRSA izole edilmesi ile gerçek-

leşmiştir. Bu çocuklarda septik artrit, bakteriyemi, septik şok ve nekrotizan pnömoni gibi ciddi enfeksiyonlar görülmüş ve bu enfeksiyonlar ne yazık ki ölümle sonuçlanmıştır (12). Bunu takip eden yıllarda toplum kaynaklı-MRSA enfeksiyonlarının görülme sıklığında ülkeler arasında farklılıklar ortaya çıkmıştır. Son yıllarda ABD’de toplum kaynaklı-MRSA enfeksiyonlarında ciddi artışlar meydana gelmiştir. Avrupa’da ise halen düşük oranlarda toplum kaynaklı-MRSA görülmekle birlikte Danimarka ve İsveç gibi ülkelerde tüm MRSA’lar içindeki toplum kaynaklı-MRSA oranı artış göstererek % 29-56 gibi yüksek rakamlara ulaşmıştır. Prevelans erişkinlere oranla çocuklarda daha yüksektir. Örneğin Tayvan’da çocukluk çağı enfeksiyonlarında toplum kaynaklı-MRSA oranı 1999-2000 yılında % 9.8 oranında saptanırken 2004-2005 yılında % 56 olarak tespit edilmiştir (22,81-83).

Toplum kaynaklı MRSA izolatlarının moleküler mikrobiyolojisi hastane kaynaklı -MRSA’lardan oldukça farklılık gösterir. Hastane kaynaklı -MRSA izolatlarında, genellikle tip I, II veya III *SCCmec* genetik elemanı bulunmaktadır. Toplum kaynaklı-MRSA izolatlarında ise yüksek oranda tip IV ve tip V *SCCmec* genetik elemanı bulunmaktadır. Düşük oranlarda (< % 5) olmak üzere tip I, tip II ve tip III *SCCmec* taşıyan toplum kaynaklı-MRSA izolatları da saptanmıştır. Hastane kaynaklı -MRSA izolatlarında da nadir de olsa tip IV *SCCmec* görülebilir. Örneğin ST5 *pediatrik* klonunda ve İngiltere’de en sık görülen klon olan ST22 (EMRSA-15)’de tip IV *SCCmec* bulunmaktadır. Dolayısıyla tip IV *SCCmec* saptanması toplum kaynaklı-MRSA için bir gösterge değildir (65,84 ,85).

Toplum kaynaklı MRSA izolatlarında bulunan ve bakterinin virülansında rol oynayan bir toksini kodlayan bir diğer önemli gen *Panton-Valentine leukocidin* (*PVL*) genidir. *PVL*, önemli bir virülans faktörü olup invaziv deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ile nekrotizan pnömoni ile ilişkili bulunmuştur. Toplum kaynaklı-MRSA izolatlarının tümünde *PVL* geni bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalarda toplum kaynaklı-MRSA izolatlarının % 40-90’ında *PVL* geni saptanmıştır(12).

Toplum kaynaklı MRSA klonları hastane kaynaklı -MRSA’lardan farklılık gösterir. Örneğin ABD’de yapılan çalışmalarda, toplum kaynaklı-MRSA enfeksiyonlarının genellikle USA300 [ST8-IV, PVL(+)] ve USA400 [ST1-IV, PVL(+)] olmak üzere 2 pulstotip ile meydana geldiği, hastane kaynaklı MRSA enfeksiyonlarının ise başlıca USA100 [ST5-II] ve USA200 [ST36-IV] pulstotipleriyle oluştuğu saptanmıştır. Dolayısıyla toplum kaynaklı-MRSA’ların hastane kaynaklı -MRSA’lardan bağımsız olarak toplum kaynaklı-MSSA’lardan geliştiği düşü-

nlmektedir. Genetik farklılıkların yanı sıra toplum kaynaklı-MRSA'lar, hastane kaynaklı -MRSA'lardan oluşturdukları enfeksiyonlar açısından da farklılık gösterir. Toplum kaynaklı-MRSA'lar genellikle cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları (apse, follikülit vb) ile pnömoniye yol açarken, hastane kaynaklı -MRSA'lar solunum yolu enfeksiyonları, kan dolaşımı enfeksiyonları ve cerrahi yara enfeksiyonları gibi klinik tablolara yol açarlar (84,86).

Bunun yanı sıra toplum kaynaklı-MRSA epidemiyolojisi oldukça heterojen bir yapıya sahiptir. Bazı bölgelerde tek klon hakimiyeti görülürken (r:ABD'de USA300), Avustralya'da olduğu gibi (> 100 klon) bazı bölgelerde birden fazla klon görülmektedir. ABD'de toplum kaynaklı-MRSA izolatlarının > % 85'i USA300 pulsotipidir. Batı Avrupa'da ise ST80 (Avrupa klonu) klonu baskındır. Doğu Asya'da ise baskın olan klon ST59-V (Tayvan klonu)'dir. Bunun yanı sıra ST30-IV (*Southwest Pacific klonu*) de sık olarak görülmektedir. ST30-IV klonu Güney Amerika kıtasında ve Avustralya'da da baskın olan klondur. Toplum kaynaklı-MRSA izolatları tip IV ya da tip V *SCCmec* kaseti taşımaktadır. Tip V, genellikle Asya ya da Avustralya'dan izole edilen suşlarda saptanırken, ABD ve Avrupa'dan izole edilen suşlarda nadiren görülmektedir (12,63,84).

Son yıllarda toplum kaynaklı-MRSA izolatları özellikle ABD ve Tayvan'da olmak üzere hastanelere girmeye başlamıştır. Örneğin ABD'de USA300 izolatları artık hastane kaynaklı enfeksiyonlara yol amaya başlamıştır. San Francisco'dan yapılan bir çalışmada toplum kaynaklı-MRSA izolatlarının % 78.5'i USA300, % 12.1'i CC5 olarak saptanırken, hastane kaynaklı -MRSA izolatlarının % 43.4' USA300, % 40.8'i CC5 olarak belirlenmiştir. ABD'de 11 şehirde hastanelerin acil servislerinde yapılan bir çalışmada MRSA izolatlarının % 98'inin toplum kaynaklı-MRSA olduğu saptanmıştır. Yine Atlanta'da bir hastanede MRSA bakteriyemilerinin % 28'sinden USA300 izolatlarının sorumlu olduğu tespit edilmiştir (86,87). Bunun yanı sıra toplum kaynaklı-MRSA izolatları, Hollanda, Danimarka, Norveç gibi hastane kaynaklı-MRSA prevelansı düşük olan ülkelerde son yıllarda görülmeye başlayan MRSA prevelansındaki artışın sebeplerinden biri olarak görülmektedir (63,85,88). Örneğin Faria ve ark.(27)'nin 2005 yılında Danimarka'da yaptıkları bir çalışmada MRSA klinik izolatlarının büyük bir bölümünün toplum kaynaklı-MRSA izolatları olduğu saptanmıştır.

Yakın zamanda önem kazanan bir diğer konu çiftlik hayvanlarıyla ilişkili MRSA (*Livestock MRSA*; *LA-MRSA*) izolatlarıdır. Çiftlik hayvanları ile ilişkili MRSA izolatları özellikle domuzlarda ve sığırılarda saptanmıştır. CC398 klonunda yer alan bu izolatlar tip V *SCCmec*

taşırlar. Bu izolatlarda *PVL* bulunmaz. CC398 klonunda yer alan LA-MRSA izolatları ilk kez 2003 yılında insanlarda da saptanmıştır. MRSA CC398 izolatları en sık Avrupa ülkelerinde görülmektedir. Avrupa’da görülen MRSA izolatları içinde MRSA CC398 oranı bölgesel farklılıklar gösterir. Hollanda, Belçika ve Danimarka olmak üzere bazı ülkelerde daha sık izole edilmektedir. Örneğin Hollanda’da MRSA izolatlarının % 20’sini ST398 oluşturmaktadır. Özellikle domuz çiftlikleri başta olmak üzere hayvan çiftliklerinde çalışan bireylerde daha sık rastlanmaktadır. MRSA pozitif olarak belirlenen domuz çiftliklerinde çalışan bireylerde % 23-38 oranında kolonizasyon saptanmıştır. Aynı zamanda CC398 pozitifliğinin yüksek olduğu bölgelerde başta sağlık merkezlerinde olmak üzere MRSA epidemiyolojisi de etkilenmektedir. Örneğin Almanya’da domuz çiftliklerinin yoğun olduğu bir bölgede yer alan bir hastanede bu durum MRSA insidansında üç kat artışa yol açmıştır. Dolayısıyla MRSA CC398’in hastanelere taşınması, bu suşların nozokomiyal yayılımıyla sonuçlanabilir (12,81,82,85,88).

1961 yılında İngiltere’de izole edilen ilk MRSA suşu, *SCCmec* tip I içermektedir. Bu MRSA klonu bugün için *Archaic* klonu olarak bilinir ve 1960’larda tüm dünyaya yayılan klonudur. 1982 yılında *SCCmec* tip II taşıyan N315 suşu Japonya’da izole edilmiştir. Bu klon *New York-Japonya* klonu olarak adlandırılır ve tüm dünyada yaygın olarak bulunur. Bundan üç yıl sonra *SCCmec* tip III taşıyan 85/2082 adlı suş Yeni Zelanda’da tanımlanmıştır. 1990’lı yıllara gelindiğinde ise *SCCmec* tip IV taşıyan klonlar görülmeye başlanmıştır. *SCCmec* tip V ise ilk kez 2004 yılında Avustralya’da *WIS* olarak adlandırılan izolatta gösterilmiştir. Bunu takip eden yıllarda *SCCmec* tip VI, VII, VIII, IX, X ve XI tanımlanmıştır (12).

Günümüzde MRSA tüm dünyada yaygın olarak görülmekte olup, prevelansı ülkeler arasında farklılık göstermektedir. *EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System)* 2008 verilerine göre Avrupa’da MRSA oranları ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir. Avusturya, Lüksemburg ve Slovenya’da MRSA direnci % 10’un altında saptanmıştır. Belçika, Çekoslovakya, Fransa, Almanya, Macaristan, Polonya ve İsviçre’de direnç % 10 ile % 25 arasında saptanırken Hırvatistan, Bulgaristan, İngiltere, İrlanda, İspanya, İtalya, Kıbrıs, Romanya, Türkiye ve Yunanistan’da % 25 ve üzerinde direnç tespit edilmiştir. Malta ve Portekiz’de ise bu oran % 50’lere ulaşmıştır. Hollanda, Danimarka ve İsveç olmak üzere Kuzey Avrupa ülkelerinde MRSA prevelansı % 2’in altındadır. Son yıllarda Fransa, İngiltere, Avusturya, İrlanda ve Yunanistan gibi bazı Avrupa ülkelerinde hastane kaynaklı MRSA prevelansında düşüş saptanırken diğer Avrupa ülkelerinde görülen direnç oranları hemen hemen aynı kalmıştır. Çin ve

Afrika ülkelerinde % 25-50 oranlarında direnç saptanmaktadır. Amerika’da ve bazı Asya ülkelerinde ise bu oran % 50’lere ulaşmıştır. Özellikle Sri Lanka (% 86.5), Güney Kore (% 77.6), Vietnam (% 74.1), Tayvan (% 65), Tayland (% 57) ve Hong Kong (% 56.8) olmak üzere Doğu Asya’da yüksek oranlarda metisilin direnci görülmektedir. Ülkemizin de dahil olduğu Akdeniz ülkelerinde görülen antibiyotik direncinin ortaya konulduğu ARMed çalışmasından elde edilen verilere göre *S.aureus* kan izolatlarındaki metisilin direnç oranı 2003-2005 yılları arasında sırasıyla % 43, % 40 ve % 35 olarak tespit edilmiştir. SENTRY çalışmasında da Türkiye’de görülen MRSA oranının % 30.9 olduğu saptanmıştır (12) .

Günümüzde MRSA epidemiyolojisinin araştırılmasında birçok yöntem kullanılmaktadır. Bunlardan multilokus dizi tiplendirmesi (*Multilocus sequence typing*; MLST) *S.aureus*’un klonal yayılımını gösteren en iyi yöntem olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemde, yedi housekeeping genin (*arcC*, *aroE*, *glpF*, *gmk*, *pta*, *tpi*, *yqiL*) DNA dizi analizi yapılır. Yedi housekeeping genden beşinde benzerlik saptanırsa izolatlar aynı klonal komplekste (CC) yer alır. MLST analizi sonucunda incelenen bu yedi gende nokta mutasyonları sonucunda görülen farklılıklara göre sekans tipleri (ST) tanımlanmaktadır. İdentik allel profiline ve *SCCmec* kasetine sahip olan izolatlar aynı MRSA klonu olarak kabul edilmektedir. Aynı genetik soyda yer alan izolatlar ST tipi, direnç fenotipi ve *SCCmec* tipine göre sınıflandırılmaktadır (*ST-MRSA/MSSA- SCCmec*) (63,69).

Klonal kompleks 8’in bir üyesi olan ST8-MSSA, *Archaic* klonu olarak bilinen ilk MRSA izolatının (ST250-MRSA-I) atası olarak belirlenmiştir. Sadece *yqiL* geninde meydana gelen bir nokta mutasyonu ST8’i ST250’den ayırır. Tüm dünyada önemli enfeksiyonlara yol açmış olan ST8’de yer alan MSSA izolatları zaman içinde *SCCmec* tip I, II ve IV kasetlerini kazanarak metisilin dirençli hale gelmiştir. ST250 ile ilişkili olan bir diğer klon ise 1980’li yıllarda ortaya çıkan *Iberian* (ST247-MRSA-I) klonudur. ST250 ile ST247 arasında tek fark *gmk* geninde olan nokta mutasyonudur. Brezilya-Macaristan klonu (ST 239-MRSA-III) da CC8 klonal kompleksinde yer alır (63,65,80).

Yapılan çalışmalarda majör MRSA klonları, CC5, CC8, CC22, CC30 ve CC45 ile ilişkili bulunmuştur. Güney Avrupa, ABD ve Güney Amerika’dan olmak üzere 3000 izolatın analizi sonucunda izolatların yaklaşık % 70’i *Iberian* (CC8 [ST247-MRSA-IA]), *Brezilya* (CC8 [ST 239-MRSA-III]), *Macaristan* (CC8 [ST239-MRSA-III]), *New York-Japonya* (CC5 [ST5-MRSA-II]) ve *pediatrik* (CC5 [ST5-MRSA-IV]) klonları olmak üzere 5 majör pandemik klona

ait olduğu görülmüştür. Tüm dünyada en sık saptanan klonlar CC5 ve CC8'dir. Bu klonlar birçok ST içerirler. Dünyanın farklı bölgelerinde ve farklı ülkelerde birbirinden farklı ST'ler görülmektedir. CC30-ST36 ABD'de ve İngiltere'de yaygın olarak saptanmaktadır. CC45 ise ABD ve Avrupa ülkelerinde, CC8, CC5 ve CC22 Asya'da en sık görülen MRSA klonlarıdır. Latin Amerika'da CC5 (ST5), CC8 (ST239) ve CC30 MRSA klonları bulunmaktadır. Türkiye'den yapılan çalışmalarda ise ülkemizde ST239 klonunun hakim olduğu görülmüştür(12).

Zaman içinde ülkelerde ve hastanelerde görülen klonlar değişim göstermiştir. Örneğin Macaristan'da görülen ST239-MRSA-III yerini ST5-MRSA-II ve ST228 MRSA-I almıştır. Yine Japonya'da 1990'lı yılların başında görülen ST5-MRSA-II klonu yerine ST-30-MRSA-IV klonu görülmeye başlanmıştır (63).

MRSA izolatları tüm beta-laktamlar ve tedavide kullanılan diğer antibiyotik sınıflarına da dirençli olduğu için, yeni antibiyotiklerin devreye girmediği uzun yıllar boyunca glikopeptid antibiyotikler (vankomisin ve teikoplanin) tek tedavi seçeneği olarak kalmıştır. Vankomisine duyarlılığı azalmış (vancomycin intermediate *S.aureus*; VISA) olan ilk izolatlar 1997 yılında Japonya'dan bildirilmiştir. Bu ilk bildirim, çeşitli ülkelerde yapılmış ve benzer yöntemlerle azalmış duyarlılığı ortaya koyan diğer çalışmalar izlemiştir. VISA fenotipinin tam mekanizması bilinmemekle birlikte, *S.aureus* düzenleyici genlerdeki mutasyonlara bağlı olarak, bu suşlarda hücre duvarının kalınlaştığı, duvardaki çapraz bağ sayısının azaldığı ve bu kalınlaşan duvarın ortamdaki vankomisin moleküllerini sitoplazmik membranın iç yüzeyindeki esas hedefleri olan yeni prekürsörlere ulaşmadan tükettiği üzerinde durulmaktadır. Hücre duvarının katmanları arasında biriken vankomisin molekülleri ayrıca adeta bir tıkaç gibi davranarak yeni ilaç moleküllerinin geçişine de izin vermemektedir. VISA fenotipi özellikle agr II varlığı ile ilişkili olarak CC5 klonal soyunda görülmektedir (89). Ülkemizde de bu konuda çeşitli bildirimler vardır. Oranlar % 0-6 arasında değişmektedir (90,105,119). Populasyon analizi ile % 18'e ulaşan azalmış duyarlılık bildirilmiştir (119). Ancak MiK değerleri 0.125-4 mg/L olarak bildirilen bu h-VISA suşlarının klinik önemine ait yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.

VISA suşlarının klinik önemi tartışılırken, 2002 yılında ABD'de bir VRE suşundan bir MRSA suşuna vanA operonunun aktarılmasıyla ilk klinik VRSA suşu bildirilmiştir. VRSA gelişmesi için vanA gen kümesini içeren Tn 1546'nın stabil olarak bir stafilokok plazmidine

aktarılması gereklidir. Günümüze kadar bu tip raporların sayısı az olduğu için stabil aktarımın pek sık olmadığı söylenmektedir (89).

ABD’inden şu ana kadar VRSA ile enfekte en az yedi hasta bildirilmiştir. VRSA’lu ilk olgu 2002 yılında Michigan’da diabetes mellitus, periferik arter hastalığı ve kronik renal yetmezliği bulunan bir hemodiyaliz hastasından bildirilmiştir. Bakteri hem kateter çıkış yeri sürüntü kültüründen, hem de yeni enfekte olduğu düşünülen kronik ayak ülserinden izole edilmiştir. Hastanın ayak ülserinden aynı zamanda VRE suşu da izole edilmiş olup, her iki suşun *vanA* geni DNA sekans diziliminin benzer olduğu gösterilmiştir. Hastanın çevresel kültürleri ve vücut bölgelerinin tarama sonuçları çapraz bulaşı gösterebilecek bir kültür pozitifliğini ortaya koymuştur. VRSA suşunun ikinci izolatu 2002 yılında Pennsylvania’dan bildirilmiştir. Bu bakteri olası osteomyeliti bulunan kronik ayak ülserli bir hastadan soyutlanmıştır. Buyyon dilüsyon yöntemi ile saptanan vankomisin MİK düzeyi 32 µg/mL olarak saptanmıştır. Kronik ayak ülser kültüründe aynı zamanda VRE de izole edilmiştir. Ancak bu hastada vankomisin kullanım öyküsü saptanmamıştır. VRSA saptanan üçüncü olgu 2004 yılında New York kaynaklıdır. Uzun süre yoğun bakım ünitesinde yatmakta olan bu hastanın idrar kültüründe VRSA izole edilmiştir. Bakterinin MİK değeri 64 µg/mL ölçülmüştür. İlk üç suş izole edildikten sonra dört olgu Michigan’da 2005-2006 yıllarında belirlenmiştir. VRSA saptanan olguların yapılan kültürlerinde VRSA ile birlikte VRE suşları da izole edilmiştir (13).

2.1.7.MRSA Tedavi Seçenekleri

Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda MRSA’nın tüm hastane enfeksiyonu etkenleri arasındaki oranı, % 10.5 ile % 37.6 arasında değişirken, izole edilen tüm *S.aureus* izolatları arasındaki oranı ise % 43 ile % 90 arasında değişmektedir (92,93). Yine ülkemizin de içinde bulunduğu toplam 4640 gram-pozitif kok izolatının dahil edildiği 12 ülkede yapılan çok merkezli bir araştırmada İrlanda’da % 54.7, İsrail’de % 46, İngiltere’de % 42.5, İtalya’da % 38.3, Fransa’da % 31.5, İsveç’te % 2.1, Türkiye’de ise % 30.9 oranında MRSA görüldüğü saptanmıştır (94). *S.aureus* izolatlarında son yıllarda giderek artış gösteren antibiyotik direnci, bu bakterilerin yol açtığı enfeksiyonların tedavisinde ciddi sorunlar yaşanmasına yol açmaktadır. Dolayısıyla bu durum günümüzde stafilokokal enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek yeni antibiyotiklerin arayışına girilmesine yol açmıştır (95).

2.1.7.1.Daptomisin

Streptomyces roseosporus'un fermentasyon ürünü olan siklik yapıda bir lipopeptittir. Klinikte ilk kez 2003 yılında kullanılmaya başlanmış, ancak iki yıl gibi kısa bir süre sonra bir olguda direnç gelişimi bildirilmiştir (96). Daptomisin, Ca^{+2} bağımlı bir aktivite gösterir. Ca^{+2} iyonları ilacın negatif yükünü azaltarak daptomisinin hücre zarıyla daha iyi etkileşim göstermesini sağlar. Daptomisinin hücre zarı bütünlüğüne DNA, RNA ve protein sentezi inhibisyonu olmak üzere birden fazla mekanizmayla etki ettiği düşünülmektedir. Hücre duvarına etki eden antibiyotiklerden farklı olarak daptomisin hücre yıkımına yol açmadan hızlı bakterisidal etki göstermektedir (91,97).

Daptomisine karşı direnç nadirdir. Spontan direnç sık değildir ve in-vitro 1×10^{-10} 'dan daha düşük hızda ortaya çıkmaktadır, ancak antibiyotik konsantrasyonunun arttığı seri pasajlarda direnç ortaya çıkarılabilir (61).

Genel olarak daptomisin gram-pozitif bakterilere karşı geniş spektrumlu bir etkinliğe sahiptir. Gram-negatif bakterilere karşı ise etkisi bulunmamaktadır. Yapılan in vitro çalışmalarda, daptomisinin stafilokok ve enterokoklarda vankomisin, linezolid ve kinupristin-dalfopristin eşit ya da bu ilaçlardan daha yüksek bakterisidal aktivite gösterdiği saptanmıştır. Gram-pozitif bakterilerle meydana gelen deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının ve MRSA dahil olmak üzere *S. aureus* izolatlarının neden olduğu bakteriyemi ve sağ kalp endokarditlerinin tedavisinde kullanılmak üzere onayı alınmıştır (97). İlacın kan-beyin bariyerini geçişi düşük düzeydedir. Gebelikte kullanımı açısından FDA'ya göre B kategorisinde yer almaktadır. Diğer antibiyotiklere direnç gösteren gram-pozitif bakterilere etki etmesi, etki spektrumunun geniş olması, hızlı ve konsantrasyona bağlı bir bakterisidal etkiye sahip olması ve direnç gelişiminin nadir görülmesi, daptomisinin en önemli özellikleri arasında yer alır (99).

CLSI kriterlerine göre MİK değeri $\leq 1 \mu\text{g/ml}$ olan izolatlar daptomisine duyarlı olarak kabul edilmektedir. *S.aureus* izolatlarında daptomisin MİK değeri $> 1 \mu\text{g/ml}$ olan yani daptomisine dirençli olan izolat sayısı halen nadir olarak saptanmaktadır. Kanada ve Amerika'da yapılan bir çalışmada, *S.aureus* izolatları arasında daptomisin direnç oranı % 0.01'den az olarak belirlenmiştir. Ülkemizden yapılan çalışmalarda ise MRSA izolatları arasında daptomisin direnci saptanmamıştır(100). Daptomisin direnç mekanizmaları henüz tanımlanmamıştır. Daptomisin direnci gösteren *S.aureus* izolatlarının bazılarında birçok genetik değişiklik belirlenmiştir. Bunlardan biri *mfrF* genidir. *mfrF* geni, lizil-fosfatidil-gliserol sentetaz enzimini kodlar ve

membran fosfolipidlerinden fosfatidil gliserolün L-lizininilasyonundan ve bu fosfolipidlerin hücre membranının dış yaprağına translokasyonundan sorumludur. Saptanan ikinci değişiklik *dltABCD* operonunun aşırı ekspresyonudur. Bu operon, teikoik asitlerin alanilasyonundan sorumludur ki bu, hücre yüzey yükünün belirlenmesine katkıda bulunur. Üçüncü mutasyon histidin kinaz genini kodlayan *ycyG* genidir ve hücre duvar döngüsünde rol alır. Dördüncü mutasyon *rpoC* ve *rpoB* genlerindedir. Bu genler RNA polimeraz alt ünitelerini kodlar. Bu genlerdeki mutasyon ile daptomisin duyarlılığı arasındaki ilişki ise henüz anlaşılamamıştır (100). Bazı çalışmalarda VISA izolatlarında daptomisin direncinin saptanması ve bu izolatlarda *mfrF* geninde mutasyon görülmemesi nedeniyle iki direncin ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Vankomisine bağlı olarak meydana gelen duvarda kalınlaşma sonucunda daptomisinin hücreye difüzyonunda azalma olabileceği fikri ortaya atılmıştır (100).

2.1.7.2. Kinupristin/ Dalfopristin

Kinupristin/dalfopristin(K/D), semisentetik streptograminler olan kinupristin ve dalfopristinin 30:70 oranında kombinasyonundan oluşan, parenteral uygulanabilen bir antibiyotiktir. 50S ribozomal alt uniteye bağlanarak protein sentezini inhibe ederek etkisini gösterir (101). Etki spektrumu oldukça geniştir. Gram-pozitif bakterilerden *Enterococcus faecium* (vankomisin, eritromisin, gentamisin dirençli suşlar dahil), MRSA, metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA), streptokoklar ve *Corynebacterium jeikeium*'a, gram-negatif bakterilerden ise *Moraxella*, *Legionella* ve *Neisseria* türlerine, *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerine ve anaerob bakterilerden *B. fragilis*, *Lactobacillus* türleri, *Propionibacterium acnes*, *C. perfringens* ve *C. difficile*'ye karşı etki göstermektedir. Özellikle çoklu ilaç direncine sahip mikroorganizmalarla meydana gelen enfeksiyonların tedavisinde kullanılması önerilmektedir (98).

İlaça karşı gelişen direnç mekanizmaları arasında; ribozoma bağlanma bölgesinin metilasyonu, ilaç modifikasyonu ve ilacın dışa atımında artma yer alır. Hedef bölgede meydana gelen değişim en sık karşılaşılan direnç mekanizmasıdır ve metilaz genleriyle (*erm*; eritromisin ribozomal metilaz) gerçekleşir. Stafilokoklarda *ermA* ve *ermC* genleri bulunmaktadır. Sentezlenen metilaz enzimleri 23S rRNA'nın beşinci kangalında bulunan A2058 noktasında adenin metilasyonuna yol açmaktadır. Ribozomda meydana gelen bu değişiklik sonucunda makrolidler, linkozamidler ve streptograminlere karşı direnç gelişir. Bu nedenle bu dirence "MLS_B direnci" adı verilmektedir. Bu direnç, transpozon ya da plazmid yoluyla bir bakteriden

diğerine geçiş gösterebilir. MLS_B direnci konstitütif ya da indüklenabilir olabilir. Konstitütif direnç durumunda makrolid, linkozamid ve streptograminlere karşı çapraz direnç görülür. İndüklenabilir direnç söz konusu olduğunda ise 14-15 üyeli makrolidlere karşı direnç görülürken, 16 üyeli makrolidlere, linkozamidlere ve streptogramine karşı direnç görülmez. Bunda rol oynayan mekanizma 14-15 üyeli makrolidlerin metilaz enziminin sentezini güçlü bir şekilde indüklemeleridir. Yapılan çalışmalarda, stafilokoklarda genellikle düşük oranda kinupristin/dalfopristin direnci saptanmaktadır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise bu oran % 0-5 arasında belirlenmiştir (100).

2.1.7.3.Linezolid

Linezolid, oksazolidinon grubunda yer alan sentetik bir antimikrobiyal ajandır. Protein sentezini başlangıç aşamasında bloke ederek bakteriyostatik etki gösterir. 50S ribozomal alt ünitesinin 23S rRNA'sına bağlanarak 30S başlama (initiation) kompleksiyle birleşir ve 70S başlama kompleksinin oluşmasına engel olur. Etki mekanizmasının farklılığından dolayı diğer protein sentez inhibitörleriyle arasında çapraz direnç görülmez. VRE, MRSA, VISA ve VRSA dahil olmak üzere gram-pozitif koklara etki göstermektedir (102,103).

Linezolidin FDA onaylı olan kullanım endikasyonları arasında MRSA'nın neden olduğu komplike yumuşak doku enfeksiyonları ve nozokomiyal pnömoniler, penisiline dirençli *Streptococcus pneumoniae* (PRSP)'nin neden olduğu toplumdan kazanılmış pnömoniler ile buna eşlik eden bakteriyemiler ve vankomisine dirençli enterokok (VRE) bakteriyemileri yer alır (98).

Son yıllarda linezolid direnci gösteren metisiline dirençli stafilokokların saptanmasına karşın, hastane ve toplum kaynaklı MRSA izolatlarında linezolid direncine nadir rastlanmaktadır. Linezolid direnci genellikle derin organ tutulumu, yabancı cihaz (foreign device) varlığı veya uzun linezolid tedavisi durumlarında saptanmıştır. Yapılan alışmalarda, ABD ve diğer ülkelerde *S.aureus* izolatlarında linezolid direnci < % 0.1 olarak belirlenmiştir. Ülkemizde yapılan çeşitli in vitro duyarlılık çalışmalarında ise MRSA izolatlarında linezolid direnci saptanmamıştır (100).

Direnç, 23S rRNA'nın beşinci kangalında meydana gelen nükleotid değişiklikleri sonucunda ortaya çıkar. *S.aureus*'larda en sık G2576T mutasyonu saptanmıştır. Bunun dışında T2500A, T2504, G2242A ve G2603T mutasyonları da tanımlanmıştır. Ayrıca ribozomal proteinlerde (L3 ve L4) meydana gelen değişiklikler de dirence yol açabilir. *S.aureus*'larda 23S rRNA'nın beş ya da altı kopyası bulunmaktadır. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar arttıkça

linezolid MİK değerlerinde artış görülmektedir. Hatta linezolid kullanım süresi ile mutasyona uğrayan rRNA gen sayısı arasında ilişki saptanmıştır (100). Bunun dışında stafilokoklarda plazmid yoluyla *cfr* geninin aktarılması sonucunda da linezolid direnci görülebilir. Cfr, 23S rRNA'nın A2503 bölgesinin metilasyonuna (ribozomal metilasyon) yol açar. Bu değişiklik sonucunda fenikol, linkozamid, oksazolidinon, plöromutilin ve streptogramin A olmak üzere beş farklı antibiyotik grubunun hedef bölgeye bağlanması engellenmiş olur. Günümüzde *cfr* geni nedeniyle linezolid dirençli *S.aureus* izolatlarıyla ortaya çıkan hastane kaynaklı salgınlar bildirilmiştir (100).

2.1.7.4.Tigesiklin

Tigesiklin (GAR-936), minosiklin türevi olup, tetrasiklinlerin yeni jenerasyonu olan glisilsiklin grubuna ait bir ilaçtır. Tetrasiklinlerin temel çekirdeğindeki dokuzuncu pozisyonda yapılan modifikasyon sonucunda ilacın etki spektrumu genişlemiş ve tetrasiklinlerde görülen direnç mekanizmalarına karşı dayanıklılık kazanmıştır. Yapısal olarak minosiklin türevi bir ilaç olmasına rağmen, minosiklin ve tetrasikline oranla ribozoma beş kat daha kuvvetli bağlanır. Bakterilerde ribozomal korunma ve efluks mekanizmaları gibi tetrasiklin direncinden sorumlu iki farklı direnç mekanizmasına karşı dayanıklı olması ilacın önemli bir özelliğidir (28,106). Tigesiklinin, bu özelliği, ilacın dokuzuncu pozisyonunda yapılan modifikasyonun sağladığı üç boyutlu engellemeye bağlanmaktadır. Ribozomun 30S alt ünitesine bağlanıp, aminoasil transfer RNA'nın hedefine bağlanmasını engelleyerek protein sentezini inhibe eder ve bakteri üremesini durdurur (104).

Tigesikline karşı direnç, dışa atım pompalarının yapımındaki artış ile ilişkilidir. Yurt dışından yapılan çeşitli çalışmalarda, *S.aureus* izolatlarında % 0-0.02 oranlarında tigesiklin direnci tespit edilmiştir. Yine İngiltere ve İrlanda'dan yapılan bir çalışmada, MRSA kan izolatları arasında % 0.4 oranında tigesiklin direnci saptanmıştır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise *S.aureus* izolatlarında tigesiklin direnci saptanmamıştır (100).

2.1.7.5.Oritavansin

Oritavansin, kloroeremomisin, 4'-kloro-bifenil-karboksialdehit ile redüktif alkilasyonu sonucu elde edilmiş semisentetik bir glikopeptiddir. Peptidoglikan biyosentezindeki transglikolizasyon aşamasını ve hücre duvar sentezini engelleyerek etki gösterir (106). Oritavansin, hızlı ve konsantrasyona bağlı bakterisidal etki gösterir. Enterokoklarda 2-4 saat,

stafilokoklarda ise 8 saat olmak üzere konsantrasyona bağı post antibiyotik etkisi söz konusudur. Gentamisin ile sinerjistik etki göstermesi nedeniyle bu ilaçla kombine kullanımı dirençli mutant gelişimini önlemektedir. Glikopeptit dirençli stafilokoklara duyarlı olan izolatlar kadar etkilidir. Bugüne kadar stafilokok izolatları arasında oritavansine direnç saptanmamıştır (97).

2.1.7.6.Telavansin

Telavansin bir lipoglikopeptiddir. Peptidoglikan zincir öncüllerine bağlanarak hücre duvar sentezinin inhibisyonu ve hücre membranı depolarizasyonu olmak üzere ikili etki mekanizmasına sahiptir (107). Stafilokoklarda ise lipit sentezini bozarak hücre membranında harabiyet oluşturma yoluyla etkili olduğu gösterilmiştir (108). MRSA, VISA, VRSA ve pnömokoklar dahil olmak üzere gram-pozitif bakterilere karşı bakterisidal etkiye sahiptir (107).

2.1.7.7.Ramoplanin

Ramoplanin, Actinoplanes türlerinden elde edilen glikolipodepsipeptiddir. Ramoplanin, vankomisininden farklı olarak bakteri duvar sentezini D-alanin- D-alanin kısmına bağlanmadan inhibe eder. Bu etkisini N-asetilglikozamil transferaz enzimini inhibe ederek göstermektedir. *E. faecium*, *E. faecalis*, *S. aureus*, KNS ve *Clostridium* türlerine karşı bakterisidal etkiye sahiptir. Ramoplanin ile diğer glikopeptid antibiyotikleri arasında çapraz direnç mevcut değildir (98).

2.1.7.8.Dalbavansin

Dalbavansin teikoplanin benzeri glikopeptid A40926'nın modifikasyonu ile elde edilir. Teikoplanin gibi dalbavansin *vanB*-pozitif enterokoklara ve stafilokoklara karşı etkilidir. Farmakokinetik profili yaklaşık yedi gündür; bu nedenle gram pozitif enfeksiyonların tedavisinde haftalık uygulamayı mümkün hale getirmektedir. Pek çok anti-gram pozitif ajandan daha etkin olduğu, komplike cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarında linezolid kadar etkin olduğu ortaya konmuştur (61).

2.1.7.9.Seftobiprol

Seftobiprol, geniş spektrumlu yeni bir sefalosporindir. Beta laktamaz dirençli parenteral bir sefalosporin olan bu ajan penisilin bağlayıcı proteinler PBP2a ve PBP2x'e karşı yüksek afinite göstermektedir. Bakterisidal etkili bir antibiyotik olan seftabiprol, diğer sefalosporinlere benzer şekilde etkinlik gösterir. MRSA, VISA, VRSA, PRSP, *E. faecalis* ve gram-negatif bakteriler

dahil olmak üzere etki spektrumu geniş bir sefalosporindir. Stafilokok ve pnömokoklardaki beta-laktam direncinden sorumlu olan sırasıyla PBP2a ve PBP2x'e yüksek afinite gösterir. Sefalosporin halkasının üçüncü pozisyonunda bulunan vinilpirolidinon bölümü PBP2a yapısına bağlanmayı sağlarken, yedinci amino grubunda bulunan aminotiadiazol bölümü ise geniş spektrumlu beta-laktamazlara dayanıklılığını arttırmaktadır. İlacın, faz 3 çalışmaları halen devam etmektedir. Yapılan çalışmalarda MRSA'nın da neden olduğu komplike cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarında vankomisinle benzer klinik sonuçlar elde edilmiştir (61,98).

2.1.7.10.İklaprim

İklaprim (AR-100 ve Ro 48-2622) yeni bir diaminopirimidin bileşiğidir. Trimetoprime benzer şekilde dihidrofolatı, tetrahidrofolata katalize eden dihidrofolat redüktaz enzimini selektif olarak inhibe eder. Başta stafilokoklar olmak üzere sadece trimetoprim dirençli suşlara karşı aktivite göstermeyip MRSA, VISA, heterojen dirençli VISA ve VRSA'lara karşı da etkinlik gösterir. İklaprim, trimetoprim, beta-laktam, makrolid, florokinolon ve glikopeptid dirençli izolatlar da dahil olmak üzere gram-pozitif bakterilere karşı geniş bir in vitro etkinliğe sahipken, gram-negatif bakterilere karşı ise sınırlı etkinlik gösterir. Gram-pozitif bakterilere karşı etkinliği, genellikle trimetoprim, linezolid, kinupristin/dalfopristin, eritromisin, klindamisin ve vankomisine eşit ya da üstün bulunmuştur. İklaprim için direnç sınır değerleri henüz belirlenmemiştir. Bugüne kadar yapılan farmokodinamik çalışmalar, iklaprimin zamana bağlı bakterisidal etki gösterdiğini düşündürmektedir (97).

3. MATERYAL VE METOD

3.1.Bakteri Suşları

Çalışmamızda retrospektif olarak Ocak 2008 - Ağustos 2013 tarihleri arasında İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilmiş çeşitli örneklerden izole edilip -80°C de stoklanmış 52 adet MRSA suşu kullanıldı.

Bu örnekler öncelikle mecA, nuc ve 16s genleri açısından moleküler olarak test edildi. MecA, nuc ve 16s genlerinin her üçü için pozitif olan suşlar metisilin dirençli *S.aureus* kabul edilerek bu suşlara vankomisin agar tarama, vankomisin mikrodilüsyon ve standart E testleri uygulandı. Vankomisin agar taramada üreyen *S.aureus* suşlarına VISA ve h-VISA yönünden popülasyon analiz profili yapıldı.

3.2.Mikrobiyolojik Kültür ve İdentifikasyon İşlemleri

Laboratuvara gönderilen çeşitli klinik örneklerden yapılan kültürlerde üreyen stafilocok şüpheli kolonilerden öncelikle Gram boyama yapılmıştır. Gram boyamada üzüm salkımı şeklinde kümeler oluşturmuş gram pozitif kok kolonileri lama yayılmış, üzerlerine % 3'lük H₂O₂ damlatılarak gaz kabarcığı oluşturan katalaz pozitif bakteriler stafilocok olarak değerlendirilmiştir. MRSA'nın tespiti için stafilocok olarak kabul edilen suşlara antibiyotik duyarlılık testi ve tüp koagülaz testi yapılmıştır. Bu suşların metisilin duyarlılığını tespit etmek için CLSI'nin önerilerine göre disk difüzyon yöntemiyle sefoksitin diski (30 µg) kullanılmıştır. Saf kolonilerden serum fizyolojik içinde 0,5 McFarland standart bulanıklığında bakteri solüsyonu hazırlanarak Mueller-Hinton besiyerine ekim yapılarak üzerine 30 µg sefoksitin diski yerleştirilip 35°C' de 24 saat normal atmosfer şartlarında inkübe edilmiştir. Sefoksitin diski çevresindeki inhibisyon zonu ≤ 21 mm olan suşlar MRSA, ≥ 22 mm olanlar MSSA kabul edilmiştir. Tüp koagülaz testi için gram pozitif, katalaz pozitif koloniler 1/4 insan plazmasına eklenerek etüvde 35 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası pıhtı oluşturan bakteriler *S. aureus*, pıhtı oluşturmayan sıvı şeklinde kalan bakteriler KNS olarak kabul edilmiştir. MRSA suşu olduğuna karar verilen suşlar sütlü besiyerinde -80 °C'de saklanmıştır. Çalışma yapılacak suşlar deepfreeze'den çıkarılarak kanlı besiyerine ekim yapıp canlandırılmaları sağlanmıştır.

3.3. Multipleks PZR İle *mecA*, *nuc* ve 16S Gen Bölgelerinin Çoğaltılması

3.3.1. DNA'nın Elde Edilmesi

Stok besiyerinden Mueller Hinton agar besiyerine ekim yapılan bakteriler 35°C'de 24 saat normal atmosfer şartlarında inkübe edildi, 500 µl steril serum fizyolojik içine bir öze dolusu bakteri eklendi. Kısa bir süre vorteksledikten sonra 15 dk sonografik işleme tabi tutuldu. Her 12 örnek için 1800 µl AVE buffer eklenerek QIAasympny cihazında otomatik DNA'nın ekstraksiyonu yapıldı.

3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Hedef Bölgenin Çoğaltılması

Amplifikasyon için kullanılan primerler

mecA-1	5'-GGGATCATAGCGTCATTATTC-3'
mecA -2	5'-AACGATTGTGACACGATAGCC-3'
nuc-1	5'-TCAGCAAATGCATCACAAACA-3'
nuc-2	5'-CGTAAATGCACTTGCTTCAGG-3'
LAB16SF	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'
LAB16SR	5'-CCGTCAATTCCTTTGAGTTT-3'

MecA-1 ve mecA-2 primerleri kullanılarak *mecA* bölgesi çoğaltıldı ve metisilin dirençlerine bakıldı. nuc1 ve nuc2 primerleri kullanılarak da koagülaz genleri gösterildi

Multipleks PZR yapmak üzere PZR karışımı;

mecA-1 1µl, mecA -2 1µl, nuc-1 1µl, nuc-2 1µl, LAB16SF 1 µl, LAB16SR 1µl, 2X Buffer 12,5 µl, coral load 2,5 µl, H2O 1,5 µl toplam karışım 22,5 µl olacak şekilde tüplere dağıtım yapıldı ve her bir örneğe 2,5 µl DNA eklendi.

Tamamlanan ana karışım daha sonra aşağıdaki şartlarda sıcaklık döngüsüne tabi tutuldu.

Denatürasyon	94° C' de 3 dk 1 siklüs
Denatürasyon	94° C' de 30 sn 35 siklüs
Bağlanma	55° C' de 30 sn 35 siklüs
Uzama	72° C' de 1 dk 35 siklüs
	72° C' de 10 dk 1 siklüs

3.3.3.DNA'nın Görüntülenmesi

Bu çalışmada PZR sonucu çıkan ürünleri incelemek için Agaroz jel elektroforezi kullanıldı. Bunun için de 3 gr agaroz ve 150 ml 10TBEX kullanılarak % 2 lik agaroz jel hazırlandı. TBE içinde agarozun kaynatılması ile hazırlanan solusyona 20 µl Etidyum bromür eklendi. Oda sıcaklığında 50°C'e kadar soğutulduktan sonra agar tablasına döküldü. Jelin bir tarafına elektroforez targağı yerleştirilip bir süre sonra katılaştıktan jelden tarak dikkatlice çıkarıldı. Jel daha sonra, içinde 1TBEX bulunan tanka yerleştirildi. Her bir örnekten 10 µl alınarak jele yüklendi. Ayrıca molekül büyüklükleri bilinen marker DNA'larda (Fermentas 1 kb ladder) örneklerle karşılaştırma yapabilmek için jelin bir yuvasına yerleştirildi. Örneklerin ve markerin jele yüklenmesinden sonra elektroforez tankı güç kaynağına bağlandı. 100 volt akım şiddetiyle 3 saat süresince verilen elektrik akımından sonra jel tanktan alınıp DNA bantları görüntülenmek üzere jel görüntü sisteminde incelendi.

3.4.Buyyon Mikrodilüsyon

Kanlı agar besiyerinde bir gece bekletilmiş kolonilerden Mueller-Hinton buyyon içine alınarak 0,5 McFarland yoğunlukta bakteri solüsyonu elde edildi. Steril distile su içinde 512 µg/ml konsantrasyonda vankomisin solüsyonları hazırlandı. Mikrodilüsyon için U tabanlı plaklar kullanıldı. Mikrodilüsyon şu şekilde yapıldı:

1. Mikroplağın 1'den 12'ye kadar olan yatay kuyucuklarına 50'er µl Mueller-Hinton buyyon eklendi.
2. 512 µg/ml konsantrasyonda vankomisinden (Liofilchem s.r.l. ROSETO D.A. (TE) ITALY) 50 µl alınarak ilk kuyucuğa konuldu. Birinci kuyucuktan 50 µl alınıp ikinciye, oradan aynı miktar alınıp üçüncüye ve bu şekilde 11. kuyucuğa kadar seri dilüsyon yapıldı. Onikinci kuyucuk pozitif kontrol olarak kullanıldı ve bu kuyucuğa antibiyotik eklenmedi. Böylece ilk 11 kuyucukta vankomisin konsantrasyonları 0,25–128 µg/ml olarak elde edildi.
3. 10 ml Mueller-Hinton broth besiyerine 50µl 0,5 McFarland bakteri süspansiyonu eklendi. Kısa bir süre vorteksledikten sonra bu süspansiyondan 50'er µl alınıp 12 kuyucuğada ilave edildi.
4. Mikroplağın üzeri steril bir plakla kapatıldıktan sonra 35 °C'de 24 saat inkübe edildi.
5. Her bir suşa ait üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon MİK olarak değerlendirildi. Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) kriterlerine göre vankomisin MİK değeri okundu.

3.5.Standart E test

Kanlı agarda bir gece bekletilmiş kültürden üreyen taze kolonilerden alınarak 0,5 McFarland bulanıklığına ayarlanmış bakteri süspansiyonu hazırlandı. Mueller Hinton agar yüzeyine yayıldı. Vankomisin E-test stripleri (Liofilchem s.r.l. ROSETO D.A. (TE) ITALY) yerleştirildikten sonra 35°C'de 24 saat inkübe edildi. MİK değerleri belirlendi ve CLSI'nın önerdiği MİK değerleriyle karşılaştırıldı. *S. aureus*'ta ≤ 2 µg/ml olanlar duyarlı, 4–8 µg/ml olanlar orta derecede duyarlı, ≥ 16 µg/ml olanlar da dirençli kabul edildi. Kontrol suşu olarak *S.aureus* ATCC 29213 kullanıldı.

3.6.Vankomisin Agar Tarama

Bu yöntem, Hastalıkların Kontrol Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention CDC) önerileri doğrultusunda 6 µg/mL vankomisin içeren beyin kalp infüzyon (BHI-V6 Oxoid) besiyerinde yapıldı. Bunun için 6 µg/ml vankomisin içeren beyin-kalp infüzyon (BHI) agar hazırlandı. Kanlı agarda bir gece bekletilmiş kültürden üreyen taze kolonilerden alınarak 0,5 McFarland bulanıklığına ayarlanmış bakteri süspansiyonu hazırlandı. Süspansiyondan 10 µl alınıp 6 µg/ml vankomisin içeren beyin-kalp infüzyon agara ekildi, 35°C'de 24 ve 48 Saat inkübe edildi. Eğer 24 saat sonra gözle görünür üreme varsa izolatlar potansiyel VISA olarak değerlendirildi. Eğer 48 saat içinde sayılabilir (1-30 CFU) üreme görülürse izolat olası hetero- VISA olarak değerlendirildi. 48 saat sonunda üreme görülmezse izolat vankomisine duyarlı olarak değerlendirildi.

Kalite kontrol suşları olarak genetik olarak van A içerdiği tespit edilen vankomisine dirençli *Enterococcus(VRE)* ve *S.aureus* ATCC 29213 (vankomisine duyarlı) kullanıldı.

3.7.Makro E Test Metod

VISA tarama yöntemi olarak makro E test yöntemi kullanıldı. İki McFarland bulanıklığına eşdeğer bulanıklıkta hazırlanan bakteri süspansiyonundan 200 µL alınarak 90 mm çapında BHI agar plaklarına yayıldı. Yaklaşık 10 dakika biyogüvenlik kabininde besiyeri yüzeyi kuruyuncaya kadar beklendi ve E test stripleri yerleştirildi. Plaklar 48 saat 35°C de inkübe edildi ve MİK değeri 8 µg/mL ve üzeri olan suşlar VISA/hVISA kabul edildi (109).

3.8. Popölasyon Analiz Profili

Bu oran daha önceden Wootton ve arkadaşlarının tanımladığı şekilde belirlenmiş ve bu yöntem, VISA ve h-VISA suşlarının belirlenmesinde altın standart olarak kabul edilmiştir. 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 dilusyonlarından 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 hVISA, ≥ 1.3 ise VISA olarak kabul edildi (110,111,112).

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

4. BULGULAR

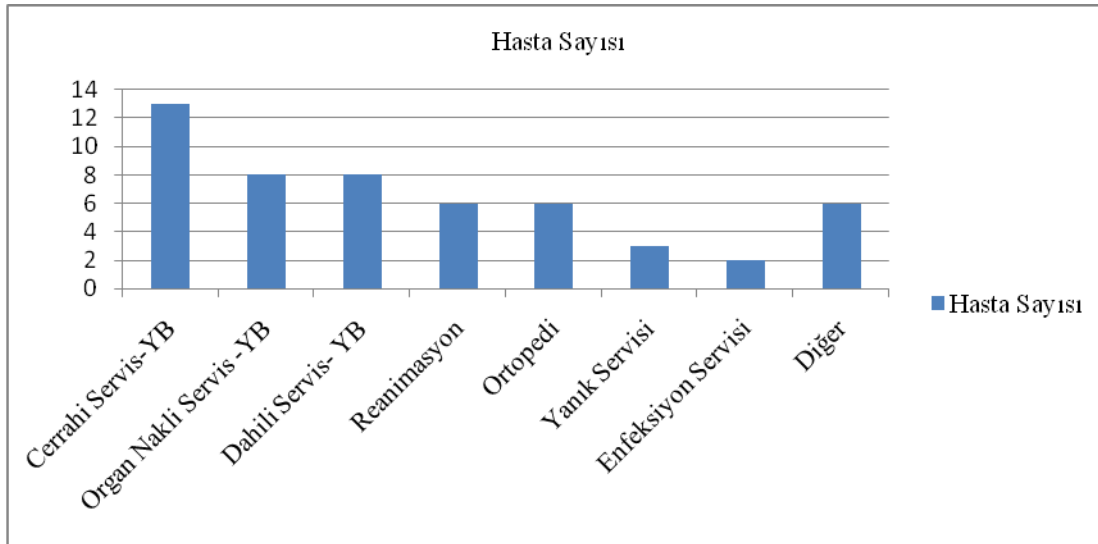
Çalışmaya alınan MRSA izolatları yara, abse, trakeal aspirat, balgam, kan, idrar, katater, burun sürüntüsü, steril vücut sıvısı, dren ve parasentez sıvısından izole edilmiştir. İzole edilen 52 MRSA suşunun izole edildiği örnek tipine göre dağılımı tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3. Örnek tipine göre MRSA suşlarının dağılımı

Örnek Tipi	Hasta Sayısı
Yara	21
Kan	15
Trakeal aspirat	9
Dren	3
Parasentez	2
İdrar	1
Katater	1
Toplam	52

Klinik örneklerden elde edilen 52 MRSA suşunun 13'ü cerrahi servis- yoğun bakım, 8'i organ nakli servis yoğun bakım, 8'i dahili servis-yoğun bakım, 6'sı ortopedi servisi, 6'sı reanimasyon servisi, 3'ü yanık ünitesi, 2'si enfeksiyon servisi, 6'sı diğer servislerden oluşmaktadır. İzole edilen 52 MRSA suşunun servislere göre dağılımı grafik 1'de verilmiştir.

Grafik 1. Servislere göre MRSA suşlarının dağılımı

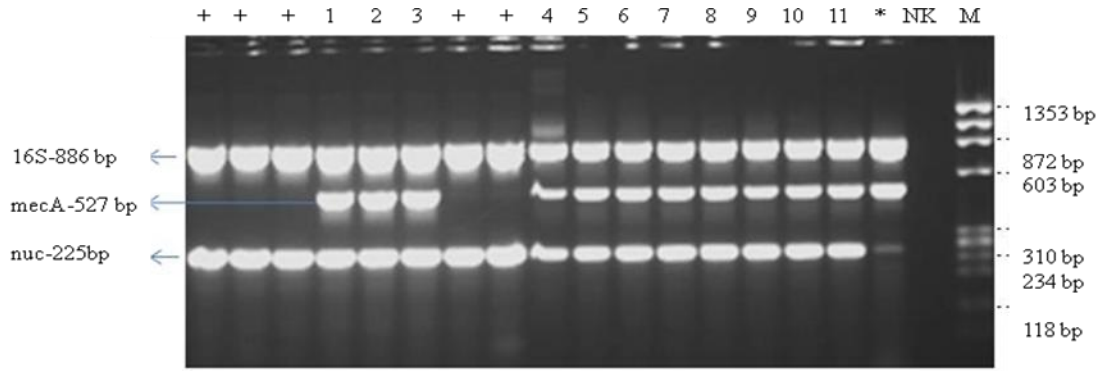


4.1.PZR Sonuçları:

Klinik örneklerden izole edilen MRSA’larda multipleks PZR yöntemi kullanılmıştır. mecA-1 ve mecA-2 primerleri kullanılarak mecA bölgesi çoğaltılmış ve metisilin direnci bakılmış, nuc1 ve nuc2 primerleri kullanılarak koagülaz genleri gösterilmiş ve LAB16SF ve LAB16SR primerleri kullanılarak 16S bakteriyal DNA bölgesi gösterilmiştir.

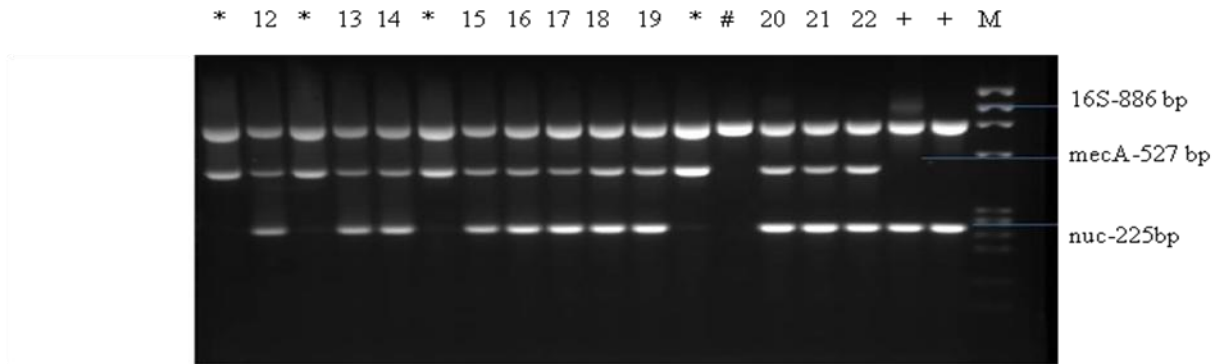
Agaroz jel elektroforezinde; 886 baz çiftlik bölgede bir bandın gözlenmesi 16S bakterial DNA nın (+), 527 baz çiftlik bölgede bir bandın gözlenmesi mecA (+), 255 baz çiftlik bölgede bir bandın gözlenmesi nuc (+) olarak belirlendi. mecA genini taşıyan suşlar metisilin dirençli, nuc genini taşıyanlar *S. aureus* olarak değerlendirildi. PZR ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüleri resim 1 ve resim 2’de gösterilmiştir.

Resim 1. 1-12 . örneğin PZR görüntüleri



+: *S.aureus* *:MRKNS #:Bakteri M:Marker

Resim 2. 12-22 . örneğin PZR görüntüleri



+: *S.aureus* *:MRKNS #:Bakteri M:marker

52 suşta sırasıyla 886 bp bölgede bir bant, 527 bp'lik bölgede bir bant ve 225 bp'lik bölgede bir bant gözlenmesiyle bu suşlar 16S (+), mecA (+), nuc (+) ve bu suşlar metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) olarak değerlendirildi.

4.2. Standart E-test, Buyyon Mikrodilüsyon Agar Tarama ve Makro E-test Sonuçları:

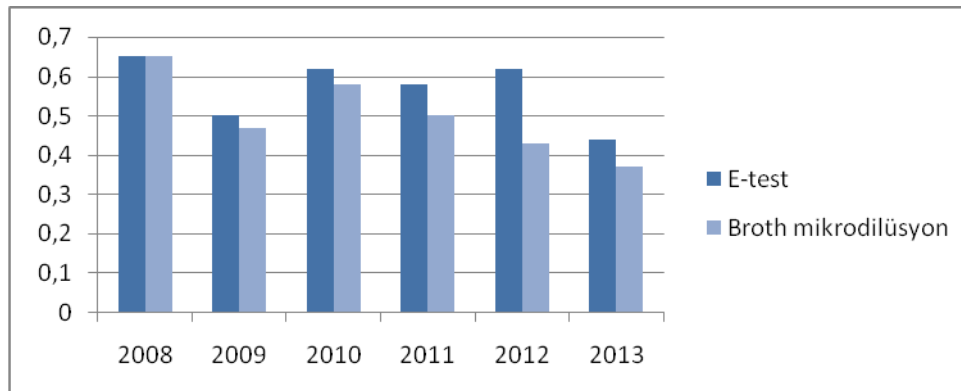
52 tane mecA (+) *S.aureus* suşunun vankomisin duyarlılığını test etmek için vankomisin standart E-test ve vankomisin buyyon mikrodilüsyon işlemleri yapıldı. MİK değerleri belirlendi ve CLSI'nın önerdiği MİK değerleriyle karşılaştırıldı. MİK değeri ≤ 2 µg/ml olanlar duyarlı, 4–8 µg/ml olanlar orta derecede duyarlı, ≥ 16 µg/ml olanlar da dirençli kabul edildi.

Standart E-test yönteminde tüm suşların MİK değerleri 2 µg/ml den düşüktü. Tüm suşlar vankomisine duyarlı olarak tespit edildi. 18.,22.,24.,43. ve 48. örneklerin MİK değerleri 1 µg/ml olarak tespit edildi. 17. örneğin MİK değeri 0,75 µg/ml olarak tespit edildi.

Standart E-test ve buyyon mikrodilüsyon sonuçları benzer şekilde idi. Tüm suşlar buyyon mikrodilüsyon yöntemi ile de vankomisine duyarlı olarak tespit edildi. Bu yöntemle de 17.,18.,22.,24.,43.,48.örneklerin MİK değerleri 1 µg/ml olarak tespit edildi.

Vankomisin MİK değerlerinde yıllar içinde bir artış olmadığı görüldü. Bu suşların E-test ve Broth mikrodilüsyon yöntemiyle yapılan yıllara göre MİK ortalamaları grafik 2 'de verilmiştir.

Grafik 2. 52 tane mecA pozitif *S.aureus* suşunun E-test ve Broth mikrodilüsyon yöntemiyle yapılan yıllara göre MİK ortalamaları.



52 tane mecA (+) *S.aureus* suşu 6 µg/mL vankomisin içeren beyin kalp infüzyon agar (BHI-V6) tarama testi yapıldı. İlk 24 saatte 8 örnekte, 48. saatte ilave bir örnekte daha üreyerek toplamda 9 örnekte 6 µg/mL vankomisinli agar taramada üreme gözlemlendi. Yirmidört saatte 11.,17.,18.,24.,36.,37.,48.,49. örneklerde 48. saatte 43. örnekte üreme gözlemlendi.

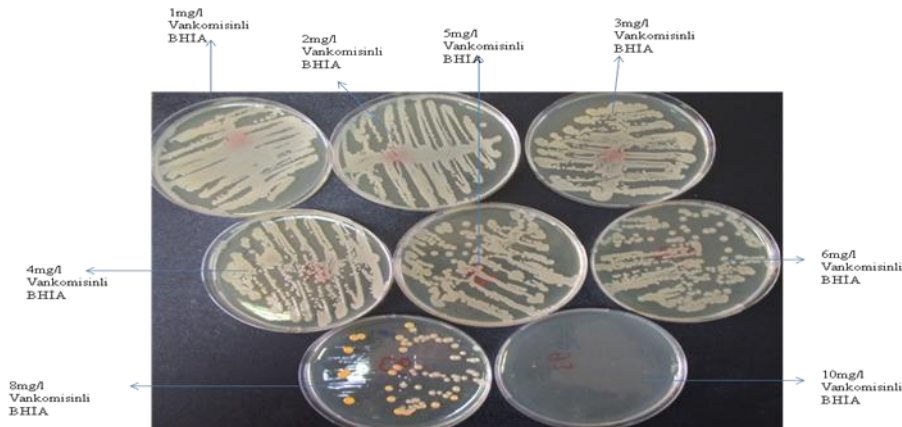
6 µg/mL vankomisin içeren beyin kalp infüzyon tarama agarda üreyen 9 suşu makro E-test ve populasyon analiz profili uygulandı. Makro E-testte bu 9 suştan 5 tanesinin MİK değeri ≥ 8 µg/mL olarak değerlendirildi. Dört suşun MİK değeri ≤ 8 µg/mL olarak değerlendirildi.

4.3.PAP-AUC Sonuçları

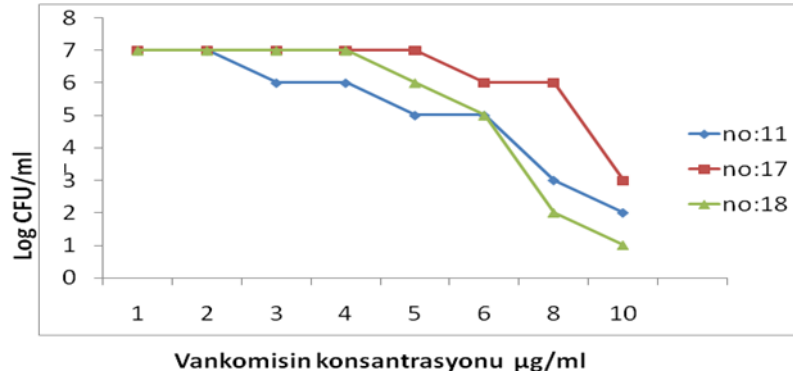
6 µg/mL vankomisin içeren beyin kalp infüzyon tarama agarda üreyen 9 suşu uygulanan populasyon analiz profili sonucuna göre bu bakterilerin eğri altındaki alanlarının Mu3 suşununkine oranı 11. suş için 1,05, 17. suş için 1,29, 18. suş için 1,1, 24. suş için 1,26, 36. suş için 1,2, 37. suş için 1,2, 43. suş için 1,15, 48. suş için 1,149. suş için 1,1 olarak belirlendi. Bu suşların eğri altında kalan alanları 0.90 - 1.3 aralığında idi ve bu 9 suş (% 17.30) hVISA olarak değerlendirildi.

Populasyon analizi yapılan bakterilerden 48.örneğin 1,2,3,4,5,6,8,10 mg/l vankomisin içeren BHIA'daki üreme görüntüsü resim 3'te ve agar taramada üreyen 9 suşun PAP-AUC alan grafikleri grafik 3, grafik 4ve grafik 5'te gösterilmiştir.

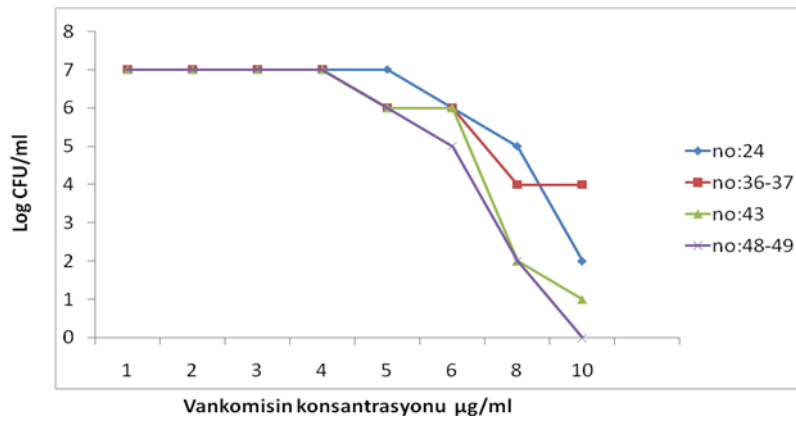
Resim 3: 48 nolu örneğin 1,2,3,4,5,6,8,10 mg/l vankomisin içeren BHIA da 35°C'de 48 saat inkübasyon sonucu üreme görüntüleri.



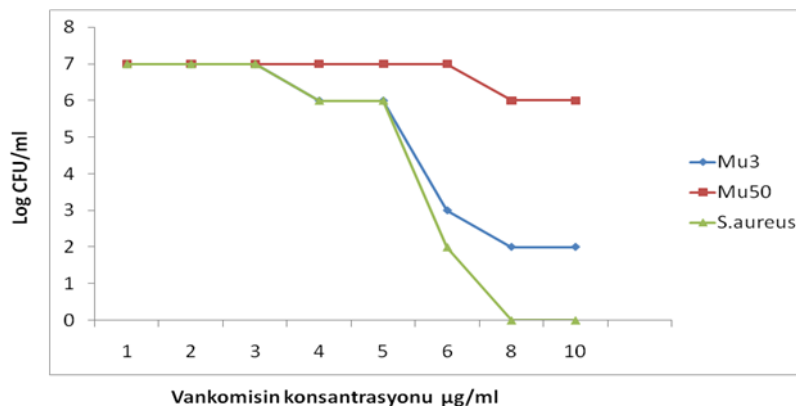
Grafik 3. 11.,17. ve 18.suşların PAP-AUC grafikleri



Grafik 4. 24.,36.,37.,43.,48.,49. suşların PAP-AUC grafiği



Grafik 5. Mu3(hVISA) , Mu50 (VISA) , standart *S.aureus* suşu (ATCC 29213) PAP-AUC grafiği



Bizim çalışmamızda da hVISA olarak tanımlanan suşların izole edildiği hastalar hastanemizin bilgisayar veri tabanından geriye yönelik incelendiğinde elde edilen verilere göre 11. örnekte hasta üretra darlığı nedeniyle üretroplasti operasyonu geçirmiş ve hastanın insizyon yerinde MRSA izole edilmiş, hastaya vankomisin tedavisi başlanmış yan etkiler ortaya çıkınca teikoplanine geçilmiş ve hasta yaklaşık olarak 20 gün glikopeptit antibiyotik tedavisi almıştır. 18. örnekte 5 yıl önce elektrik çarpması sonucu sağ ayak 2-3 parmağı ampüte edilen 5. parmakta açık yarası olan hastaya plastik cerrahi tarafından fleb yapılmış takiplerinde akıntısı olmuş ortopedi birinci parmağa debridman metatarsal fistülektomi uygulamış ve hastanın alınan kültürlerinde MRSA izole edilmiştir. 43. örnekte 78 yaşındaki diyabetik, her iki dize daha önce total diz protezi uygulanan hastaya sol dizde çıkık gelişmesi sonucu eksternal fiksator takılmış ve hastanın yara yerinde ve pin diplerinde akıntı meydana gelmiş ve hastanın akıntılardan yapılan kültür sonuçlarına göre hem yara yeri hemde pin diplerinden MRSA izole edilmiş hasta yaklaşık olarak 23 gün vankomisin tedavisi almış ve daha sonra teikoplanine geçilmiştir. 36.örnekte Irak'tan gelen yüz, boyun, kol ve bacaklarında % 60 2. ve 3. dereceden yanıkları olan hastaya plastik cerrahi tarafından defalarca yanık debridmanı ve eskaratomi işlemleri uygulanmış ve hastanın kan kültüründen MRSA izole edilmiştir. 37. örnekte daha önce nazofarenks kanseri nedeniyle bir kür kemoterapi alan hasta nötropeni ve ateş tanılarıyla medikal onkoloji servisine yatırılmış hastanın balgam kültüründe MRSA izole edilmiş ve hastaya linezolid başlanmıştır. Diğer dört hastanın verilerine 2009 yılında hastanemizin veri kayıt taban sisteminde değişiklikler yapıldığı için ulaşılamamıştır.

5. TARTIŞMA

S.aureus'larda antibiyotik direnci ilk kez 1930'lu yıllarda klinik kullanıma giren sülfonamid grubu antibiyotiklerle başlamış, 1941 yılında kullanılmaya başlayan penisilin G ile *S.aureus* enfeksiyonlarının kontrol altına alınmasından çok kısa bir süre sonra penisilaz üreten suşların ortaya çıkmasıyla penisilin direnci görülmeye başlanmıştır. İkibinli yıllara gelindiğinde ise *S.aureus* suşlarının % 90-95'inin penisilinaz enzimini sentezlediği görülmüştür. Penisilinaz varlığı nedeniyle ortaya çıkan direnç sorunu, 1959 yılında beta-laktamaz enzimine dayanıklı semisentetik bir penisilin olan metisilin ile çözülmüştür. Ancak bu durum çok uzun sürmemiş ve 1961 yılında ilk MRSA suşu tanımlanmıştır (62). Vankomisin 1956 yılında tedavi alanında büyük beklentilerle klinik kullanıma girmiş olan ilk glikopeptid türü antibiyotiktir. Ancak o dönemlerde elde edilen ve "Misissipi çamuru" olarak adlandırılan vankomisinin saf olarak elde edilememesi ve yan etkilerle fazlaca karşılaşılmaması sorun oluşturmıştır. Karşılaşılan yan etkilere rağmen gram pozitif bakterilerde elde edilen başarılı klinik yanıt sonrası FDA 1958 yılında bu ilacın kullanımına onay vermiştir. O dönemlerde preparatın saf olmayışı, yan etkilerinin fazla olması ve daha büyük beklentileri içeren metisilin gibi bir ajanın kullanıma girmesiyle vankomisin güncelliğini kısa sürede kaybetmiştir. Bununla birlikte metisiline karşı *Staphylococcus aureus* suşlarında karşılaşılan direnç sorunu vankomisinin güncelliğini tekrar ön plana çıkarmıştır. Bindokuzyüzseksenli yılların başından itibaren vankomisin kullanıma girmiştir. Uzun yıllar glikopeptid alanında tek başına kullanımda olan vankomisine 1978 yılında teikoplanin eklenmiştir. Teikoplanin 1984 yılından itibaren klinik çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır (13). Günümüzde ise MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde en sık kullanılan ilaçlar vankomisin ve teikoplanin olmak üzere glikopeptid grubu antibiyotiklerdir. Glikopeptidlerin yanı sıra linezolid, daptomisin ve tigesiklin gibi yeni antibiyotikler de kullanılmaktadır. Ancak ne yazık ki stafilokoklarda antibiyotiklere karşı görülen hızlı direnç gelişimi hem glikopeptid grubu ilaçlara hem de yeni geliştirilen ilaçlara karşı ortaya çıkmıştır. Bindokuzyüzdoksanaltı yılında VISA izolatları ve 2002 yılında da VRSA izolatları görülmeye başlanmıştır. Yeni antibiyotiklerden linezolid ilk kez 2000 yılında klinik kullanıma girmiş ve bundan bir yıl gibi çok kısa bir süre sonra ilk linezolid dirençli MRSA izolatı tanımlanmıştır. Buna benzer bir şekilde daptomisin ilk kez 2003 yılında klinik kullanıma girmiş ve bundan iki yıl sonra bu ilaca karşı da direnç ortaya çıkmıştır (62). Metisilin direnci, *mecA* geni tarafından kodlanır ve kromozomaldır.

MecA geni *S.aureus* ve tüm metisiline dirençli koagülaz-negatif stafilokok (MRKNS) suşlarında bulunmaktadır. Bu geni taşıyan izolatlar yeni bir penisilin bağlayan protein (PBP) yapımı nedeniyle tüm beta-laktam ajanlara dirençlidir. Ancak metisilin direnci, çevre koşullarından etkilenmesi nedeniyle her zaman rutin testlerle saptanamamakta ve dolayısıyla metisiline dirençli bir stafilokok, duyarlı olarak tanımlanabilmektedir. Bu nedenle polimeraz zincir reaksiyonu, stafilokoklarda metisilin direncinin belirlenmesinde duyarlılık ve özgüllüğü yüksek bir yöntemdir (121).

Metisilin direncinin tespiti için rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında oksasilin disk difüzyon, sefoksitin disk difüzyon, oksasilin agar tarama, PBP2a lateks aglütinasyon, otomatize sistemler ve referans yöntem olarak *mecA* geninin PZR ile saptanması kullanılmaktadır. İlk kez 1962 yılında, penisilinaza dayanıklı metisilinin kullanıma girmesinden iki yıl sonra metisiline dirençli *S. aureus* suşları saptanmıştır. İlk zamanlarda, bu dirençli suşların tespitinde her ne kadar metisilin kullanıldıysa da takip eden yıllarda, saklama sırasında parçalanmaya daha dirençli olması nedeniyle yerini oksasiline bırakmıştır. Ancak bu direnç, ilk olarak metisiline karşı saptanmış olması nedeniyle isimlendirmede değişiklik yapılmaksızın “metisilin direnci” olarak devam etmiştir. Son yıllarda ilave bazı avantajları nedeniyle oksasilin yerine sefoksitin diskinin kullanımının daha avantajlı olacağı belirtilmektedir (139).

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. Bu suşların neden oldukları enfeksiyonlarda glikopeptid antibiyotiklerinin kullanılıyor olması tedavi başarısızlıklarına neden olmaktadır. Ülkemizde de vankomisinin oldukça yaygın olarak kullanılıyor olması, yakın zamanda karşı karşıya kalabileceğimiz ciddi bir sorun için uyarıcı özelliktedir.

CDC ve “Clinical and Laboratory Standards Institute”, *S.aureus* izolatları için vankomisin minimum inhibitör konsantrasyon değeri $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ ise duyarlı (VSSA), MİK değeri 4-8 $\mu\text{g/mL}$ ise orta duyarlı (VISA) ve MİK $\geq 16 \mu\text{g/mL}$ ise dirençli (VRSA) olarak kabul etmektedir. Heterojen VISA (hVISA) terimi ise, vankomisine duyarlı bir *S.aureus* suşunun vankomisine duyarlı olmayan alt popülasyonu içermesi durumunu tanımlamaktadır (110).

Stafilokoklarda vankomisine karşı azalmış duyarlılık, disk difüzyon metoduyla saptanamamaktadır. Gerek VRSA, gerekse VISA/hVISA suşlarının tarama ve saptanmasında otomatize sistemler, agar dilüsyon, mikrodilüsyon, populasyon analizi profili ve makro E-test olmak üzere farklı yöntemler kullanılmaktadır. CDC tarafından VISA taraması için 6 µg/ml vankomisin içeren BHI agara 0.5 McFarland bulanıklıktaki bakteri süspansiyonundan ekim yapılarak 24 saatlik inkübasyon sonrası değerlendirme önerilmektedir. Vankomisinli tarama besiyerlerinin duyarlılık ve özgüllükleri yüksek değildir, ancak uygulamanın kolay, hızlı ve ucuz olması ve CDC tarafından önerilmesi nedeniyle kullanımları devam etmektedir (120). Tarama testleri konusunda yapılan bir çalışmada 2, 4 ve 6 µg/ml vankomisin içeren besiyerleri karşılaştırılmıştır ve 6 µg/ml vankomisin içeren BHI agarın tarama için daha uygun olduğu belirtilmiştir (134).

Çalışmamızda 52 *S. aureus* suşundan 8'i 24 saat sonunda 1 tanesi 48 saat sonunda 6 µg/ml vankomisin içeren BHI agarda üremiş ve bunların yapılan PAP-AUC değerlendirmeleri sonucunda h-VISA oldukları belirlenmiştir. PAP-AUC yöntemi günümüzde hVISA saptanması için altın standart yöntem olarak kabul edilmekle birlikte, rutinde uygulaması zor, pahalı ve zahmetli bir yöntemdir. Makro E test ise hVISA saptanmasıyla ilgili yapılan bir çok çalışmada diğer yöntemlerle karşılaştırıldığında PAP-AUC'a daha yakın duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir (62).

Bu izolatların özellikle glikopeptid kullanımı yoğun olan merkezlerdeki prevalanslarının bilinmesi, tedavilerin düzenlenmesine yardımcı olabilir. 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 olmaktadır. Hiramatsu ve arkadaşları sekizi üniversite hastanesi olmak üzere 203 hastaneden, 1149 MRSA izolatında yaptıkları çalışmada, üniversite hastanelerinde hVISA prevalansını % 9.3, diğerlerinde ise % 1.3 olarak bulmuşlardır (110). Song ve arkadaşları 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 (123).

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 (126,127). Avrupa genelinde, 20 üniversite

hastanesinden, 302 MRSA izolatında yapılan prevalans araştırmasında ise hVISA ya da VISA suşu saptanmamıştır (128). İtalya’da 179 MRSA suşundan 2 (% 1.1)’si; Tayland’da ise 155 MRSA suşundan 3 (% 1.9)’ü hVISA olarak bulunmuştur (129,130).

Feng ve arkadaşlarının 2013’te toplam 456 MRSA izolatı ile yaptıkları çalışmada 105 izolat (% 23) 6 µg/ml vankomisin içeren BHIA da üremiş ve bu suşlara yapılan PAP-AUC de 21 suş (% 4.6) hVISA olarak doğrulanmıştır (124). K.Riederer ve arkadaşları 2011’de kan kültüründen izole edilen 457 MRSA suşu ile yaptıkları çalışmada Makro E test metodu ile 7 izolatı VISA(% 1,4), 33 izolatı hVISA olarak tespit etmişlerdir. Makro E test metodunun sensitivitesini % 75, spesifitesini % 89 olarak tespit etmişlerdir. Aynı çalışmada hVISA/VISA izolatlarını tespit etmede 3mg/l ve 4 mg/l vankomisin içeren BHIA tarama besiyerlerinin spesifite ve sensitivitelelerini karşılaştırmışlar BHIA-4 için sensitivite % 100, spesifite % 94.6, BHIA-3 için sensitivite % 27,5 , spesifite % 100 olarak bulmuşlardır (127).

Türkiye’de ilk hVISA suşu Gülay ve arkadaşları tarafından 1998 yılında rapor edilmiştir. Gülay ve arkadaşları Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde klinik örneklerden izole ettikleri 95 MRSA suşunda vankomisin direncini 4-8 µg/ml vankomisin içeren BHIA’da araştırmışlardır. Agar taramada üreyen beş suşta (% 5.3) mikrodilüsyon yöntemi ile vankomisin çalışmışlar ve bu suşlarda vankomisine azalmış duyarlılık saptamışlardır (MİK: 8 µg/ml) (131).

Sancak ve arkadaşları 2005 yılında 256 MRSA suşunu 4 µg/ml vankomisin içeren BHIA’da taramışlar ve 145 suşun 48. saatte ürediğini saptamışlardır. Bu suşlara yapılan makro E-test sonucu 46 (% 17.9) suş hVISA olarak tespit edilmiş ve bu 46 suş populasyon analiz profili ile doğrulanmıştır (119).

Nakipoğlu ve arkadaşları 2004 yılında İstanbul üniversitesi Tıp Fakültesinde çeşitli klinik örneklerden elde ettikleri 135 stafilokok suşunu (81 *S.aureus*, 54 KNS) 4-8 µg/ml vankomisin içeren agar tarama ve popülasyon analiz profili ile test etmişler ve sadece bir (% 1,2) hVISA tespit etmişlerdir. Buna karşın altı KNS suşunda heterojen direnç bildirmişler, VISA ise tespit etmemişlerdir (90).

Mirza ve arkadaşlarının Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesinde 2001-2011 yılları arasında çocuk hasta grubundan izole edilen 94 MRSA ile yaptıkları çalışmada, çalışmaya dahil edilen MRSA izolatlarında vankomisin MİK değerlerinde yıllar içinde bir artış olmadığı (MIC creep) , hem mikrodilüsyon hem de standart E test yöntemi ile izolatların tamamının vankomisine ve daptomisine duyarlı bulunduğu gösterilmiştir. PAP-AUC yöntemi ile 20 (% 21)

hVISA izolatu saptanmış, PAP-AUC yöntemi ile E test makro yöntem sonuçları karşılaştırıldığında E test makro yöntemin duyarlılığı % 71,4 özgülüğü ise % 91,4 olarak tespit edilmiştir. hVISA izolatlarının % 75'inde vankomisin MİK değeri 2 µg/ml olarak saptanmış, vankomisin MİK değeri 2 µg/ml olan izolatların ise % 53,6'sını hVISA olarak tespit etmişlerdir (118).

Sancak ve arkadaşları, yedi farklı üniversite hastanesinden 2007-2010 yılları arasında 175 tane MRSA kan örneğinde PAP-AUC ile hVISA oranını % 13,7 (24/175) bulmuşlardır. Vankomisin MİK değeri 71 (% 40,6) suşta 2 µg/ml bulunmuş. hVISA oranları MİK değeri ≥ 1 µg/ml olan izolatlarda daha yüksek oranda saptanmış, makro E test yönteminin duyarlılığı % 58,3 özgülüğü % 92,1 olarak bulunmuştur. Mikrodilüsyon ve E test ile elde edilen MİK değerleri arasındaki yüzde uyumu hem vankomisin hem de daptomisin için yüksek bulunmuştur. MRSA izolatlarının tümünün daptomisine duyarlı olduğu saptanmış ve MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde glikopeptid grubu antibiyotiklere alternatif bir ilaç olabileceği vurgulanmıştır. hVISA tanımlanmasında tercih edilmesi gereken yöntemin PAP-AUC olduğu ancak uygulanması pratik olmadığından, daha hızlı ve doğru sonuç veren yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç olduğu vurgulanmıştır (115).

Çalışmamızda 52 tane mecA pozitif *S.aureus* suşuna 6µg /ml vankomisin içeren BHIA taraması yapılmış suşlardan sekiz tanesi 24. saatte, bir tanesi 48. saatte agar tarama besiyerinde üreyerek toplamda dokuz (% 17,3) suş agar tarama ile hVISA şüpheli olarak tespit edilmiştir. Hem mikrodilüsyon hem de standart E test yöntemi ile izolatların tamamı vankomisine duyarlı bulunmuştur. Altı tane suşun vankomisin MİK değeri 1 µg /ml olarak tespit edilmiş ve bu suşların beş tanesi PAP-AUC ile hVISA olarak tespit edilmiştir. Tarama pozitif olan suşlar ile yapılan makro E test yöntemi ile dört tane suşun vankomisin MİK değeri ≥ 8 µg /ml hVISA , dört tane suşun vankomisin MİK değeri ≤ 8 µg /ml olarak bulunmuş ve bu suşlar vankomisine duyarlı olarak tespit edilmiştir. Agar tarama pozitif olan dokuz suşa yapılan PAP-AUC sonuçlarına göre dokuz suşta (% 17,3) hVISA olarak tespit edilmiştir.

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 kalınlaşmasıdır. 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) gözlenmiştir. Ancak 16 suştan biri hariç hepsinde, popülasyon analizi ile vankomisine dirençli alt popülasyonların hala bulunduğu gösterilmiştir. Bu bulgular, vankomisinin seçici baskısı kaldırıldıktan sonra bile, 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 belirtilmektedir (122).

Öngüt ve arkadaşları 2007-2011 yılları arasında kan kültürlerinden izole edilen 84 MRSA suşunun vankomisin MİK değerlerini değerlendirmişler, VISA tarama yöntemi olarak makro metod E test yöntemini kullanarak VRSA veya VISA tespit etmemişlerdir (133).

Walsh ve arkadaşları, 284 MRSA ve vankomisine duyarlılığı azalmış 45 stafilokok izolatıyla 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 (111). Bu yöntemlerin sonuçlarını, Wootton ve arkadaşlarının tarif ettiği PAP-AUC metodu ile karşılaştırmışlar (112) ve BHI-V6 ile agar tarama yönteminin duyarlılığını % 22, özgüllüğünü % 97; 5 µg/ml vankomisin içeren Mueller 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 bildirmişlerdir (111). 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 vurgulanmıştır (111).

VRSA, VISA ve hVISA izolatlarının yanı sıra ortaya çıkan bir başka problem ise son yıllarda özellikle bazı merkezlerde ortaya çıkan vankomisin MİK değerlerinde görülen yükselmedir. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *S.aureus* izolatlarının vankomisin MİK değerleri, CLSI direnç sınır değerlerinin altında olmasına rağmen, yıllara göre değerlendirme yapıldığında vankomisin MİK değerlerinde yükselmeler olduğu gözlenmiştir. Duyarlılık aralığında kalmak koşuluyla vankomisin MİK değerlerinde yükselme görülmesi "MIC creeping" olarak adlandırılmaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalarda vankomisin MİK değerleri 1 ve 2 µg/ml olan MRSA izolatları ile meydana gelen enfeksiyonlar karşılaştırıldığında, vankomisin tedavi başarısızlığının, vankomisin MİK değerleri yüksek izolatlarla meydana gelen enfeksiyonlarda

daha yüksek olduğu saptanmıştır. Örneğin; yapılan bir çalışmada vankomisin MİK değeri ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ olan MRSA'larla meydana gelen enfeksiyonlardaki klinik yanıt (% 62), MİK değeri < 2 $\mu\text{g/ml}$ olanlarla elde edilenden (% 85) daha düşük bulunmuştur (62).

Kraus ve arkadaşları çalışmalarında, 2001 ve 2005 yılları arasında kan kültürlerinden izole edilen 662 MRSA izolatında vankomisin MİK değerlerini belirlemişlerdir. Araştırmacılar, çalışmada 2001 yılında MİK değeri 1 $\mu\text{g/mL}$ olan suşların oranı % 16 iken, 2005 yılında bu oranın % 69'a yükseldiğini, 2001 yılında MİK değeri $>1\mu\text{g/mL}$ olan suş saptanmazken, 2005 yılında suşların %7'sinin MİK değerinin 1 $\mu\text{g/ml}$ 'nin üzerinde olduğunu saptamışlardır (132).

Öngüt ve arkadaşları kan kültürlerinden izole edilen 84 MRSA suşunun vankomisin MİK değerlerinin beş yıllık bir dönemde değerlendirildiği çalışmalarında izolatların vankomisin duyarlılıklarını E test yöntemi ile belirlemişlerdir. MRSA izolatları için vankomisin MİK tepe değerinin 2007-2010 yılları arasında sabit kaldığı ve 1 $\mu\text{g/mL}$ olduğunu, 2011 yılın da ise 1 $\mu\text{g/mL}$ ve 1,5 $\mu\text{g/mL}$ olarak değişiklik gösterdiğini saptanmışlardır. Her bir yıla ait ortalama MİK değerleri karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunmazken genel değerlendirmede yıllara göre izlenen artışın anlamlı olduğu görülmüştür. MİK creep fenomeninin varlığı merkezden merkeze değişmektedir. Yukarıdaki çalışmalarda elde edilen sonuçların aksine, MRSA suşlarında vankomisin MİK değerlerinde değişimin olmadığını bildiren çalışmalarda bulunmaktadır (133). Bizim çalışmamızda Vankomisin MİK değerlerinde yıllar içinde bir artış olmadığı görüldü. Hem mikrodilüsyon hem de standart E test yöntemi ile izolatların tamamı vankomisine duyarlı bulundu.

Vankomisin, MRSA enfeksiyonlarının parenteral tedavisinde primer seçeneklerden biridir. Ancak vankomisinin bakterisidal aktivitesinin yavaş oluşu, dirençli suşların ortaya çıkışı ve MİK creep fenomeni nedeniyle, etkinliği ile ilgili kaygılar olmaktadır. Yapılan çalışmalar, VISA ve hVISA suşlarının neden olduğu enfeksiyonların gelişiminde, bazı risk faktörlerinin varlığını işaret etmektedir. Glikopeptidlerin yaygın kullanımıyla seçici baskı, vankomisinin 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 yüksek bakteri yükü barındıran enfeksiyonlar, tanımlanmış risk faktörlerindendir (122).

Bizim çalışmamızda da hVISA olarak tanımlanan suşların izole edildiği hastalar hastanemizin bilgisayar veri tabanından geriye yönelik incelendiğinde elde edilen verilere göre hastaların uzun süreli glikopeptid kullanım hikayesi 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, hVISA ve VISA 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.

MRSA kontrol stratejileri taşıyıcı rezervuarların tespiti ve eliminasyonu, bulaşın önlenmesi ve antibiyotik baskısını hedeflemektedir. Pratikte birçok girişimin aynı anda uygulanması etkin MRSA kontrolünü sağlamaktadır. Bu amaçla yıllar içinde değişiklik gerektiren rehber ve öneriler farklı organizasyonlarca yayınlanmıştır. Yakın dönemde ülke bazında uygulanan stratejiler Fransa ve Birleşik Krallık gibi bazı ülkelerde MRSA oranlarında önemli azalmalar sağlayabilmiştir. Kontrol önlemlerinden el hijyeni ve antibiyotik yönetiminin önemi herkes tarafından kabul edilirken; aktif surveyans, izolasyon, dekolonizasyon ve çevre temizliğinin kullanım şekilleri konusunda tartışma devam etmektedir (135). Yaklaşık dört kolonize hastadan birinde yüksek oranlarda enfeksiyon gelişebilmesi bu hastaların tespitini önemli kılmaktadır. Hastaneye gelen herkese mi; yoksa yoğun bakım üniteleri , hemodiyaliz, uzun hastane yatışı, antibiyotik kullanımı veya MRSA taşıyıcısı ile temas gibi artmış risk taşıyanlara mı tarama yapılmasının daha yararlı olduğu tartışılmaktadır. Tarama en çok YBÜ ve salgınlar esnasında yararlı bulunmuştur. Kültür dışında hızlı moleküler testlerin bu amaçla kullanımının fayda-maliyet oranı henüz çok uygun bulunmamıştır. Son rehberler diğer girişimler başarısız kalırsa aktif surveyansı önermektedir (136). MRSA ile kolonize veya enfekte hastaların izolasyonu diğer hastalarda MRSA alımını ve takiben enfeksiyon gelişimini azaltmaktadır. Bu tür hastalar mümkünse tek odalarda değilse kohort yapılarak izlenmelidir. Taşıyıcıların dekolonizasyonu genellikle topikal nazal antibiyotikler (mupirosin) ve vücudun antibakteriyel bir ajanla (örn. klorheksidin) yıkanması ile yapılmaktadır. Tüm MRSA taşıyıcılarının dekolonizasyonu tartışmalıdır. Bu genelde salgınlar esnasında kullanılmaktadır. Yoğun kullanım ile direnç gelişebilmektedir ve önemli oranda rekolonizasyon gözlenebildiğinden bazıları bu uygulamayı

sorgulamaktadır (137). Birçok çalışma YBÜ’de rutin klorheksidin banyosunun etkilerini değerlendirmiştir. Bazı çalışmalarda MRSA ve diğer patojenlerde önemli azalmalar tespit edilebilmiştir. Ancak direnç gelişimi burada da söz konusu olabilmekte ve uygulamanın başarısızlığına yol açabilmektedir. Bu nedenle bu uygulamayı yapan ünitelerde klorheksidine direncin takibi gereklidir. Birçok çalışma başta kinolonlar olmak üzere yakın antibiyotik kullanımının MRSA riskini arttırdığını göstermiştir. Diğer birçok mikroorganizma için de geçerli olduğu üzere akılcı antibiyotik kullanımı tüm hastanelerde öncelikle desteklenmelidir. MRSA sıklıkla kolonize hastaların yakın çevresinde ve birçok cansız yüzeyde uzun süre tespit edilebilmektedir. Arttırılmış çevre temizliği çevresel kontaminasyonu azaltarak MRSA alımını azaltır. Başarılı bir MRSA kontrol stratejisi el hijyeni ile birlikte tüm bu önlemlerin birlikte kullanımı ile mümkün olabilmektedir. Hastane yönetiminin desteği kanıtlanmış girişimlerin uygulanmasını kolaylaştırmaktadır (138).

Günümüzde MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde en sık kullanılan ilaçlar vankomisin ve teikoplanin olmak üzere glikopeptid grubu antibiyotiklerdir. Glikopeptidlerin yanı sıra linezolid, daptomisin ve tigesiklin gibi yeni antibiyotikler de kullanılmaktadır. Ancak ne yazık ki stafilokoklarda antibiyotiklere karşı görülen hızlı direnç gelişimi hem glikopeptid grubu ilaçlara hem de yeni geliştirilen ilaçlara karşı da ortaya çıkmıştır. VRSA da bakteriler vankomisine karşı çok yüksek MİK değerlerine sahip olduğundan, rutin duyarlılık testlerinde tespit edilebilmektedir. VISA/hVISA suşlarının ise laboratuvarlarda uygulanan rutin duyarlılık testleriyle saptanması güçtür. Glikopeptid grubu antibiyotiklere karşı yalancı duyarlı olarak saptanmaları, bu suşlarla gelişen enfeksiyonların tedavisinde başarısızlığa yol açabilmektedir. Özellikle vankomisin tedavisine cevap vermeyen veya ilk başta düzelme gösterirken ve tedavi devam ederken aniden kötüleşen hastalarda, VISA ve h-VISA ihtimali göz önünde bulundurulmalı ve hastanelerde glikopeptid kullanımının yaygın olduğu ülkemizde bunların prevalansının tespit edilmesi için çalışmalar yapılmalıdır.

6.SONUÇLAR

Bu çalışmada hastanemizin servis ve polikliniklerinden rutin mikrobiyoloji laboratuvarımıza gönderilen çeşitli örneklerden izole edilen 52 MRSA suşunda vankomisine karşı azalmış duyarlılığın tespiti araştırılmıştır.

1. 52 suşta PZR ile mecA gen bölgesi gösterildi ve bu suşlar MRSA olarak değerlendirildi.
2. Standart E-test ve buyyon mikrodilüsyon yöntemi ile tüm suşların vankomisin MİK değeri ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ olarak belirlendi ve bu yöntemlerle suşların tamamı vankomisine duyarlı olarak tespit edildi. Her iki yöntem ile de vankomisine karşı yıllar içinde MİK artışı olmadığı görüldü.
3. 52 tane suşa yapılan 6 $\mu\text{g/mL}$ vankomisin içeren beyin kalp infuzyon agar (BHI-V6) tarama testi sonucunda ilk 24 saatte 8 örnekte, 48. saatte ilave bir örnekte daha üreyerek toplamda 9 örnekte 6 $\mu\text{g/mL}$ vankomisinli agar taramada üreme gözlemlendi ve bu suşlar hVISA olarak değerlendirildi. Bu suşlara makro E test ve populasyon analiz profili uygulandı.
4. Makro E-testte bu 9 suştan 5 tanesinin MİK değeri ≥ 8 $\mu\text{g/ml}$ olarak tespit edildi. Dört suşun MİK değeri ≤ 8 $\mu\text{g/mL}$ olarak tespit edildi.
5. 9 suşa uygulanan populasyon analiz profili sonucuna göre bu bakterilerin eğri altındaki alanlarının Mu3 suşununkine oranı 0.90 - 1.3 aralığında idi ve bu 9 suş (% 17.30) hVISA olarak değerlendirildi.

Bu sonuçlara göre vankomisine karşı azalmış duyarlılığa sahip MRSA suşları hastanemizde de mevcuttur ve bu suşların tespiti rutin laboratuvar testleri ile mümkün olamamaktadır. Günümüzde MRSA tedavisinde ilk tercih glikopeptid grubu antibiyotikler olması nedeniyle vankomisin tedavisinde tedavi başarısızlığının önüne geçmek için hVISA'ların tespitine yönelik testler mikrobiyoloji laboratuvarlarında yapılmalıdır.

7.ÖZET

Staphylococcus aureus, tüm dünyada toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlara yol açan en önemli etkenlerden biridir.

VRSA'da bakteriler vankomisine karşı çok yüksek MİK değerlerine sahip olduğundan, rutin duyarlılık testlerinde tespit edilebilmektedir. VISA/hVISA suşlarının ise laboratuvarlarda uygulanan rutin duyarlılık testleriyle saptanması güçtür.

Çalışmamızda retrospektif olarak Ocak 2008 - Ağustos 2013 tarihleri arasında İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilmiş çeşitli örneklerden izole edilip -80 °C de stoklanmış 52 adet MRSA suşu kullanıldı. Bu suşlarda agar tarama, standart E test, makro E-test, buyyon mikrodilüsyon ve PAP-AUC yöntemleriyle VISA ve hVISA izolatlarının sıklığının araştırılması amaçlanmıştır.

Bu örnekler öncelikle mecA, nuc ve 16s genleri açısından moleküler olarak test edildi. Tüm suşlar mecA, nuc ve 16s genlerinin her üçü için pozitif. Bu suşlara vankomisin agar tarama, vankomisin mikrodilüsyon ve standart E-testleri uygulandı. Agar taramada suşlardan sekiz tanesi 24. saatte, bir tanesi 48. saatte üreyerek toplamda dokuz suş üredi. Dokuz suşa yapılan PAP-AUC sonuçlarına göre dokuz suşta (% 17,3) hVISA olarak tespit edildi.

Anahtar kelimeler: MRSA,VISA/hVISA,

8.SUMMARY

Staphylococcus aureus is one of the most important factors that cause the whole world community and hospital-caused infections.

They can be detected in routine susceptibility testing due to the fact that bacteria have very high MIC values against vancomycin in VRSA. On the other hand, it is difficult to detect with routine susceptibility testing applied in the laboratory of VISA/hVISA strains.

In our study study, 52 MRSA strains were detected to the Inonu University Turgut Ozal Medical Center Microbiology Laboratory between January 2008 and August 2013 as retrospective isolated from different samples and stocked at -80 °C were used. It was aimed to investigate the frequency of VISA and hVISA isolates with agar screening, standard E-test, macro E-test, broth microdilution and PAP-AUC methods in these strains.

These examples were primarily tested as molecular in terms of with regard to genes of *mecA*, *nuc* and *16s*. All strains were positive for each of three genes, that is, *mecA*, *nuc* and *16s*. Vancomycin agar screening, vancomycin microdilution and E-test standards were applied to these strains. Eight of strains were grown at 24 hours and one of them was grown at 48 hours and totally 9 strains were grown. According to PAP-AUC applied to 9 strains it was detected as 17.3% hVISA at 9 strains.

Word keys: MRSA,VISA/hVISA,

9.KAYNAKLAR

- 1.Culos KA, Cannon JP, Grim SA. Alternative agents to vancomycin for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Am J Ther* 2011 [Epub ahead of print] .
2. Ippolito G, Leone S, Lauria FN, Nicastrì E, Wenzel RP. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the superbug.*Int J Infect Dis* 2010; 14(Suppl 4): S7-11.
3. Shorr AF. Epidemiology of staphylococcal resistance. *Clin Infect Dis* 2007; 45(Suppl 3): S171-6
4. 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.
5. Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, et al. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *N Engl J Med* 1999; 340(7): 493-501.
6. Ploy MC, Grelaud C, Martin C, de Lumley L, Denis F. First clinical isolate of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a French hospital. *Lancet* 1998; 351(9110): 1212.
7. 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.
8. Sancak B, Ercis S, Menemenlioglu D, Colakoglu S, Haşcelik G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin in a Turkish university hospital. *J Antimicrob Chemother* 2005;56(3): 519-23.
9. 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.
10. Cengiz AT. Tıp ve Diş Hekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi, Ankara 2004;343-50.
- 11.Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 6th Philadelphia: Mosby 2009; 209-223.
12. Sancak B. MRSA Direnç Mekanizmaları: Dünyada ve Türkiye’de Epidemiyolojisi *Ankem Derg*2012;26 (Ek 2):38-47.
- 13.Öncül O. Vankomisin ve teikoplanin hikayesi . *ANKEM Derg* 2010;24 (ek2):101-109.

14. 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.
15. Hota B, Blom DW, Lyle EA, Weinstein RA, Hayden MK. Interventional evaluation of environmental contamination by vancomycin-resistant enterococci: failure of personnel, product, or procedure?. J Hosp Infect 2009;71(2):123-31.
16. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS et al. The *Staphylococci*. In: Jawetz, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology 24th ed. New York: McGraw-Hill 2007;224-232.
17. Koneman EW, Allen SD, William MJ, Schereckenberger PC, Winn WC. Gram-positive cocci, Part I: Staphylococci and related gram-positive cocci. Winn WC Jr et al (editors). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th ed. Lippincott Williams and Wilkins 2006; 623-71.
18. Brooks GF. Tıbbi Mikrobiyoloji. Çeviri editörü Osman Şadi YENEN. Nobel Tıp Kitabevleri 2007; 224-232.
19. Cengiz AT. *Staphylococcus*. In: Ustaçelebi Ş, Cengiz TA (eds). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi Ankara 1999; 339-46.
20. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Staphylococcus*, micrococcus, and similar organisms. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. St. Louis, Missouri. Mosby Elsevier 12th ed 2007; 254-63.
21. Muray PR, Rosenthal KS, Pfaller PA. Medical Microbiology; 4th ed. Philadelphia: Elsevier 2005;203(12):221-36.
22. DeLeo FR, Chambers HF. Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. J Clin Invest 2009; 119(9):2464-74.
23. Kluytmans J, Van Belkum A, Verbrugh H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. Clin Microbiol Rev 1997;10(3):505-20.
24. Saravolatz LD, Markowitz N, Pohlod DJ et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Epidemiologic observations during a community outbreak. Ann Intern Med 1982; 96(1):11-16.
25. Waldvogel FA. *Staphylococcus aureus* (including Staphylococcal Toxic Shock). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Mandell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases. New York: Churchill Livingstone 2000;2069-92.
26. Bilgehan H. *Staphylococcus*. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları İzmir 2004;495-506.

27. Bilgehan H. *Staphylococcus*. Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları İzmir 2000;240-266.
28. Tünger A. *Staphylococcus aureus*. Mikrobiyoloji, Patogenez ve Epidemiyoloji. Bilimsel Tıp Yayınevi Ankara 2004; 9–22.
29. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop GW, Schreckenberger PC, Woods GL. Gram-Positive Cocci. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Darcy P. Lippincott Williams Wilkins Baltimore 2006;623-671.
30. Murray PR. Tıbbi Mikrobiyoloji. Çeviri editörü Ahmet Başustaoglu. Atlas Kitapçılık Ankara 2010;209-223.
31. Ulusoy S, Usluer G, Ünal S. Önemli ve Sorunlu Gram-Pozitif Bakteri Enfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi Ankara 2004;9-22 .
32. Ustaçelebi S. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi Ankara 1999;339-346 .
33. Koneman E, Alen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5th Ed. Chapter: The gram-positive cocci: Part 1: Staphylococci and related organism, Lippincott Williams & Wilkins; Philadelphia 1997;539-576 .
34. Wilkonson BJ. Biology. The Staphylococci in Human Disease. New York 1997.
35. Sriskandan S, Cohen J. Gram-positive Sepsis. Mechanisms and Differences from Gram-negative Sepsis, Infect Dis Clin North Am 1999;13(2):397–412.
36. Seybold U, Kourbatova EV, Johnson JG, et al. Emergence of community associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 genotype as a major cause of health care-associated blood stream infections. Clin Infect Dis 2006; 42(5): 647–56.
37. Noble WC. Staphylococcus Disease. In: Collier L, Balcows A, Susman M (eds). Topley Wilson's Microbiology and Microbial Infections. New York: Oxford University Pres 1998;231.
38. Prevost G, Mourey L, Colin DA and Menestrina G. Staphylococcal poreforming toxins. Curr Top Microbiol Immunol 2001;257: 53-83.
39. Özkul H, Öktem M.A, Gülay Z. Klinik Örneklerden İzole Edilen *S.aureus* Suşlarında Pantón-Valentin Lökositidin (PVL) Varlığının Araştırılması. Mikrobiyoloji Bülteni 2007;41: 357-362.
40. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Staphylococcus* and related organisms. Mosby Inc 2002;: 202-216.
41. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. İnfeksiyon Hastalıkları. Nobel Tıp Kitabevleri İstanbul 1996;773-780 .

42. Dündar V, Dündar DE. Stafilokoklar. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Cilt 2. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Nobel Tıp Kitapevleri İstanbul 2002;1507- 1516.
43. Moreillon P, Que Y, Glauser MP. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock). Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases 6th edition. Volume 2 Elsevier Inc 2005;2321–52.
44. Martin RR, Buttram V, Bosch P, et al. Nasal and vaginal *Staphylococcus aureus* in young women: Quantitative studies. Ann Intern Med 1982;96(6 Pt 2): 951.
45. Rice LB, Bonomo RA. Genetic and biochemical mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents, In Lorian V (Eds). Antibiotics in Laboratory Medicine. Lippincott Williams & Wilkins USA 2005;441–508.
46. Osiyemi O, Dickinson G. Gram-positive pneumonia. Curr Infect Dis Rep 2000; 2(3): 207–14.
47. Abbott KC, Agodoa LY. Hospitalizations for bacterial endocarditis after initiation of chronic dialysis in the United States. Nephron 2002; 91(2): 203–9.
48. Moreillon P, Que YA. Infective endocarditis. Lancet 2004; 363(9403): 139–49.
49. Akalın HE. İnfektif endokardit. Topcu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi kitabından. Nobel Tıp Kitabevleri İstanbul;2002:721.
50. Gonzales C, Rubio M, Romero-Vivac J et al. Bacteremic pneumonia due to *Staphylococcus aureus*: a comparison of disease caused by methicillin-resistant and methicillin-susceptible organisms. Clin Infect Dis 1999;29(5): 1171–7.
51. Francis JS, Doherty MC, Lopatin U et al. Severe community-onset pneumonia in healthy adults caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the Panton–Valentine leukocidin genes. Clin Infect Dis 2005; 40(1): 100–7.
52. Von Rittershain GR. Die exfoliative Dermatitis junger Sänglinge. Z Kinderheilkd 1878; 2: 3–23.
53. Baba T, Takeuchi F, Kuroda M et al. Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. Lancet 2002; 359(9320):1819–27.
54. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Rev 2000;13(1):16–34.
55. Kain KC, Schulzer M, Chow AW. Clinical spectrum of non- menstrual toxic shock syndrome: Comparison with menstrual TSS by multivariate comparison analyses. Clin Infect Dis 1993;16(1): 100–6.
56. Strausbaugh LJ. Toxic shock syndrome. Postgrad Med 1993;94(6):107–8.

57. Appelbaum PC. MRSA the tip of the iceberg. *Clin Microbiol Infect* 2006;12(Supp 2):3-10.
58. Barton M, Hawkes M, Moore D et al. Guidelines for the prevention and management of community associated methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: a prespective for Canadian health care practitioners. *Can J Infect Dis Med Microbiol* 2006;17(Suppl C):4-24CB.
59. Bogdanovich T, Ednie LM, Shapiro S, Appelbaum PC. Antistaphylococcal activity of ceftobiprole: a new broad spectrum cephalosporin. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(10):4210-9.
60. Dorr MB, Jabes D, Cavaleri M et al. Human pharmacokinetics and rationale for once-weekly dosing of dalbavancin, a semi-synthetic glycopeptide. *J Antimicrob Chemother* 2005;55 (Supp 2):25-30.
61. Ünal S. MRSA Problemi. *ANKEM Derg* 2009;23(Ek 2):1-12.
62. Sancak B. *Staphylococcus aureus* ve antibiyotik direnci. *Mikrobiyol Bül* 2011;45(3): 565-576.
63. Deurenberg RH, Stobberingh EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infect Genet Evol* 2008;8(6):747-63.
64. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (IWG-SCC). Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(12):4961-7.
65. 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.
66. Eady EA, Cove JH. Staphylococcal resistance revisited: community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*-an emerging problem for the management of skin and soft tissue infections. *Curr Opin Infect Dis* 2003;16(2):103-24.
67. Turlej A, Hryniewicz W, Empel J. Staphylococcal cassette chromosome mec (Sccmec) classification and typing methods:an overview. *Pol J Microbiol* 2011;60(2):95-103.
68. Woodford N, Livermore DM. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. *J Infect* 2009;59(Suppl 1):S4-16.
69. Campanile F, Bongiorno D, Borbone S, Stefani S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* evolution – The multiple facets of an old pathogen. *Eur Infect Dis* 2010;4(1):70-6.
70. Enright MC, Robinson DA, Randle G, Feil EJ, Grundmann H, Spratt BG. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(11):7687-92.

71. International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome (SCC) Elements (IWG-SCC). <http://www.sccmec.org>.
72. Moellering RC Jr. MRSA: the first half century. *J Antimicrob Chemother* 2012;67(1):4-11.
73. Tsubakishita S, Kuwahara-Arai K, Sasaki T, Hiramatsu K. Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci, *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(10):4352-9.
74. Chambers HF. Methicillin resistance in Staphylococci: Molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev* 1997;10(4):781-91.
75. Sancak B. *Staphylococcus aureus*'da metisilin direnç mekanizmaları. *Mikrobiyol Bül* 2000;34(3-4):381-389.
76. Sancak B. *Staphylococcus aureus*'da metisilin ve vankomisin direnci. *Hacettepe Tıp Derg* 2007; 38: 127-34.
77. Stapleton PD, Taylor PW. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Sci Prog* 2002;85(Pt 1):57-72.
78. Berger-Bachi B, Rohrer S. Factors influencing methicillin resistance in staphylococci. *Arch Microbiol* 2002;178(3):165-71.
79. Rohrer S, Maki H, Berger-Bächi B. What makes resistance to methicillin heterogeneous? *J Med Microbiol* 2003;52(Pt 8):605-7.
80. Robinson DA, Enright MC. Multilocus sequence typing and the evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10(2):92-7.
81. Chua K, Laurent F, Coombs G, Grayson ML, Howden BP. Antimicrobial resistance: Not community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA) A clinician's guide to community MRSA - its evolving antimicrobial resistance and implications for therapy. *Clin Infect Dis* 2011;52(1):99-114.
82. Köck R, Becker K, Cookson B et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveill* 2010;15(41):19688.
83. Skov R, Christiansen K, Dancer SJ et al. Update on the prevention and control of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (CA-MRSA). *Int J Antimicrob Agents*. 2012;39(3): 193-200.
84. David MZ, Daum RS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: epidemiology and clinical consequences of an emerging epidemic. *Clin Microbiol Rev* 2010;23(3):616-87.
85. Otter JA, French GL. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. *Lancet Infect Dis* 2010;10(4):227-39.
86. Rehm SJ, Tice A. *Staphylococcus aureus*: methicillin-susceptible *S.aureus* to methicillin-resistant *S.aureus* and vancomycin-resistant *S.aureus*. *Clin Infect Dis* 2010;51(Suppl 2):S176-82.

87. Skov RL, Jensen KS. Community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a cause of hospital-acquired infections. J Hosp Infect 2009;73(4):364-70.
88. Stefani S, Chung DR, Lindsay JA et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): Global Epidemiology And Harmonisation Of Typing Methods. Int J Antimicrob Agents 2012Apr;39(4):273-82
89. Gülay Z. Gram Pozitif Bakteri enfeksiyonları: Direnç ve Epidemiyoloji. Ankem Derg 2008;22(Ek 2):276-286 .
90. Nakipoğlu Y, Derbentli S, Çağatay AA, Katranci H. Investigation of *Staphylococcus* strains with heterogeneous resistance to glycopeptides in a Turkish university hospital. BMC Infect Dis 2005;5(1):31.
91. Hancock RE. Mechanisms of action of newer antibiotics for gram-positive pathogens. Lancet Infect Dis 2005; 5:209-18.
92. Yaylı G, Gürdal H, Duran A, Tan G. SDU Tıp Fakültesi'nde 1998-2000 yılları arasında görülen hastane enfeksiyonları. Hastane enfeksiyonları Kongresi Kitabı 11-14 Nisan 2002 Sayfa 79.
93. Ulutan F, Sultan N, Akça O. Stafilokokların çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları. Türk Hij Den Biyol Derg 1990; 47:79-85.
94. Sader H, Watters A, Fritsche T, Jones R. Daptomycin antimicrobial activity tested against methicillin-resistant staphylococci and vancomycin-resistant enterococci isolated in European medical centers. BMC Infect Dis 2007; 7:29.
95. Douthwaite S. Structure activity relationships of ketolides vs. macrolides. Clin Microbiol Infect 2001; 7:11-7.
96. Mangili A, Bica I, Snyderman DR, Hamer DH. Daptomycin-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia. Clin Infect Dis 2005; 40:1058-60.
97. Eisenstein BI. Treatment of staphylococcal infections with cyclic lipopeptides. Clin Microbiol Infect 2008;14: 10-6.
98. Uludağ H. Sancak B. *Staphylococcus aureus*'un Tedavisinde Yeni Antibiyotikler. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2010; 40 (2): 63 – 74.
99. Lowy FD. Treatment of methicillin-resistant or vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* infection in adults. <http://www.uptodateonline.com>
100. Sancak B. *Staphylococcus aureus* ve Antibiyotik Direnci. Mikrobiyoloji Bülteni 2011;45(3):565-576.

101. Bouanchaud DH. In-vitro and in-vivo antibacterial activity of quinupristin/dalfopristin. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39:15–21.
102. Culos KA, Cannon JP, Grim SA. Alternative agents to vancomycin for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections. *Am J Ther* 2011.
103. Stryjewski ME, Corey GR. New treatments for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Crit Care* 2009; 15(5): 403-12.
104. Ulusoy S. Tigesiklin. *ANKEM Derg* 2006; 20:117-9.
105. Torun MM, Bahar H, Demirci M et al. Two heterogeneously vancomycin-intermediate clinical isolates of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Turkish university hospital: brief report of a surveillance study. *Int J Antimicrob Agents* 2005;26(6):508-10.
106. Allen NE, Nicas TI. Mechanism of action of oritavancin and related glycopeptide antibiotics. *FEMS Microbiol Rev* 2003; 26:511-32.
107. Stryjewski ME, Corey GR. New treatments for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Curr Opin Crit Care* 2009; 15:403-12.
108. Van Bambeke F. Glycopeptides in clinical development: pharmacological profile and clinical perspectives. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4:471-8.
109. Yusof A, Engelhardt A, Karlsson A, Bylund L, Vidh P, Mills K, et al. Evaluation of a new Etest vancomycin teicoplanin strip for detection of glycopeptide intermediate *Staphylococcus aureus* (GISA), in particular, heterogeneous GISA. *J Clin Microbiol* 2008;46(9):3042-7.
110. 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.
111. Walsh TR, Bolmstrom A, Qvarnstrom A, et al. Evaluation of current methods for detection of staphylococci with reduced susceptibility to glycopeptides. *J Clin Microbiol* 2001; 39(7):2439-44.
112. 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 Chemother* 2001; 47(4): 399-403.
113. Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing-Nineteenth Informational Supplement. CLSI/NCCLS Document M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania 2009.
114. Mahon C R. Textbook of Diagnostic Microbiology, 3 th ed. Chapter 13: Antimicrobial Susceptibility Testing, 319-362 p, 2007.

115. Sancak B, Yağcı S. MRSA Kan İzolatlarında Vankomisin ile Daptomisin Duyarlılığının Araştırılması ve VISA-hVISA Taranması.1.Ulusal Klinik Mikrobiyoloji kongresi kitabı, 2011Antalya.
116. Zhang K, Sparling J, Chow BL, Elsayed S, Hussain Z, Church DL, Gregson DB, Louie T, Conly JM. New quadriplex PCR assay for detection of methicillin and mupirocin resistance and simultaneous discrimination of *Staphylococcus aureus* from coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol, 42(11):4947-4955, 2004.
117. Ünal S. Stafilocoklarda Metisilin ve Enterokoklarda Vankomisin Direncinin Belirlenmesi. ANKEM Dergisi, 21(Ek 2): 166-170, 2007.
118. Mirza H.C.Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde 2001-2011 Yılları Arasında Çocuk Hasta Grubundan İzole Edilen MRSA Suşlarından Vankomisine Orta Düzeyde Duyarlı S.Aureus (VISA) Ve Heterojen VISA Sıklığının Araştırılması.2.Ulusal Mikrobiyoloji Kongre Kitabı.2013 Antalya.
119. Sancak B.Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin in a Turkish university hospital.Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2005; 56, 519–523.
120. Aktaş E.Klinik Örneklerden İzole Edilen MRSA Suşlarında Vankomisine Karşı Azalmış Duyarlılığın Araştırılması. Mikrobiyol Bül 2010; 44: 339-341.
121. Willke A. Kan kültürlerinde üreyen stafilocoklarda metisilin direncinin gerçek zamanlı PCR ile erken tanısı. Mikrobiyol Bül 2012; 46(4): 671-675.
122. Kuşçu F. Metisiline Dirençli Stafilocoklarda Azalmış Vankomisin Duyarlılığının Araştırılması. Mikrobiyol Bül 2011; 45(2): 248-257.
123. 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.
124. Feng NN. The incidence and risk factors for heterogeneous vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*.Zhonghua Nei Ke Za Zhi 2013 Apr;52(4):318-22.
125. Riederer K. Detection Of Intermediately Vancomycin Susceptible And Heterogeneous *Staphylococcus Aureus* Isolates: Comparison Of Etest And Agar Screening Methods. Journal of Clinical Microbiology, June 2011; 2147–2150.
126. 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.

127. 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.
128. 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.
129. 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.
130. Trakulsomboon S, Danchaivijitr 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.
131. Gülay Z, Atay T, Yuluğ N. *Staphylococcus aureus* suşlarında vankomisin direncinin araştırılması. ANKEM Derg 1998; 12:101.
132. Stein kraus 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.
133. Önüt G. Kan kültürlerinden izole edilen MRSA suşlarının vankomisin MİK değerlerinin beş yıllık bir dönemde değerlendirilmesi. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2013;33(4):1017-21.
134. Tenover FC, Lancaster MV, Hill BC, Steward CD, Stocker SA, Hancock GA, et al. Characterization of staphylococci with reduced susceptibilities to vancomycin and other glycopeptides. J Clin Microbiol 1998;36(4): 1020-7.
135. Lee AS, Huttner B, Harbarth S. Control of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Infect Dis Clin North Am 2011;25(1):155-79.
136. Calfee DP, Salgado CD, Classen D et al. Strategies to prevent transmission of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in acute care hospitals. Infect Control Hosp Epidemiol 2008;29(Suppl 1):S62-80.
137. Patel JB, Gorwitz RJ, Jernigan JA. Mupirocin resistance. Clin Infect Dis 2009;49(6):935-41.
138. Korten V. Çok İlaça Dirençli Gram Pozitif Bakteriler (MRSA ve VRE): Tedavi Ve Kontrol. ANKEM Derg 2013;27(Ek 2):57-62.
139. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Disc Susceptibility Testing. 16th informational supplement. CLSI document. M2-A9, CLSI. 2007