



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

***STAPHYLOCOCCUS AUREUS* İZOLATLARINDA VISA, hVISA
VARLIĞININ SAPTANMASI VE DELAFLOKSASİN'İN İN VİTRO
ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Merve AKTI



**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

***STAPHYLOCOCCUS AUREUS* İZOLATLARINDA VISA, hVISA VARLIĞININ
SAPTANMASI VE DELAFLOKSASİN'İN İN VİTRO ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI
UZMANLIK TEZİ**

Dr. Merve AKTI

Tez Danışmanı:

Doç. Dr. Hatice YAZISIZ

Dr. Öğretim Üyesi Hande AFŞARLAR

“Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

**Bu tez Hitit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından
TIP19004.23.001 numaralı proje olarak desteklenmiştir.**

Antalya, 2025

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez sürecim boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, desteğini esirgemeyen, sevgili tez danışmanlarım Doç. Dr. Hatice YAZISIZ ve Dr. Öğretim Üyesi Hande AFŞARLAR'a,

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'ndeki ve Hitit Üniversitesi Erol Olçok Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ndeki değerli hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma,

Tez süreci boyunca mesleki bilgi ve manevi desteğini esirgemeyen, bana yol gösteren, her zaman yanımda hissettiğim sevgili hocam Doç. Dr. Djursun KARASARTOVA'ya,

Uzmanlık yolculuğumda tanıdığım, çalışmanın en keyif verdiği, iyi ki varlar dediğim ve aynı zamanda tez sürecimdeki yardımları için de Büşra ve Aytaç'a

Hayattaki en yakın arkadaşım, meslektaşım olan ablam Elif'e,

Her koşulda yanımda olan, tüm kararlarımda ve eğitim hayatımda beni destekleyen sevgili anne ve babama,

Sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	viii
Tablolar Dizini	x
Şekiller Dizini	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un Tarihçesi ve Sınıflandırılması.....	3
2.2. <i>Staphylococcus</i> 'ların Genel Özellikleri	3
2.3. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un Morfoloji, Kültür ve Biyokimyasal Özellikleri ..	5
2.4. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un Virülans Faktörleri ve Patogenezi	6
2.4.1. Yapısal Elemanlar	7
2.4.2. Enzimler	9
2.4.3. Toksinler	12
2.5. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un Epidemiyolojisi	14
2.6. <i>Staphylococcus aureus</i> 'un Neden Olduğu Enfeksiyonlar	16
2.6.1. Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları	17
2.6.2. Solunum Yolu Enfeksiyonları	17
2.6.3. Diğer Enfeksiyonlar	18
2.7. <i>Staphylococcus aureus</i> Enfeksiyonlarının Tedavisi	19
2.8. <i>Staphylococcus aureus</i> 'da Antimikrobiyal Direnç	20
2.8.1. Penisilin Direnci	20
2.8.2. Metisilin Direnci	21
2.8.3. Glikopeptid Direnci	22
2.9. Delafloksasin	25
2.9.1. Delafloksasin ve Diğer Florokinolonlar'a karşı Direnç.....	27
3. GEREÇ ve YÖNTEM	29
3.1. Çalışmanın İzni	29
3.2. <i>Staphylococcus aureus</i> İzolatlarının Toplanması	29

3.3. <i>Staphylococcus aureus</i> İzolatlarının Tanımlanması	29
3.3.1. Konvansiyonel Yöntemlerle <i>Staphylococcus aureus</i> 'un Tanımlanması	29
3.3.2. Kütle spektrometrisi temelli yöntemlerle <i>Staphylococcus aureus</i> 'un Tanımlanması	30
3.4. <i>Staphylococcus aureus</i> İzolatların Canlandırılması	30
3.5. <i>Staphylococcus aureus</i> İzolatlarında Metisilin Direncinin Belirlenmesi ...	31
3.5.1. Sefoksitin Disk Difüzyon Yöntemi ile Metisilin Direncinin Belirlenmesi	31
3.5.2. Otomatize Antimikrobiyal Duyarlılık Sistemi ile Metisilin Direncinin Belirlenmesi	31
3.5.3. Moleküler Yöntemle <i>mecA</i> ve <i>mecC</i> Saptanması	32
3.6. <i>Staphylococcus aureus</i> İzolatlarının Glikopeptid Duyarlılıklarının Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi İle Tespiti	34
3.6.1. Vankomisin ve Teikoplanin Stok Çözeltilisinin Hazırlanması	35
3.6.2. Bakteri İnokulumunun Hazırlanışı	35
3.6.3. Mikrodilüsyon Plaklarının Hazırlanması ve Değerlendirilmesi	35
3.7. <i>Staphylococcus aureus</i> İzolatlarında hVISA Taraması	37
3.7.1. Teikoplanin Tarama Agar Yöntemi ile hVISA Taraması	37
3.7.2. Makro Gradyent Test Yöntemi ile hVISA Taraması	37
3.8. <i>Staphylococcus aureus</i> İzolatlarında Popülasyon Analizi Profili-Eğri Altında Kalan Alan Yöntemi İle hVISA Varlığı Araştırılması	38
3.9. <i>Staphylococcus aureus</i> İzolatlarının Delafloksasin Duyarlılığının Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi İle Tespiti	39
3.9.1. Delafloksasin Stok Çözeltilisinin Hazırlanması	40
3.9.2. Bakteri İnokulumunun Hazırlanışı	40
3.9.3. Mikrodilüsyon Plaklarının Hazırlanması ve Değerlendirilmesi	40
3.10. Otomatize Antimikrobiyal Duyarlılık Sistemi ile Levofloksasin Duyarlılığının Belirlenmesi	42
3.11. İstatiksel Analiz	42

4. BULGULAR	43
4.1. Çalışmaya Dahil Edilen <i>Staphylococcus aureus</i> İzolatlarının Özellikleri ..	43
4.2. <i>Staphylococcus aureus</i> İzolatlarının Disk Difüzyon, VITEK 2 ve Moleküler Yöntemlerle Metisilin Direnci Sonuçları	43
4.2.1. Sefoksitin Disk Difüzyon Yöntemi ile Metisilin Direnci Sonuçları.....	43
4.2.2. Otomatize Antimikrobiyal Duyarlılık Sistemi ile Metisilin Direnci Sonuçları	43
4.2.3. PZR ile Metisilin Direnci Sonuçları	44
4.3. <i>Staphylococcus aureus</i> İzolatlarının Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi ile Glikopeptid Duyarlılık Sonuçları	48
4.4. <i>Staphylococcus aureus</i> İzolatlarının hVISA Tarama Sonuçları	49
4.4.1. 5 mg/L Teikoplanin İçeren Müller Hinton Tarama Yöntemi	49
4.4.2. Makro Gradyent Test Yöntemi	50
4.5. <i>Staphylococcus aureus</i> İzolatlarının Popülasyon Analizi Profili-Eğri Altında Kalan Alan Yöntemi Sonuçları	52
4.6. <i>Staphylococcus aureus</i> İzolatlarının Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi İle Delafloksasin ve Otomatize Sistem ile Levofloksasin Duyarlılık Sonuçları	55
5. TARTIŞMA	58
6. SONUÇLAR	64
7. ÖZET	65
8. ABSTRACT	68
9. KAYNAKLAR	71

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ABDYE	Akut bakteriyel deri ve deri yapısı enfeksiyonları
BKİ	Beyin Kalp İnfüzyon
BORSA	Sınırdaki oksasiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
bç	Baz çift
C	Konsantrasyon
CFU	Koloni oluşturan birim
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	Deoksiribonükleik asit
DTA	Derin trakeal aspirat
EUCAST	The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
HK-MRSA	Hastane kaynaklı metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
hVISA	Vankomisine heterojen dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
IgG	İmmunglobulin G
KAMHB	Kasyon Ayarlı Müller Hinton Broth
KKA	Koyun kanlı agar
KNS	Koagülaz negatif stafilokok
MALDI-TOF MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry
MHA	Müller Hilton Agar
MSCRAMM	Yapışkan matris moleküllerini tanıyan mikrobiyal yüzey bileşenleri
MSSA	Metisiline duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSA	Metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
PAP-AUC	Popülasyon analiz profili-eğri altında kalan alan

PBP	Penisilin bağlayıcı protein
PIA	Polisakkarit hücreler arası adezin
PVL	Panton-Valentine lökositidin
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
SCCmec	Stafilokokal kaset kromozom elementi
SMD	Sıvı mikrodilüsyon
TAE	Tris-Asetik asit-EDTA
TKBP	Toplum kökenli bakteriyel pnömoni
TK-MRSA	Toplum kaynaklı metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
TSST-1	Toksik şok sendromu toksini-1
VISA	Vankomisin duyarlılığı azalmış <i>Staphylococcus aureus</i>
VRSA	Vankomisine dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 3.1. <i>mecA</i> ve <i>mecC</i> gen bölgesi için kullanılan primer dizisi.....	33
Tablo 3.2. <i>mecA</i> gen bölgesi için amplifikasyon prosedürü	33
Tablo 3.3. <i>mecC</i> gen bölgesi için amplifikasyon prosedürü	33
Tablo 3.4. <i>mecA</i> ve <i>mecC</i> PZR reaksiyon içeriği	33
Tablo 3.5. EUCAST'in <i>S. aureus</i> için belirlenmiş vankomisin ve teikoplanin MİK sınır değerleri.....	36
Tablo 4.1. <i>S. aureus</i> izolatlarının izole edildiği yıllara göre dağılım.....	43
Tablo 4.2. Metisilin direncini saptamada sefoksitin diskinin ve VITEK 2 sonuçlarının <i>mecA</i> geni varlığına göre karşılaştırılması.....	45
Tablo 4.3. Farklı yöntemlerle tespit edilen metisilin direncinde uyumsuz sonuçlar.....	46
Tablo 4.4. <i>S. aureus</i> izolatlarının vankomisin MİK değeri dağılımı	48
Tablo 4.5. hVISA şüpheli olarak değerlendirilen ve PAP-AUC çalışmasına alınan 12 izolatın özellikleri	51
Tablo 4.6. hVISA olarak değerlendirilen 2 izolatın özellikleri	54
Tablo 4.7. <i>S. aureus</i> izolatların delafloksasin antibiyotik duyarlılık dağılımı ve metisilin direnci karşılaştırılması	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Asidik pH'a göre delafloksasinin benzersiz anyonik yapısı	26
Şekil 3.1. Delafloksasin SMD MİK sonuçlarının değerlendirilmesi	42
Şekil 4.1. <i>mecA</i> geni için yapılan PZR' a ait agaroz jel elektroforez görüntüsü....	44
Şekil 4.2. <i>mecC</i> geni için yapılan PZR'a ait agaroz jel elektroforez görüntüsü....	44
Şekil 4.3. MRSA ve MSSA izolatlarının kliniklere göre dağılımı	47
Şekil 4.4 MRSA ve MSSA izolatlarının izole edildiği örnek türlerine göre dağılımı	47
Şekil 4.5. <i>S. aureus</i> ATCC 29213 negatif kontrol suş, mu3 pozitif kontrol suşu, negatif ve pozitif örneklerle ait 5 mg/L teikoplanin içeren Müller Hinton tarama yöntemi görüntüsü	49
Şekil 4.6. Makro gradiyent yöntemine göre bir mu3 pozitif kontrol örneğinin E-test görüntüsü, teikoplanin MİK: 16 mg/L	50
Şekil 4.7. PAP-AUC Yöntemi'ne göre 430 stok numaralı izolatın farklı konsantrasyonlardaki bakteri süspansiyonlarının farklı konsantrasyonlardaki Vankomisin BKİ agarda üreyen kolonilerin görüntüsü. a) 0,5 mg/L Vankomisin BKİ Agar, b) 1 mg/L Vankomisin BKİ Agar, c) 2 mg/L Vankomisin BKİ Agar, d) 2,5 mg/L Vankomisin BKİ Agar, e) 4 mg/L Vankomisin BKİ Agar, f) 8 mg/L Vankomisin BKİ Agar	53

Şekil 4.8. En düşük PAP-AUC alanına sahip izolat (232 stok numaralı izolat), hVISA olarak değerlendirilen iki izolat (430 ve 469 stok numaralı izolat) ve mu3 pozitif kontrol izolatına ait PAP-AUC grafiği.....	54
Şekil 4.9. hVISA çalışma algoritması	55
Şekil 4.10. <i>S. aureus</i> izolatlarının örnek türü ve delafloksasin duyarlılık yüzde dağılımı karşılaştırılması	56
Şekil 4.11. Balgam-DTA örneklerinden izole edilen <i>S. aureus</i> izolatlarının delafloksasin MİK değeri dağılımı	57
Şekil 4.12. Yara-doku örneklerinden izole edilen <i>S. aureus</i> izolatlarının delafloksasin MİK değeri dağılımı	57

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Staphylococcus aureus, sağlıklı insanların cilt ve burun florasında bulunabilen, deri başta olmak üzere yumuşak doku, kemik ve kan dolaşımı enfeksiyonları, toksik şok sendromu ve besin zehirlenmesi gibi ciddi enfeksiyonlara da yol açabilen fırsatçı gram pozitif bir bakteridir (1, 2).

Penisilin 1940’larda *S. aureus* tedavisinde kullanılmaya başlanmış ancak birkaç yıl içinde beta-laktamaz enzimi üretimi ile penisiline karşı direnç gelişmiştir. Beta laktamaz enzimi ile oluşan direnci yenmek için metisilin ve kloksasilin gibi beta-laktamaza dayanıklı ilaçlar ve beta-laktam antibiyotiklerle kombine edilebilen klavulanik asit ve sulbaktam gibi beta-laktamaz inhibitörü ilaçlar geliştirilmiştir. Daha sonra *S. aureus* izolatları yeni bir penisilin bağlayıcı protein (PBP) kodlayan yeni bir gen (*mecA*, son zamanlarda *mecC*) ile metisiline karşı direnç kazanmış ve bu izolatlar metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) olarak adlandırılmıştır (1).

Vankomisin ve teikoplanin MRSA enfeksiyonlarının tedavisi için en sık tercih edilen antibiyotiklerdir. Ancak vankomisin ve teikoplanine karşı direnç görülmeye başlanmış ve yeni antibiyotiklere olan ihtiyacı artırmaya başlamıştır (3). 1997’de Japonya’da ilk kez vankomisine heterojen dirençli *Staphylococcus aureus* (hVISA) izolatının raporlanmasından sonra glikopeptid antibiyotiklere azalmış duyarlılık gösteren *S. aureus* izolatları vankomisin tedavisinin klinik başarısızlığı ile ilişkilendirilmiş ve bir sorun haline gelmeye başlamıştır (4, 5).

Linezolid ve daptomisin sırasıyla 1970 ve 1980 yıllarında, MRSA’da yeni tedavi seçeneği olarak geliştirilmiş olup ciddi yan etkileri bulunabilen antibiyotiklerdir. Son birkaç yılda MRSA’ya karşı etkinliği olan seftarolin ve seftobiprol gibi bazı yeni sefalosporinler de geliştirilmiştir (1).

Delafloksasin ise yeni bir antibiyotik olup, MRSA’ya karşı etkili in vitro aktiviteye sahip, çift hedefli anyonik yeni bir florokinolondur (6).

Florokinolon sınıfı antimikrobiyal ajanlar, idrar yolu enfeksiyonları, solunum yolu enfeksiyonları, karın içi ve akut bakteriyel deri ve deri yapısı enfeksiyonlarının (ABDYE) tedavisinde endikedir. Özellikle ABDYE’deki artış, enfeksiyonların polimikrobiyal olması ve toplumla ilişkili MRSA’nın yayılmasıyla

ampirik tedavide genellikle geniş spektrumlu antibiyotikler kullanılmaya başlamıştır. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yakın zamanda antimikrobiyal kullanımına ilişkin yapılmış olan bir çalışmada, levofloksasinin toplum kökenli ve sağlık hizmeti kaynaklı enfeksiyonları tedavi etmek için reçete edilen üçüncü en yaygın antimikrobiyal ajan olduğu tespit edilmiştir. Bu kadar geniş bir kullanım sonucunda gram pozitif kok ve gram negatif basillerde florokinolon direncinin ortaya çıktığı gözlemlenmiştir. Florokinolonlara karşı direncini ortadan kaldırma çabaları, florokinolon dirençli bakterilere karşı etkin aktiviteye sahip yeni adaylar geliştirmeye ve bakteriyel direnç gelişimi için daha düşük bir potansiyel sağlamaya odaklanmıştır. Delafloksasin, ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından yetişkin hastaların ABDYE ve toplum kökenli bakteriyel pnömoni (TKBP) tedavisinde duyarlı patojenler için onaylanmıştır. FDA tarafından belirtilen patojenler arasında MRSA ve metisiline duyarlı *S. aureus* 'da (MSSA) yer almaktadır (7-10).

Bu çalışmada *S. aureus* izolatlarında metisilin direnci saptamada farklı yöntemlerin performansının karşılaştırılması, altın standart yöntem olan “popülasyon analiz profili-eğri altında kalan alan” (PAP-AUC) ile hVISA araştırılması ve yeni bir antibiyotik olan delafloksasinin in vitro etkinliğinin sıvı mikrodilüsyon (SMD) yöntemi ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. *Staphylococcus aureus*'un Tarihçesi ve Sınıflandırılması

Staphylococcus aureus ilk kez 1880 yılında, Alexander Ogston tarafından cerrahi yara enfeksiyonundan izole edilmiş ve kobaylara enjekte edilerek apse oluşumu görülmüştür. Louis Pasteur da insanlardaki enfeksiyonlardan izole edilen *S. aureus* izolatlarını hayvanlara enjekte ederek apse oluşumunu gözlemlemiştir. Ogston, 1882 yılında *Staphylococcus* (yunanca üzüm salkımı anlamında) terimini cins ismi olarak bulmuş ve 1884 yılında *S. aureus* ve *S. albus* olarak bakteriyi iki türe ayırmıştır. 1939 yılında Aziz Cowan koagülaz testine dayanarak *S. epidermidis*'i farklı tür olarak ayırmıştır. Alexander Fleming'in 1928 yılında penisilin üreten bir mantarın *S. aureus*'a karşı bakterisidal etkileri hakkındaki araştırmaları penisilin keşfi ile sonuçlanmıştır. 1940 yılında penisilin kullanımı girmesinden önceki yıllarda, sistemik *S. aureus* enfeksiyonlarında %80 oranında ölüm görülmüştür. Penisilin kullanımı ile birlikte ilk dirençli *S. aureus* izolatı 1942 yılında tespit edilmiş ve iki yıl sonra penisiline dirençli izolatlar baskın hale gelerek 1945 yılında klinik izolatların %80'inin dirençli olduğu görülmüştür. *S. aureus* izolatları, penisilin beta-laktam halkasını hidrolize edebilen plazmid kaynaklı beta-laktamaz üretmektedir. Beta-laktamaz enzimi, transduksiyon veya konjugasyon yoluyla kolayca aktarılabilir. Dünya çapındaki *S. aureus* izolatlarının %90-95'inin penisiline dirençli olmasına neden olmaktadır. 1950'lerin sonuna doğru beta-laktamaza dayanıklı metisilin geliştirilmiş ve 1960 yılında ilk MRSA izolatı tespit edilmiştir (11, 12).

2.2. *Staphylococcus*'ların Genel Özellikleri

Stafilokoklar hareketsiz, zorunlu anaerob olan *S. saccharolyticus* ve *S. aureus subsp. anaerobius* türleri dışında fakültatif anaerob, 18-40°C sıcaklık aralığında ve %10 NaCl varlığında üreme özelliğine sahip, lizostafine duyarlı gram pozitif koklardır. Koagülaz pozitifliği diğer gram pozitif koklardan ayırımında önemlidir (13). Plazma koagülaz 1925 yılında bulunarak, stafilokokların koagülaz pozitif (*S. aureus* grup) ve koagülaz negatif stafilokok (KNS) olarak gruplandırılmasında kullanılan temel test olmuştur. Stafilokok kolonizasyonu en

yaygın nazofarenks, burun, deri, vajina, rektum, perinede görülmektedir. *S. aureus*, insanların %33'ünde burunda ve %10'unda vajende kolonize olabilmektedir. İnsanlarda fırsatçı patojen olarak sık izole edilen mikroorganizmalardandır. İnsandan insana bulaş direkt temas veya hava yoluyla olur. *S. aureus* ve *S. lugdunensis* insanda en virülan türlerdir. Taşıyıcılık ve enfeksiyon görülme sıklığı kronik hemodiyaliz hastalarında, diyabet hastalarında, kronik dermatolojik hastalığı olanlarda, intravenöz ilaç alışkanlıkları bulunan ve insan immün yetmezlik virüsü pozitif kişilerde daha fazladır. *S. aureus*'un önemli virülans faktörleri, kapsül, peptidoglikan tabaka ve teikoik asit, yüzey adezinleri, biyofilm gibi yapılar; katalaz, koagülaz, hyaluronidaz gibi enzimler; hemolizin, lökositin, epidermolitik toksin, enterotoksin ve toksik şok sendromu toksini-1 (TSST-1) gibi toksinlerdir (14).

Hastane enfeksiyonlarının sık etkenlerinden olan *S. aureus*'ların büyük çoğunluğu metisiline dirençlidir (14). MRSA insanlarda hafif ila ciddi enfeksiyonlara neden olabilen bir patojendir (15). MRSA izolatları özellikle hastanelerde ve bakımevlerinde bakteri ile kolonize hastalar veya hastane personellerinin elleri ile diğer hastalara bulaşabilir. Çoklu antibiyotik direnci hastane kaynaklı metisiline dirençli *S. aureus* (HK-MRSA) kökenlerinde yaygındır ve antibiyotik kullanımı ile kolonizasyon artmaktadır. Toplum kaynaklı metisiline dirençli *S. aureus* (TK-MRSA) enfeksiyonları da son yıllarda önem kazanmaya başlamıştır. TK-MRSA'ların çoğunda Panton-Valentine lökositini (PVL) bulunmaktadır ve bunlar daha çok deri-yumuşak doku enfeksiyonları ve pnömoniye neden olmaktadır. Çoklu antibiyotik direnci HK-MRSA'larda TK-MRSA suşlarına göre daha sık görülür ve insanlarda daha ciddi enfeksiyonlara neden olur (14, 15).

2.3. *Staphylococcus aureus*'un Morfoloji, Kültür ve Biyokimyasal Özellikleri

Kültürden veya klinik örnekten yapılan Gram boyamada, sporsuz, 0.5-1.5 µm çapında, tek tek, çiftli-dörtlü, kısa zincir yapmış şekilde veya bölünmeleri sırasında her yöne bölünerek çoğaldıklarından ve ayrılmaları zor olduğundan üzümlü salkımı şeklinde gram pozitif koklar olarak görülebilen bakterilerdir (14, 16).

Stafilokoklar tipik üremeyi seçici olmayan bir besiyeri olan koyun kanlı agarda (KKA) gerçekleştirir. Stafilokok türlerinin çoğunluğu KKA'da optimal üreme sıcaklığı olan 34-37°C'de, normal atmosfer koşullarında 24 saatte 1-3 mm, 72 saatte 3-8 mm çapında koloniler oluşturur. En ideal üreme potansiyel hidrojen (pH) aralığı 7 ile 7.5 arasındadır. Pigment oluşturmaları için en ideal sıcaklık 20-25 °C'dir (14, 17). *S. aureus*'un KKA'daki görünümü hafif yüksek ve düzgün yüzeyli, sarı krem-oranj pigmentli, hemolitik koloniler şeklindedir. Kapsül kalınlığı artmış bazı suşlar mukoid koloniler yapabilirler (14). *S. aureus*'un daha sıklıkla kronik enfeksiyonu olan hastalardan izole edilen küçük koloni varyantları veya bazı diğer stafilokok türleri, 24-72 saatlik inkübasyon sonucu çoğunlukla pigmentsiz, hemolitik olmayan küçük (iğne ucu görünümlü) koloniler oluşturabilirler. Bu üreme karışık bir kültür görünümü verebilir. Pasajlanan kültürlerde tekrar aynı görünümde koloniler oluşturabilirler ya da tekrar sokak tipi görünümüne ulaşabilirler. Besiyerine hemin/timidin ilave edilmesi, karbondioksitli ortamda inkübe edilmeleri kolonilerin normale dönmesini sağlayabilir. *S. aureus*'un yavaş üreyen küçük kolonileri, sıklıkla beta-laktam veya glikopeptit gibi antibiyotiklere direnç gösterebilir, konak hücrede hücreyi parçalamadan yaşayarak tekrarlayan veya dirençli enfeksiyonlara neden olabilen varyantlar oluşturabilir (11, 14).

Kontaminasyon riski yüksek olan klinik örneklerden *S. aureus* izolasyonunda mannitol-tuz agara, yumurta sarısı-tellürit piruvat içeren Baird-Parker besiyerine, Columbia kolistin-nalidiksik asit agara, lipaz-tuz-mannitol agara ve feniletıl alkol agara ekilmesi izolasyon şansını artırır (14).

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında *S. aureus*'un tanımlanmasında en sık kullanılan yöntem koagülaz testidir. Bu yöntem *S. aureus*'un plazmayı pıhtılaştırmasına dayanır. Tüpte ve lamda olmak üzere iki farklı şekilde yapılabilir.

Tüp koagülaz testi, stafilokokal koagülaz enziminin fibrinojeni fibrine dönüştürmesi ile ekstraselüler serbest koagülazı saptamasına dayalı bir testtir. 0.5 mL tavşan plazması içerisine şüphelenilen koloniden eklenir ve 37°C’de 4 saat inkübasyona bırakılır. Pıhtı oluşumu olup olmadığı değerlendirilir. dört saatte pıhtı oluşumu görülmezse inkübasyon 24 saate kadar uzatılır ve yeniden değerlendirilir. Lam koagülaz testinde, tavşan plazması bulunan ortamda *S. aureus*’un kümelenme (clumping) faktörü olarak adlandırılan hücre duvarı ilişkili fibrinojen bağlayıcı yüzey repetörünün plazmanın fibrinojeni ile etkileşerek küme oluşturabilmesi gözlemlenmeye çalışılır. *S. lugdunensis* ve *S. schleiferi* de lam koagülaz testi yapılırken özellikle insan plazması tercih edildiğinde pozitif olabilir. Tüp ve lam koagülaz yöntemlerinin bazı olumsuz yönleri mevcuttur. Tüp koagülaz testinde inkübasyon süresinin uzun olması, lam koagülaz testinin ise düşük duyarlılık göstermesi en önemli olumsuzluklarıdır. Lam koagülaz testinde negatif sonuçlanan izolat tüp koagülaz testi ile kesinlikle doğrulanmalıdır (14).

2.4. *Staphylococcus aureus*’un Virülans Faktörleri ve Patogenezi

Enfeksiyonun patogenezindeki temel basamaklar kolonizasyon, virülans, enfeksiyonun başlatılması, apse oluşumu, sistemik enfeksiyon, çok sayıda virülans faktörünün yardımıyla düzenleme ve adaptasyondur. Kolonizasyon, konak savunmasının fiziksel bozulma veya diğer hastalıklar nedeniyle tehlikeye girmesi durumunda bakteriyel enfeksiyon riskini artırır (15).

Staphylococcus aureus’un çok farklı virülans faktörleri olmakla birlikte tüm izolatların yapısı (adezinleri, toksinler veya biyofilm üretme, fagositoza direnç gösterme yetenekleri) aynı değildir. Yapısal maddeler ve salgılanan ürünler enfeksiyonun patogenezinde rol sahibidir. *S. aureus*’un hastalık oluşturmak ve konak savunmasından kaçmak için çok çeşitli mekanizmaları vardır. Küçük koloni varyantları ile kalıcı ve tekrarlayan enfeksiyonlara sebep olabilir, antibiyotiklerden ve konak savunmasından kaçabilirler (18).

Stafilokokal virülans faktörlerinin ekspresyonunun düzenlenmesi patogeneizde önemlidir. Ekspresyon, aşırı metabolik istekleri azaltmak için yalnızca gerektiği zaman koordineli bir şekilde gerçekleşir. Yapışkan matris moleküllerini tanıyan mikrobiyal yüzey bileşenlerin (MSCRAMM) ekspresyonu genellikle

logaritmik büyüme (replikasyon) sırasında olurken, toksinler gibi salgılanan proteinlerin ise sabit faz sırasında olur. Enfeksiyon sırasında, MSCRAMM proteinlerinin erken ekspresyonu doku bölgelerinin ilk kolonizasyonunu kolaylaştırırken, toksinlerin daha sonra hazırlanması yayılmayı kolaylaştırır. Akseuar gen regülatörü, stafilokok virülansının düzenlenmesinde kritik bir rol oynayan çekirdek algılama sistemidir (18).

2.4.1. Yapısal Elemanlar

Peptidoglikan

Staphylococcus aureus hücre duvarı N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asidin çapraz bağlı polimerlerinden oluşan peptidoglikanlar içerir. Peptidoglikan, hücre duvarının sert dış iskeletinin oluşmasını sağlamakta ve adezinleri sabitlemektedir. Kompleman aktivasyonunda, polimerfonükleer hücrelerin kemotaksisinde, monositler tarafından üretilen endojen bir pirojen olan interlökin-1'in oluşumunda, opsonik antikorların üretiminin uyarılmasında, endotoksin benzeri aktivitede rol oynamaktadır (17, 19).

Peptidoglikanın parçalanması güçlü asitler veya lizozim enzimi ile gerçekleştirilmektedir (19). MSCRAMM adezinleri de dahil diğer çeşitli proteinler, *S. aureus* peptidoglikanının yapısına kovalent olarak bağlanmaktadır (17). Peptidoglikan tabakası β -laktam ve glikopeptid yapılı antibiyotiklerin de etki yeridir (19).

Teiokoik ve Lipoteiokoik Asitler

Teiokoik asitleri diğer gram pozitif bakterilerden farklı olarak ribitol-fosfat polimerleri içerir. Görevleri mukozal yüzeylere yapışmayı arttırmak, hücre duvarı ile ilişkili enzimleri sabitlemek, hücre duvarına sertlik ve esneklik vermek, virülansa katkı sağlamaktır. Plazma zarında bulunan lipoteiokoik asitler, peptidoglikanın hücre zarına bağlantısında görev almaktadır (17).

Protein A ve Yüzey Adezyon Proteinleri

Konak dokularına tutunmayı sağlayan MSCRAMM'ler kollajen, fibronektin ve fibrinojen gibi molekülleri bağlamaktadır (18). Protein A, *S. aureus*'un hücre duvar yapısında bulunan bir MSCRAMM'dir (19). Protein A, immunglobulin G (IgG) (IgG3 hariç) moleküllerinin Fc kısmını bağlayarak opsonizasyonu önleyebilmektedir. IgG'nin Fab kısmı ise spesifik bir antijene bağlanmak için serbest durumda kalmaktadır (18, 19). Kümelenme faktörü, fibrinojen ve trombositlere enzimatik olmayan bir bağ ile bağlanarak bakterilerin kümelenmesini sağlayan, hücre duvarı yüzeyinde bulunan bir başka önemli MSCRAMM'dir. *S. aureus* enfeksiyon bölgesine kemotaksisi önleyen hücre dışı yapışma proteinini de salgılayabilir (18).

Kapsül

Bazı *S. aureus* izolatları fagositozu engelleyen, virölansı artıran ve apse oluşumunda görev alan polisakkarit kapsüle sahiptir. Baskın tip 5 ve 8 olmak üzere en az 11 kapsüler serotip tanımlanmıştır. Bu baskın iki tipi taşıyan izolatlar kültürlerde mukoid görünümde olmadığı için kapsülü olmayan izolatlardan ayırt edilemez (19, 20).

Biyofilm

Staphylococcus aureus'ların çoğunluğu, konak hücrelere ve prostetik maddelere yapışmasını sağlayan ve fagositozunu önleyen biyofilmin yapısında bulunan ekzopolisakkaritler üretmektedir (17). Ekzopolisakkaritin ana bileşeni poli-*N*-asetil-glukozamin olarak bilinen polisakkarit hücreler arası adezin (PIA) dir (21, 22). PIA kolonizasyonda, biyofilm oluşumunda ve biyofilmle ilişkili enfeksiyonlarda, immün sistemden kaçışta, antimikrobiyallere dirençte ve fagositozda önemli bir rol oynamaktadır (22).

Biyofilmin %97'si su, %3'ü yapısal ve fonksiyonel moleküllerden oluşmaktadır (21).

Biyofilm oluşumu, bakterilerin ilk önce kapsüler bir polisakkarit/adezinin kapsüler aracılık ettiği bir yüzeye yapıştığı, ardından çoğalarak PIA üretimi ile

ilişkili çok katmanlı bir biyofilm oluşturduğu bir süreç olarak kabul edilmektedir (23). Biyofilm oluşumu, antimikrobiyal ilaçların difüzyonunu engelleyerek kronik enfeksiyona ve sepsise yol açmaktadır (22, 24).

İn vivo yapışma, çoğu MSCRAMM ailesine ait olan hücre duvarına bağlı ve diğer yüzey proteinleri yoluyla insan matriks proteinlerine gerçekleşir (25). Bağlanmaya, adezyon matriks moleküllerini tanıyan MSCRAMM'ler aracılık eder. Enfeksiyon sırasında bu proteinler fibrinojen, fibronektin ve kollajen gibi konakçı faktörlere bağlanmada önemli rol oynar (26).

S. aureus'ta biyofilm oluşumu temel olarak 12 farklı gen tarafından kodlanır (22). Hücreler arası adezyon genlerinden olan *icaABCD*, stafilokok türlerinde PIA ve polisakkarit/adezinin sentezine aracılık eden proteinleri kodlayarak hücreden hücreye adezyon sürecini ve biyofilm oluşumunu başlatır (22, 23). *İca* genlerinden *icaA* ve *icaD*, *S. aureus* ve *Staphylococcus epidermidis*'teki slaym üretiminde önemli bir role sahiptir (24). *S. aureus* biyofilminin dağılımı, aksesuar gen regülatörü sisteminin dört farklı geni tarafından düzenlenir (22).

2.4.2 Enzimler

Katalaz

Katalaz testi mikroorganizmadaki katalaz enziminin varlığının gösterilmesi için kullanılır. Bu enzimi bulunduruyorsa “katalaz-pozitif” olarak değerlendirilir. Stafilokoklar katalaz pozitif bakterilerdir.

Bakteriler aerobik solunumla hidrojen peroksit (H_2O_2) açığa çıkarırlar. H_2O_2 bakteriler için toksiktir ve bu etkiden kurtulmak için H_2O_2 'yi parçalayan katalaz enzimini üretirler. Katalaz enzimi H_2O_2 'yi su ve oksijen moleküllerine ayırarak toksik etkiyi önlemektedir.

Bakteri sürülmüş bir lam üzerine %3'lük H_2O_2 damlatıldıktan sonra 10 saniyede güçlü köpük ya da hava kabarcıkları gözlenirse katalaz testi pozitif olarak yorumlanır (14)

Koagülaz

Koagülaz enzimi stafilokok apsesinin çevresinde bir fibrin tabakası oluşumunu sağlayarak bakterileri fagositozdan koruyan ve enfeksiyonu sınırlayan önemli bir virülans faktörüdür. Bakterinin bu enzimi ürettiğini göstermeye yarayan koagülaz testi, *S. aureus*’u diğer stafilokoklardan ayırmaya yardımcı olan önemli bir testtir (13, 14).

Staphylococcus aureus izolatları bağlı ve serbest olmak üzere iki farklı koagülaz enzimi üretmektedir. Hücre duvarında bağlı koagülaz (kümelenme-clumping faktör) olarak bilinen bir fibrinojen bağlayıcı yüzey reseptörü bulunmaktadır. Fibrinojeni doğrudan çözünmez fibrine çevirmesi sonucu oluşan kümelenme lam koagülaz testi ile tespit edilebilmektedir. Serbest koagülaz ise hücreden salınır ve bir globulin plazma faktörü ile reaksiyona girerek trombin benzeri bir madde oluşturarak pıhtılaşmayı gerçekleştirir. Bu madde fibrinojenin çözünmez fibrine dönüşümünde rol oynamaktadır. Serbest koagülaz, tüp koagülaz testi yöntemiyle tespit edilebilmektedir. Tüp koagülaz testinde; 0.5 mL plazma içeren tüpe şüpheli koloninin eklenmesiyle homojen bir süspansiyon elde edilir. Bu süspansiyon 35-37 °C’de dört saat inkübe edilir ve saat başı değerlendirilmesi yapılır. Değerlendirmede gevşek fibrin ağı oluşumu veya tam pıhtılaşma varlığına bakılır. Eğer bu durumlar yoksa 24 saat inkübasyona devam edilir ve 24. saatte tekrar değerlendirilir. Lam koagülaz testinde, tavşan plazması bulunan ortamda *S. aureus*’un kümelenme (clumping) faktörü olarak adlandırılan hücre duvarı ilişkili fibrinojen bağlayıcı yüzey repetörünün plazmanın fibrinojeni ile etkileşerek küme oluşturabilmesi gözlemlenmeye çalışılır. Lam koagülaz testinde bir lam üzerine 10-15 µL distile su konulur ve şüpheli koloni öze ile alınarak bu distile su ile homojenize edilir, 10 saniye beklenir ve kümelenme olup olmadığı izlenir (13, 14).

Fibrinolizin, Hyaluronidaz

Hyaluronidaz, bağ dokusunun hücre dışı matriksinde bulunan, hücrelere yapısal bütünlük sağlayan bir polisakkarit olan hyaluronik asiti hidrolize eden bir enzimdir (13, 27). *S. aureus* ve *S. hyicus* hyaluronidaz üreten iki stafilokok türüdür. Fibrinolizin (stafilokinaz) fibrin pıhtılarının parçalanmasında görev almaktadır.

Plazminojeni aktive ederek plazmine dönüşümünü sağlamaktadır. Hyaluronidaz ve fibrinolizin, hücre dışı matrikste ve biyofilmlerde bulunan hyaluronik asit ve fibrinin parçalanmasıyla *S. aureus*'un daha kolay yayılmasına yol açmaktadır (27).

Lipaz, Fosfolipaz C, Nükleaz, Proteaz

S. aureus enfeksiyon sırasında konağın dokularını istila edip tahrip etmesini ve diğer bölgelere yayılımını sağlayan proteazlar, lipazlar ve elastazlar gibi çok sayıda enzim üretmektedir. *S. aureus* bu invazyon yapıcı enzimler sayesinde septik şok tablosuna neden olabilmektedir. Bunu konağın bağışıklık sistemini ve pıhtılaşma yollarını aktive ederek yapmaktadır (18).

Nükleaz, hücre dışı deoksiribonükleik asiti (DNA) hidrolize ederek biyofilmi dağıtır, termostabil yapıdadır, *S. aureus* 'un ürettiği bir enzimdir (13, 27). Nükleazın diğer bir rolü ise, ölmekte olan nötrofillerden salınan nötrofil hücre dışı tuzaklarından bakteriyel kaçışı sağlamaktır. Nükleaz apseyi parçalamakta veya makrofajların apoptozuna yol açarak *S. aureus*'un hayatta kalmasına yardımcı olmaktadır (27).

Staphylococcus aureus, bir ekzotoksin olan β -toksin ve fosfolipaz C olmak üzere iki farklı fosfolipaz üretmektedir. Fosfolipaz C sadece *S. aureus* tarafından üretilmektedir. Kompleman aktivasyonunun kısıtlanmasına, kanda ve nötrofillerde *S. aureus* 'un hayatta kalmasına yardımcı olmaktadır (27).

Staphylococcus aureus 12 adet proteaz enzimi üretmektedir. Proteazların bakteriyel yayılımda ve bağışıklıktan kaçmada rolleri bulunmaktadır (27). Lipaz enzimi de bakterinin kutanöz ve subkutanöz dokulara yayılımına yardımcı olmaktadır (17).

Beta-Laktamaz

Staphylococcus aureus birkaç farklı türde beta laktamaz enzimi sentezlemektedir. Bu enzim sadece beta laktam grubu antimikrobiyal ajanların varlığında üretilmektedir. Bu enzimlere ait genler plazmidler tarafından kodlanmaktadır. Beta-laktamaz direnç genlerinin diğer bakterilere aktarımı transformasyon ve transdüksiyon yoluyla olabilmektedir (17).

2.4.3. Toksinler

Alfa toksin

Staphylococcus aureus'un en iyi bilinen toksinidir (28). Alfa toksinin doku hasarında önemli etkisi olduğu düşünülmektedir (13). Dermonekrotik ve nörotoksik etkileri vardır (29).

Hem bakteriyel kromozom hem de bir plazmid üzerinde kodlanan, 33 kDa ağırlığında ve porlar oluşturan bir proteindir (13, 21).

Eritrositlere, lökositlere, hepatositlere ve trombositlere karşı litik etkisi varken nötrofillere karşı litik değildir. Alfa toksinin bir parçalayıcı ve metaloproteinaz olan ADAM10'a bağlanması sonucu fokal adezyonların bozulması meydana gelir (28).

Epitelyal hücrelerde E-cadherinin bölünmesine neden olarak epitelyal bariyer hasarı ile ozmotik şişmeye ve bunun sonucunda hücre lizisine yol açarak hızlı K^+ akışına ve Na^+ , Ca^{2+} ve diğer küçük moleküllerin geçişine izin verir (13, 28). Alfa toksin insan monositleri, T ve B hücrelerinde de apoptoza neden olur (28).

Beta toksin

Sfingomyelini hidrolize edebildiği için sfingomiyelinaz C olarak da adlandırılır. Eritrositlere karşı litik etkisi düşük sıcaklıklarda gerçekleştiğinden dolayı bu toksin diğerlerine göre daha az etki göstermektedir. Monositlere karşı litik etkili ancak lenfositlere ve granülositlere karşı litik etkisi olmayan, por oluşturmayan, 35.000-Da ağırlığında, ısıya dayanıklı bir proteindir (13, 21). β -toksin dermonekrotik etkiye sahip değildir (29).

Grup B streptokokları tanımlamaya yarayan CAMP testinde beta toksin kullanılır. CAMP testi bir kanlı agar plağı üzerine ekilmiş beta toksin üreten *S. aureus* izolatına dik olarak ekimi yapılmış şüpheli grup B streptokok arasında gelişen artmış beta hemolitik aktivitenin ok başı şeklinde bölgesi izlenmesidir (29).

Delta-hemolizin

Delta toksini, çoğu *S. aureus* izolatının ürettiği ve 3000-Da ağırlığında bir polipeptittir. Toksin, eritrositlere, diğer birçok memeli hücrelerine ve hücre içi membran yapılarına karşı geniş bir sitolitik etkiye sahiptir (13).

Gama-toksin ve PVL

Staphylococcus aureus tarafından gama-hemolizin ve PVL olmak üzere iki bileşenli toksin üretilir (29).

Bu toksinler, konak hücrelerin hücre zarına bağlanarak hücre lizisine neden olan S (bir iyon değişim kolonunda yavaş salınan proteinler için, HlgA, HlgC, LukS-PV) ve konak hücrelerin fosfatidilkolinine bağlanan F (bir iyon değişim kolonunda hızlı salınan proteinler için, HlgB, LukF-PV) olmak üzere iki polipeptit zincirinden oluşmaktadır (21, 29).

Gama-hemolizin neredeyse her *S. aureus* izolatı tarafından üretilirken, PVL prevelansı dünya çapında farklılık göstermekte ve klinik örneklerden izole edilen izolatların %5'inden daha azında bulunmaktadır. PVL tipik olarak çoğunlukla MSSA olmak üzere toplumla ilişkili MRSA ve MSSA izolatlarında bulunmaktadır (29, 30).

Toksinler nötrofillere ve makrofajlara karşı litik etkilidirler. Gama-toksin birçok memeli eritrosit çeşidine karşı da litik aktivite gösterir. Bununla birlikte agarın toksin aktivitesi üzerindeki inhibitör etkisinden dolayı, kanlı agar plaklarında gama-toksin tanımlanamamaktadır (29).

PVL toksini lökotosiktir ancak hemolitik değildir (13). PVL, çoğunlukla deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, osteartiküler enfeksiyonlar ve nekrotizan pnömoni gibi hastalıklarla ilişkilidir (31).

Eksfoliyatif Toksinler

İki farklı eksfoliyatif toksin formu (ETA ve ETB) bulunmaktadır. ETA geni faj aracılı kodlanır, ısıya dayanıklıdır. ETB ise plazmid kaynaklıdır, ısıya dayanıksızdır (13). Toksinler süperantijen özelliğindedirler (19).

Toksinler epidermisteki stratum granulosum tabakasındaki hücreler arası köprülerin oluşturulmasından sorumlu desmozom ailesinin bir üyesi olan desmoglein-1'i parçalayarak stafilokokal haşlanmış deri sendromuna neden olan serin proteazlardır. Toksinler sitoliz veya enflamasyon yapmadığı için epidermisin ilgili tabakasinda bakteriler ve lökositler bulunmaz (13, 19).

Enterotoksinler

Farklı çeşitlerde stafilokok enterotoksini bulunmakta olup, kromozal olarak kodlanmaktadır (13, 19). Bu toksinler tüm *S. aureus* izolatlarının yaklaşık yarısı tarafından sentezlenmektedir. Süperantijenik yapıda oldukları için T hücre aktivasyonunun ve masif sitokin salınımının artmasını sağlayabilirler (13).

Enterotoksin A gıda zehirlenmesinde sıklıkla rol alan toksindir. Enterotoksin B stafilokokal psödomembranoz enterokolit yapar. Enterotoksin C ve D kontamine süt ürünlerinde bulunur (13).

Enterotoksinler, ısıya karşı dayanıklı olmaları ve sindirim enzimlerinin etkisine karşı direnç gösterebildikleri için gıda zehirlenmelerine neden olurlar (19). Bu nedenle bir besin maddesi stafilokok enterotoksini ile kontamine olmuşsa, gıdanın yeniden ısıtılması ya da mide asitlerine maruz kalması koruyucu olmamaktadır (13).

TSST-1

pH 7,2 olan tek bir polipeptit zincirinden oluşan, 22.000 Da molekül ağırlığında bir toksindir. TSST-1 daha yoğun olarak hidrofobik amino asit içermesine rağmen suda iyi çözünür. Toksin genellikle ısıya ve proteolize karşı dayanıklıdır (29). Toksin yapımında ortam aerobik bir atmosferden ve nötral pH'tan oluşmalıdır (13).

TSST-1'in süperantijenik aktivitesi sonucu konağın endotoksine duyarlılığı artarak TNF- α aracılığıyla kapiller geçirgenlik artışına, endotel hücrelerine bağlanarak ölümüne, aktivasyonuna ve endotoksine karşı aşırı duyarlılığa neden olur (29).

2.5. *Staphylococcus aureus*'un Epidemiyolojisi

Stafilokoklar her yerde bulunabilen ve insan için patojen olabilen bakterilerdir (19). *S. aureus* kolonizasyonu yenidoğanlarda göbek deliği, cilt ve perineal bölgede yaygındır. *S. aureus* burun delikleri, orofarinks, gastrointestinal sistem ve ürogenital sistemde de kolonize olur. Çocukluk döneminde ve yetişkinlerde geçici veya kalıcı *S. aureus* taşıyıcılığı nazofarenkste yaygındır.

Sağlıklı yetişkinlerin %15'i kalıcı nazofarengeal *S. aureus* taşıyıcısıdır. Yatan hastalarda, sağlık çalışanlarında, egzamatöz deri hastalığı olan kişilerde, uyuşturucu bağımlılarında, kronik hemodiyaliz hastaları ve insülin kullanan yani düzenli enjeksiyona maruz kalan hastalarda bu oran daha yüksek bulunmuştur. Stafilocoklar ciltte ve nazofarenkste kolonize olduğundan, bakterilerin bulaşı kolaydır ve hastane kaynaklı enfeksiyonlar sık görülür. Stafilocoklar yüksek sıcaklıklara, dezenfektanlara ve antiseptik solüsyonlara karşı dayanıklı değildir ancak kuru yüzeylerde uzun sürede yaşayabilmektedir (13). Bakteri duyarlı bir kişiye ya doğrudan temas yoluyla ya da dökülen insan lezyonları ve bu lezyonlarla kontamine olan fomitlerden solunum yolu veya deri ile bulaşabilir (19). Böylece stafilocokların sağlık çalışanlarından hastalara veya hastalar arasında geçişi sağlanabilmektedir (13). Hastanelerde, en yüksek risk altında olanlar yerler yenidoğan servisleri, yoğun bakım servisleri, ameliyathaneler ve kemoterapi servisleridir. 'Epidemik' *S. aureus*'un bu servislere toplu olarak girmesi ciddi klinik hastalıklar oluşturabilir (19). Bunun için en uygun korunma yöntemi sağlık çalışanlarının el yıkamasıdır (13).

Metisiline dirençli *S. aureus* ilk kez 1961'de, metisilinin tedavi amaçlı kullanımından kısa bir süre sonra İngiltere'de tanımlanmıştır. Bunu takiben on yıl içinde MRSA, dünyanın çoğu yerinde HK-MRSA sorumlu hale gelmiştir (32).

1990'lardan günümüze kadar sağlıklı kişilerde görülen MRSA enfeksiyonlarının sayısında bir artış olmuştur. 2000'li yılların ortalarından itibaren de çiftlik hayvanlarına maruz kalma ile de ilişkilendirilmiştir (32). Bu artış genellikle 2003'te toplum kaynaklı deri enfeksiyonları ve şiddetli pnömoni salgılarından sorumlu olduğu rapor edilen, TK-MRSA izolatları olarak isimlendirilen yeni MRSA izolatlarının tanımlanmasıyla ilişkilendirilmiştir (12, 13). Toplumdan izole edilen izolatlar son yıllarda hastanelere de taşınarak, önceden belirlenen kontrol önlemlerini uygulamak zor hale gelmiş ve hastanede yatan hastalar artık toplum ya da hastaneden edinilen izolatların neden olduğu enfeksiyonlara karşı duyarlı olmaya başlamıştır (13).

MRSA enfeksiyonlarının tedavisi MSSA enfeksiyonlarının tedavisinden zor ve pahalıdır. MRSA enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek az sayıda antibiyotik bulunmaktadır. MRSA tedavisinde kullanılabilen birkaç antibakteriyel

ilaç sınıfının herbirine dirençli *S. aureus* izolatlarının bildirilmesi ise çoklu ilaca dirençli *S. aureus* enfeksiyonlarının tedavi edilmemesi ihtimalini artırmaktadır. MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde vankomisin antibiyotiğinin kullanımının artmasıyla, vankomisin duyarlılığı azalmış *Staphylococcus aureus* (VISA) izolatı ilk olarak 1996'da Japonya'da bildirilmiş tanımlanmış ve vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA) rapor edilmeye başlanmıştır (12).

2.6. *Staphylococcus aureus*'un Neden Olduğu Enfeksiyonlar

Staphylococcus aureus doğrudan yaptığı yıkım sonucu dokulara yayılımla veya oluşturduğu toksinler yoluyla olmak üzere iki farklı şekilde enfeksiyona yol açabilmektedir (13). Neden olduğu lokalize enfeksiyonlar apse veya piyojenik eksuda şeklindedir. Bakteriyemi, endokardit, menenjit, pnömoni, perikardit, septik artrit, osteomyelit, toksinleriyle oluşan hastalıklar olan besin zehirlenmesi ve toksik şok sendromu gibi klinik tablolara da yol açar (14).

Staphylococcus aureus sağlıklı insanların derisinde ve mukozal yüzeylerinde asemptomatik kolonizasyon yapabilmekle birlikte çeşitli enfeksiyonlara sebep olabilen fırsatçı bir patojendir. Stafilokokal enfeksiyonlar en sık yabancı bir cisim girişinden sonra deri veya mukozal bariyerlerin aşılması sonucu özellikle bağışıklık sistemi zayıf olan konaklarda meydana gelir. Stafilokoklar yara enfeksiyonlarının önemli bir nedenidir. Osteomyelit, endokardit ve bakteriyemi tetikleme ve organlarda invaziv ikincil enfeksiyonlara yol açma potansiyeli vardır. Antibiyotiğe dirençli izolatların artmasıyla ve son zamanlarda özellikle vankomisine dirençli klinik izolatların da gözlenmesiyle, *S. aureus* enfeksiyonlarının kontrolü giderek zorlaşmıştır. Stafilokokların hastane enfeksiyonlarındaki rolü önemlidir ve son zamanlarda stafilokoklar toplum kökenli enfeksiyonların önemli bir nedenidir. Toplum kökenli *S. aureus* enfeksiyonları sıklıkla, yakın zamanda hastanede yatış, ameliyat, uzun süreli bir bakım merkezinde yaşama, devamlı damar içi ilaç kullanımı gibi risk faktörlerine sahip olmayan sağlıklı bireylerde görülmektedir. Bu toplum kökenli enfeksiyonlara neden olan izolatların, sağlıklı bireylerde hastalığa neden olabilmelerinden dolayı yüksek virülans potansiyeline sahip oldukları düşünülmektedir (31).

2.6.1. Deri ve Yumuşak Doku Enfeksiyonları

Akut bakteriyel deri ve deri yapısı enfeksiyonu deriyi ve altta yatan deri altı dokuyu, fasyayı veya kasları kapsayan, heterojen, potansiyel olarak yaşamı tehdit eden enfeksiyonlardır. ABDYE'e örnek olarak follikülit, fronkül, impetigo, karbonkül, mastit, erizipel, selülit, nekrotizan fasiit, yara enfeksiyonları verilebilir. Bu enfeksiyonlara en sık neden olan patojenler arasında *S. aureus* ile birlikte *Streptococcus* spp. de bulunmaktadır (14, 33). *S. aureus* dünyada cilt enfeksiyonlarında en sık görülen patojendir. *S. aureus* hafif (folikülit, impetigo, komplike olmayan selülit gibi) ve ciddi (selülit, lenfanjit, lenfadenit ve nekrotizan fasit) olmak üzere birçok deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Cerrahi alan enfeksiyonlarında, deri altı apselerde ve pürülan selülitte izole edilen en sık patojendir (11, 34).

Deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının en önemli risk faktörü deri bütünlüğünün bozulduğu durumlar veya kronik cilt hastalıklarıdır (11).

Haşlanmış deri sendromu, *S. aureus*'ün eksfoliyatif toksinleri aracılığıyla oluşan, sıklıkla çocukları etkileyen, kabarcıklı bir cilt hastalığıdır (35).

2.6.2. Solunum Yolu Enfeksiyonları

Oral sekresyonların aspirasyonu veya vücudun uzak bir yerinden hematogen yayılım sonrası (Intavenöz tedavi alan hastalar, sağ kapak endokarditler, kronik hemodiyaliz hastaları) *S. aureus* ile solunum yolu hastalığı meydana gelebilmektedir (13, 36). Hem toplum kaynaklı hem de hastane kaynaklı pnömonilerde önemli bir etkidir (34). Toplum kaynaklı *S. aureus* pnömonileri özellikle yaşlı bireylerde, diyabetik ve alkoliklerde görülmekte olup influenza salgınlardan sonra artış göstermektedir. Hastane kaynaklı *S. aureus* pnömonileri entübasyon sonrası veya aspirasyona bağlı görülebilmektedir (36). TK-MRSA sıklıkla çocuklarda ve genç erişkinlerde görülebilen, masif hemoptizi, septik şok ve ciddi nekrotizan pnömoni ile seyreden bir klinik tabloya neden olabilmektedir (13).

2.6.3. Diğer Enfeksiyonlar

Staphylococcus aureus bakteriyemiyenin en sık etkenlerindendir. *S. aureus* bakteriyemilerinin yaklaşık üçte birinde enfeksiyon odağı bilinmemektedir. Çoğunlukla iyi huylu cilt enfeksiyonları sırasında, bakterinin kan dolaşımına yayılımı sonucu bakteriyemi gelişmektedir. *S. aureus* bakteriyemi vakalarının yarısından fazlası, cerrahi girişimle ya da uzun süreli kontamine intravasküler kateter kullanımı ile ilişkilidir (13). Bakteriyemiye bağlı ölüm ise en sık akciğer enfeksiyonu ve enfektif endokarditi olan hastalardaki enfeksiyon odaklarından kaynaklanmaktadır (31). *S. aureus*, gelişmiş ülkelerde görülen enfektif endokarditin en sık nedenidir (37). Endokardit akut başlar, hızla ilerler ve en sık mitral kapağı tutar. Aort kapak tutulumlarında prognoz daha kötüdür (36). *S. aureus*, osteomyelit, doğal eklem septik artriti, protez eklem enfeksiyonu gibi kemik ve eklem enfeksiyonlarının %30-60'ında görülen en sık etkindir (34). *S. aureus* yetişkinlerdeki nongonokoksik artritin de en sık etkenidir (36).

İdrar yolu enfeksiyonlarına nadiren sebep olmaktadır ve sıklıkla kalıcı idrar sondası bulunan hastalarda rastlanmaktadır. Belirgin idrar odağı bulunmayan hastalarda idrardan izole edilmesi *S. aureus* bakteriyemisini yansıtabileceği için, *S. aureus* bakteriyüresi olan hastada kan kültürü yapılması önerilmektedir (34).

Staphylococcus aureus nadir olarak menenjitte ve travma veya göğüs cerrahisi sonrası hematojen yayılım ile perikardite de neden olabilmektedir.

Stafilokokal toksik şok sendromu, 1980'lerin başında ABD'de genç sağlıklı kadınlarda yüksek oranda emici tamponların kullanılması ile ilişkili hızla ölüme ilerleyen multisistemik bir hastalık olarak farkedilmiştir (35, 38). Stafilokokal toksik şok sendromu vakalarının sadece %5'inden azında kan kültürünün pozitif olması dikkat çekicidir (38).

Isıya dirençli stafilokokal enterotoksinlerin bulunduğu besinlerin tüketilmesi sonucu, sıklıkla salgınlar şeklinde görülen besin zehirlenmelerine de sebep olabilmektedir (36).

2.7. *Staphylococcus aureus* Enfeksiyonlarının Tedavisi

Staphylococcus aureus hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonlarının önde gelen nedenlerindendir. Hafif cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları, endokardit, osteomyelit, bakteriyemi ve pnömoni gibi birçok hastalığa neden olabilir (39). *S. aureus*'ta çoklu ilaç direnci nedeniyle bu enfeksiyonların tedavisi giderek zorlaşmaktadır (40).

Penisilinin keşfi *S. aureus* enfeksiyonu tedavisinde öncülüğü yaptı. Penisilinin yaygın kullanımı ile direnç hızla gelişti ve penisilaza dirençli metisilin kullanıma girdi. Metisilin tedavide kullanımı ile yaklaşık iki yıl gibi bir sürede metisilin direnci görüldü (39). Bunu tedavide sık kullanılan diğer antibiyotiklere (klindamisin, kloramfenikol, tetrasiklinler, makrolidler, rifampin, aminoglikozidler ve trimetoprim/sulfometoksazol) karşı direnç gelişmesi izlemiştir (40).

Penisilin artık vakaların çoğunda *S. aureus* enfeksiyonlarını tedavi etmek için yararlı değildir, ancak MSSA suşları için genellikle çok sayıda alternatif yarı sentetik antistafilokokal penisilinler ve sefalosporinler gibi diğer beta-laktam ilaçlar mevcuttur. MSSA izolatlarının neden olduğu enfeksiyonlar genellikle sefalosporinler, oksasilin veya nafsilin gibi beta-laktam sınıfındaki ilaçlarla tedavi edilirken, MRSA enfeksiyonları diğer antimikrobiyal sınıflarındaki ilaçlarla tedavi edilir ve birinci basamak tedavide glikopeptid antibiyotikler olan vankomisin ve teikoplanin tedavide en yaygın kullanılan ilaçlardır, birçok yeni ilaç sınıfı da mevcuttur (41).

Vankomisin, MRSA sıklığının arttığı hastane ortamlarındaki hastalarda veya MRSA pozitif kültür sonucu olan enfeksiyonların tedavisinde ampirik olarak önerilir. Yüksek düzeyde direnç nadir görülse de vankomisine karşı duyarlılığın azalması ve sistemik uygulamadan sonra doku penetrasyonunun zayıf olması glikopeptid antibiyotiklerle tedavide başarısızlıklara neden olabilir (42). Vankomisine karşı hem düşük düzeyde hem de yüksek düzeyde dirençli izolatlar tespit edilmiştir. MRSA enfeksiyonlarının yanı sıra VISA ve VRSA izolatlarıyla oluşan enfeksiyonların tedavisi için FDA onayı alan ek antimikrobiyaller bulunmaktadır (41).

Daptomisin de stafilokokal enfeksiyon tedavisinde kullanılabilir. Komplike olmayan MRSA deri enfeksiyonları için doksisisiklin, minosiklin, klindamisin, trimetoprim-sülfometaksazol ve linezolid sınırlı toksisiteye sahip, iyi bilinen ajanlardır. Tigesiklin genellikle diğer ilaçların yeterli olmadığı veya yerine birkaç ilacın gerekli olduğu enfeksiyonlar için ayrılmıştır. Tedizolid, oral ve parenteral preparatları olan umut verici yeni bir oksazolidinondur. MRSA'ya karşı aktif olan yeni ajanlar arasında sefalosporinler (seftobiprol ve seftarolin), lipoglikopeptidler (oritavancin, dalbavancin ve telavancin) ve geniş antibakteriyel spektruma sahip olan delafloksasin bulunmaktadır (41, 43).

2.8. *Staphylococcus aureus*'da Antimikrobiyal Direnç

Son yıllarda bakterilerin evrim geçirmesi ve yanlış, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı *S. aureus*'un özellikle MRSA'nın ilaç direncini de artırmıştır. *S. aureus* enfeksiyonu görülme oranı dünyada artmış olup klinik tedavisi de zorlaşmıştır (39).

Staphylococcus aureus, çoklu ilaç direnci ile bilinen bakterilerden oluşan ve insan sağlığına yönelik bir küresel tehdit oluşturan ESKAPE patojenleri (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter* türleri) grubuna dahildir (44, 45). *S. aureus* tedavisinde kullanılan çoğu antimikrobiyal ilaca karşı çeşitli direnç mekanizmaları geliştirmiştir. Bunlardan en önemlisi, beta-laktamlara, glikopeptidlere ve oksazolidinonlara karşı oluşan dirençtir (44).

2.8.1. Penisilin Direnci

Alexander Fleming'in 1928'de penisilini bulmasının ardından 1940'larda tedavide kullanılmaya başlanmıştır. İlk peniline dirençli *S. aureus* 1942'de izole edilmiş, 1950'lerde penisilinin tedavide kullanımının yaygınlaşmasıyla direnç giderek artmıştır (39, 46).

Penisiline dirençli *S. aureus* izolatları, penisilindeki beta-laktam halkasını hidrolize edebilen ve ilacın anti-bakteriyel aktivitesini etkisiz hale getiren penisilinaz (beta-laktamaz) üretebilmektedirler. Beta-laktamaz enzimi; *blaZ* geninde kodlanır ve *transpozon Tn 552* veya *Tn 552* benzeri elementler

tarafından taşınmaktadır (47). *S. aureus* tarafından sentezlenen beta-laktamazlar Bush sınıflamasında grup 2a'da, Ambler sınıflamasında ise sınıf A'da yer almaktadır. Beta-laktamazlar çoğu MRSA olmak üzere MSSA'lar tarafından da sentezlenmektedir (44).

2.8.2. Metisilin Direnci

Penisiline dirençli *S. aureus* enfeksiyonlarının tedavisinde, 1959'da kullanılmaya başlanan, beta-laktamaz hidrolizine dirençli, metisilin isimli yarı sentetik bir penisilin geliştirilmiştir. Patricia Jevons isimli İngiliz bilim insanı 1961'de ilk kez MRSA'yı izole etmiştir (39).

1961'den 1990'lara kadar MRSA hastanelerde görülmekte iken, 1990'larda MRSA enfeksiyonları toplumda da yaygınlaşmaya başladı (46).

MSSA izolatları PBP1, PBP2, PBP3 ve PBP4 sentezler. PBP2, transpeptidaz fonksiyonunun inaktive olması sonucu hücre ölümüne sebep olan bakterinin anahtar bir proteindir. Beta-laktam grubu antibiyotikler bu PBP'lere bağlanarak peptidoglikan tabakanın sentezinin bozulmasına ve bakteri ölümüne yol açar. MRSA izolatları ayrıca PBP2A (PBP2a veya PBP2') da sentezler (44). Metisilin direnci, MSSA'nın hareketli stafilokokal kaset kromozom elementine (SCCmec) entegre olan PBP2a veya PBP2' kodlayan *mecA* geni aracılığı ile gerçekleşir. Bu enzimlere beta-laktam grubu antibiyotikler bağlanamaz ve dolayısıyla bu antibiyotiklerin hücre duvarı oluşumunu bozması engellenemediği için direnç oluşur (39).

SCCmec elemanları yapısal ve genetik çeşitliliğine göre tipI'den tip VII 'e kadar sınıflandırılmıştır (48). *mecA* geni, konjugasyon veya transdüksiyon yoluyla aktarılmaktadır (49).

İngiltere'de yapılan bir çalışmada oksasilin ve metisiline dirençli ancak *mecA* geni bulundurmayan bir *S. aureus* izolatına genom dizi analizi uygulanmış, *mecA* geni ile %69 ve PBP'lerin amino asit kombinasyonu ile %63 benzerlik gösteren, homolog bir gen tespit edilerek 2012 yılında *mecC* (eski adıyla *mecA_{LGA251}*) olarak isimlendirilmiştir. Saptanan *mecC* izolatlarının çoğunluğu, coğrafi bölge ve konaktan bağımsız olarak tek bir MRSA soyuna yani ST130'a aittir (50, 51).

PBP2a bulunan izolatlar, seftobiprol ve seftarolin dışındaki tüm beta-laktam antibiyotiklere dirençli olup MRSA olarak isimlendirilir (44).

Staphylococcus aureus'un az bilinen ve ihmal edilen bir alt grubu ise, sınırda oksasiline dirençli *S. aureus*'tur (BORSA). Hem toplumdan hem de hastaneden elde edilen BORSA, penisilinaza dirençli penisilinlere orta düzeyde direnç ile karakterizedir ve oksasilin MİK'leri 1 ila 8 mg/L arasındadır. Gerçek anlamda metisiline dirençli veya metisiline duyarlı değildirler ve *mecA* geni bulundurmazlar. Şiddetli BORSA enfeksiyonları yüksek dozda oksasiline yanıt veremeyebileceği için sık sık yanlış tanımlanmakta ve hastanın tedavisi açısından önemli bir tehdit oluşturmaktadır (45).

2.8.3. Glikopeptid Direnci

Glikopeptid antibiyotikler, Lipid II monomerlerinin (N-asetil -muramik pentapeptid) D-alanin D-alanin terminaline hidrojen bağları ile bağlanarak hücre duvarında bulunan peptidoglikan tabakasında transpeptidasyonu ve transglikozilasyonu engeller. Gram pozitif bakterilere karşı etkilidir ancak gram negatif bakterilerin duvar yapısının büyük ve karmaşık olması, dış zardan geçememeleri nedeniyle lipid II hedefine ulaşamaz ve glikopeptid antibiyotiklere karşı intrensek direnç görülür (52).

Vankomisin, hastanede yatan ve MRSA izolatlarının neden olduğu ciddi enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılan güvenilir ve ilk olarak tercih edilen glikopeptid grubu bir antibiyotiktir (4, 47). Vankomisin, penisiline dirençli stafilokokları tedavi etmek için FDA onayıyla ilk kez 1955 yılında kullanılmıştır. Vankomisine ilk dirençli izolat 1987'de bildirilmiştir. Son zamanlarda ise yoğun bakım ünitelerinde *Enterococcus faecalis* enfeksiyonlarının yaklaşık %30'dan fazlasında vankomisine direnç saptanmaktadır. Enterokoklarda en sık karşılaşılan direnç mekanizması VanA tipi dirençtir ve transpozon *Tn 1546* varlığı ile oluşur (52). Vankomisin dirençli enterokoklardan VanA transferi sonucu *S. aureus*'ta direnç gelişmiş ve ilk VRSA izolatı (vankomisin MİK> 256 µg/mL; teikoplanin MİK=128 µg/mL) 2002'de ABD'de bildirilmiştir (52, 53). Enterokoklarda vankomisine yüksek düzeyde direnç olması ve VanA taşıyan plazmidin

enterokoklardan *S. aureus*’a transferinin gösterilmiş olması *S. aureus*’ta ortaya çıkan direncin nedeni olabileceğini düşündürmektedir (4).

Vankomisine dirençli *S. aureus*’ta tespit edilen tek direnç mekanizması VanA tipidir (52).

İlk VISA izolatu 1996’da, Japonya’da vankomisin tedavisine dirençli bir yara yeri enfeksiyonundan izole edilmiştir. Sternal insizyon bölgesindeki pürülan akıntıdan ve debridman örneğinden izole edilen bu MRSA izolatının (Mu50), SMD yöntemi ile vankomisin için MİK değeri 8 mg/L bulunmuş ve vankomisine karşı duyarlılıkta azalma saptanmıştır (4). Ülkemizde ise ilk hVISA izolatu 1998 yılında bildirilmiştir (54).

İlk klinik VISA izolatının bildirilmesinden önce *S. aureus*’ta teikoplanin duyarlılığının azaldığı bildirilmiştir. Ancak, *S. aureus*’ta teikoplanin duyarlılığının azalması vankomisin duyarlılığında azalma olmadan olabilir fakat vankomisin duyarlılığında azalma olan izolatlarda teikoplanin duyarlılığında azalma gösterilmiştir (53).

VISA’da vankomisine karşı azalan duyarlılığın bir nedeninin hücre duvarı sentezini artıran içsel bir mekanizma (hücre duvarının iki kat kalın olması, PBP 2a, PBP2 ve hücre duvarı murein öncüllerinin üretiminde üç kat artış olması gibi) olabileceği düşünülmektedir. VISA izolatlarında vanA veya vanB genlerine rastlanılmamaktadır (4). VISA oluşumunda bazı walkR, rpoB, vraSR ve mprF gibi genlerdeki mutasyonlar etkindir. Bu mutasyonların hücre duvarı sentezinde ve kalınlığında artışa neden olması, virülansın zayıflaması ve azalmış otoliz gibi fenotipik değişiklikler sağladığı düşünülmektedir (55, 56).

hVISA, VISA’nın öncüsüdür ve çeşitli derecelerde vankomisin direncine sahip hücre alt popülasyonlarından oluşur. hVISA MİK değeri 8 mg/L olan mu50 izolatu ve VISA MİK değeri 2 mg/L olan mu3 izolatu ilk tanımlanan izolatlardır. Hem VISA hem de hVISA klinik olarak vankomisin dirençli enfeksiyona neden olur (51). Bu izolatlar uzun süreli vankomisin tedavisi gören MRSA enfeksiyonlu hastalarda daha sık ortaya çıkmaktadır (52).

EUCAST’e (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) göre *S. aureus* vankomisin MİK sınır değeri ≤ 2 mg/L ise duyarlıdır. Bir *S. aureus* izolatu vankomisine yüksek düzeyde (MİK>8mg/L) direnç gösteriyorsa

VRSA; düşük düzeyde (MİK 4-8 mg/L) direnç gösteriyorsa VISA olarak tanımlanır. Vankomisine duyarlı (MİK $\leq$ 2 mg/L) bulunan fakat altın standart yöntem olan popülasyon dizi analizi ile vankomisin MİK $>$ 2 mg/L olan heterojen bir grup bulunur ve hVISA olarak tanımlanır (57).

Avrupa'da yapılan bazı çalışmalardan elde edilen verilere göre, MRSA izolatlarında VISA oranının %0.1'den az, hVISA oranının ise %2'den az olduğu düşünülmekte olup henüz VRSA izolatına rastlanmamıştır. Coğrafik olarak hVISA sıklığı değişmekte ve bazı bölgelerde yüksek olabilmektedir. VISA ve hVISA'nın çoğunluğu ise MRSA'dır (57). Ancak metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA) izolatları arasında da tespit edilebilir (53).

VISA ve hVISA sıklığı özellikle Amerika ve Asya'da son yıllarda artış göstermektedir. 2020'de Shariati ve ark.'nın yaptığı bir çalışma verilerine göre, VISA ve hVISA'nın sırasıyla 2010 yılından önce prevalansı %1.2 ve %4 olarak saptanmış, 2010-2019 yıllarında prevalansının %4.3 ve %5.3'e çıktığı görülmüştür. VISA en yaygın olarak Asya'da (%2,1), ardından Afrika ve Avrupa (%1,8), Kuzey ve Güney Amerika (%1) ve Okyanusya'da (%0,6) görülmüştür; hVISA en yaygın olarak Okyanusya'da (%11,2), ardından Kuzey ve Güney Amerika (%5,2), Asya (%4,7), Avrupa (%4,4) ve Afrika'da (%4) görülmüştür (56).

VRSA'nın sıklığı ise son 20 yılda devamlı olarak artarak 2006'dan önce %2, 2006-2014 yılları arasında %5, 2015-2020 yılları arasında %7 olmuştur. *S. aureus* izolatları arasındaki VRSA oranının ise kıtalara göre bakıldığında Afrika'da %16, Asya'da %5, Kuzey Amerika'da %4, Güney Amerika'da %3 ve Avrupa'da %1 olduğu görülmüştür. Afrika ve Asya gibi düşük ve orta gelirli kıtalarda VRSA'nın daha sık görülmesinin nedeni olarak hijyen koşullarının kötü olması ve antimikrobiyal yönetimin daha az uygulanması olabileceği düşünülmektedir (56).

VISA ve hVISA enfeksiyonu için en önemli risk faktörleri; önceden geçirilmiş MRSA enfeksiyonu/kolonizasyonu veya daha önceden vankomisin tedavisi almış olmaktır. Diyabet, malignite, ameliyat geçirmiş olmak gibi altta yatan hastalığın olması, endokardit, derin apse veya protez eklem eklem enfeksiyonu gibi bakteri yükünün fazla olabileceği durumlar ve antibiyotiklerin bu enfekte bölgelere geçişinin az olması, yoğun bakım ünitesinde kalma, glikopeptid antibiyotiklerle

tedavi başarısızlığı, tedavi sürecinin başlarında düşük vankomisin düzeyi uygulanması gibi faktörler VISA ve hVISA oluşumunda rol oynamaktadır (53).

2.9. Delafloksasin

Akut bakteriyel deri ve deri yapısı enfeksiyonu görülen ve önceden antibiyotik tedavisi almış hastalardaki kronik enfeksiyonlar çoğunlukla polimikrobiyaldir ve geniş spektrumlu antibiyotik tedavisine ihtiyaç duyulur. ABDYE'lerde, MRSA başta olmak üzere antibakteriyel dirençli izolatların dünyada yaygın hale gelmesi büyük bir tedirginlik oluşturmuştur ve yeni antibakteriyellere olan ihtiyacı artırmıştır (33, 58).

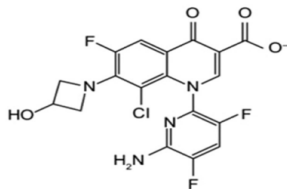
Kinolonlar, idrar yolu enfeksiyonlarının, solunum yolu enfeksiyonlarının, ABDYE'lerin ve karın içi enfeksiyonların tedavisinde kullanılan mikroorganizmalara karşı etkindir (59). Fakat yaygın ve yanlış kullanım, kısa bir sürede tüm bakteri türlerinde dirençli izolatların ortaya çıkmasına ve yayılmasına neden olmuştur (8).

Delafloksasin de akut bakteriyel deri ve deri yapısı enfeksiyonlarının ve TKBP'si olan hastaların tedavisi için FDA onayı almış yeni bir kinolon grubu antibiyotiktir (7).

Delafloksasin, MRSA (hem kinolonlara duyarlı hem de dirençli) dahil olmak üzere *S. aureus*'a ve çoklu ilaca dirençli izolatlara karşı etkilidir (59). Delafloksasin, çok çeşitli bakterilere karşı hem in vitro hem de in vivo geniş bir antibakteriyel spektruma sahiptir. Gram-pozitiflere (florokinolona duyarlı olmayan MRSA ve MSSA izolatlarına karşı aktivite dahil olmak üzere *S. aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus anginosus* grubu, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptokok mitis* grubu, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis*), gram-negatiflere (*Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* ve *Pseudomonas aeruginosa*), anaeroblara (Siprofloksasin ve levofloksasinin aksine *Clostridium perfringens*, *Bacteriodes fragilis*, *Prevotella sp*, *Peptostreptococcus* ve *Bacteroides thetaiotaomicron*'a karşı etkili), atipik solunum patojenlerine (*Legionella* spp, *Chlamydia pneumoniae* ve

Mycoplasma pneumoniae dahil), cinsel yolla bulaşan hastalık patojenlerine (*Neisseria gonorrhoea* ve *Ureaplasma* türleri de dahil olmak üzere) karşı aktiviteye sahiptir. Ayrıca delafloksasinin asidik ortamda artan antibakteriyel etkinliği, *Helicobacter pylori* enfeksiyonlarının tedavisine de kullanıma olanak sağlar. (7, 33, 60-62).

Delafloksasin bakterilerin hem bakteriyel DNA giraz (topoizomeraz II, gram negatif bakterilerde florokinolon inhibisyonuna daha duyarlı) hem de topoizomeraz IV (Gram pozitif bakterilerde inhibisyona daha duyarlı) enzimlerini eşit afinite ile hedefleyen tamamen sentetik anyonik bir florokinolondur. Her iki topoizomeraz enzimini etkileyen çeşitli mutasyonların birikmesi sonucu direnç gelişebilir. Kimyasal yapısı 1-(6-amino-3,5-difloro-2-piridinil)-8-kloro-6-floro-7-(3-hidroksi-1-azetidini)-4-okso-1,4-dihidro-3-kinolinkarboksilatır (Şekil 2.1). Kinolonların kimyasal yapısındaki üç değişiklik, delafloksasini diğer kinolonlardan ayırır ve ona çeşitli antimikrobiyal avantajlar sağlar. N1 pozisyonunda daha geniş bir moleküler yüzey sağlayan heteroaromatik halkanın varlığı diğer kinolonlara göre antibakteriyel aktivitesini artırır. C8 pozisyonunda zayıf bir polarite olması kinolon dirençli gram-pozitif bakterilere karşı potansiyel antibakteriyel etkisini artırır ve ayrıca anaerobik bakterilere karşı etkinliğini artıran, güçlü polarite sağlayan bir klor atomuna sahiptir. C7 pozisyonunda bazik bir grubun bulunmaması ise onu zayıf asidik bir molekül yapar ve asidik pH ile antibiyotik yüksüz kalarak biriktiği bakteri hücrelerine transmembran transferine yardımcı olması sonucu asidik ortamlarda (örneğin fagolizozomlarda; biyofilmde ve ayrıca ciltte; yumuşak dokuda ve apselerde) antibakteriyel aktivitesini artırır (33, 61, 62).



Şekil 2.1. Asidik pH'a göre delafloksasinin benzersiz anyonik yapısı (Kocsis'den, (62).

Siprofloksasin ve moksifloksasin gibi diğer kinolonların MİK'leri pH düştükçe artarken, delafloksasin için zaten güçlü olan MİK'ler azalan pH'da daha da düşük değerlere kayar (59).

İn vitro çalışmalara göre, delafloksasinin ilaç-ilaç etkileşimi potansiyeli düşüktür (33). Delafloksasinin oral biyoyararlanımı %59 kadar olup gıdayla değişmez ancak ilaçlarla veya Al, Mg, Fe, Zn gibi çok değerlikli metal katyonları içeren ürünlerle birlikte alındığında önemli ölçüde azalabilir (61). Delafloksasin temel olarak glukuronidasyon yoluyla (esas olarak UGT1A1, UGT1A3 ve UGT2B15 ile) metabolize edilir. Değişmemiş ana ilaç plazmadaki baskın bileşendir ve dolaşımda önemli metabolitleri yoktur (33).

Delafloksasin intravenöz ve oral formülasyon olarak mevcuttur, QTc aralığını klinik açıdan anlamlı ölçüde değiştirmez ve olumlu bir farmakokinetik profile sahiptir (iyi oral biyoyararlanım, düşük ilaç-ilaç etkileşimi potansiyeli ve günde iki keze uygun bir rejim). Şiddetli böbrek yetmezliği olan hastalarda intravenöz yolda (oral değil) delafloksasin doz ayarlaması yapılması gereklidir (33). Karaciğer yetmezliği olan hastalarda doz ayarlaması gerekli değildir. Hamilelerde ve emziren kadınlarda delafloksasin ile ilgili herhangi bir çalışma bulunmamaktadır (61). Pediatrik yaş grubunda ise kullanımı kontrendikedir (62).

2.9.1. Delafloksasin ve Diğer Florokinolonlar'a karşı Direnç

Florokinolonlara karşı oluşan direnç florokinolon kullanımını kısıtlamış ve dünyada bir sorun haline gelmiştir. Florokinolon direnci kromozomal mutasyonlar, plazmid aracılı direnç genlerinin edinilmesi ve efflux pompalarının (NorA, NorB, NorC) aşırı ekspresyonu ile oluşabilmektedir. Efflux pompalarının aşırı ekspresyonu ile oluşan direnç MİK değerini dört ila sekiz kat artırmaktadır. Kromozomal mutasyonlar ana direnç mekanizmasıdır ve öncelikli hedef olan topoizomera IV'ün (ParC en yüksek duyarlılığa sahip bir topoizomeraştır) ve ikincil hedef olan DNA girazın (gyrA) kinolon direncini belirleme bölgesinde oluşmaktadır (47, 63).

Stafilokoklar florokinolonlara genellikle duyarlı mikroorganizmalardır. MİK kırılma noktasını aşan bir direnç oluşması için hem topoizomera hem de DNA girazda bir mutasyon olması gerekir. Sıklıkla tek bir aminoasitteki değişim MİK değerini sekiz ila 16 kat artırır. İki mutasyonel değişim, iki farklı hedefe etki eden antibiyotiğin kombinasyonu ile direncin ortaya çıkışını engeller (47).

Delafloksasinin diğer florokinolonlara kıyasla gram pozitif bakterilerdeki hedef enzim mutasyonlarına karşı daha fazla stabilitesi olduğu görülmektedir. Bu stabilitenin ilacın moleküler şekli, polaritesi ve çift hedefleme aktivitesinin varlığı tarafından sağlandığı düşünülmektedir (64).

Delafloksasin diğer florokinolonlar gibi DNA giraz ve topoizomerazın birini seçmez, aksine her ikisini de aynı anda hedefler. Bu durum her iki hedefte de eş zamanlı çoklu mutasyonlar gerektireceğinden, delafloksasin dirençli mutasyonların oluşma olasılığını azaltır. Delafloksasine dirençli *S. aureus* izolatlarındaki *gyrA* genindeki S84L ve *parC* genindeki S80Y/F mutasyonları en sık görülen mutasyonlardır. Bu mutasyonlar levofloksasin ve siprofloksasine dirençli, delafloksasine duyarlı *S. aureus* izolatlarında da görüldüğü için delafloksasin direnci için önemli olmakla birlikte yeterli olmadığı görülmektedir. Hem DNA giraz hem de topoizomeraz IV'te tek bir eş zamanlı mutasyon yalnızca hafif bir MİK artışına yol açmaktadır. *S. aureus* için daha yüksek MİK değerleri hem *gyrA*'da (çoğunlukla E88K ve S84L) hem de *parC*'de (çoğunlukla E84G ve S80Y/F) en az iki mutasyonla birlikte ortaya çıkmaktadır. Farklı olarak, *parC*'deki 84. pozisyonadaki mutasyon yüksek düzeyde dirence yol açtığından, delafloksasine karşı azalmış duyarlılıkta önemli bir nokta gibi görünmektedir. Plazmid ile kodlanan *qacC* geni de (MFS tipi bir effluks pompasını kodlar) *S. aureus* izolatlarında delafloksasin direncinde rol oynayabilmektedir (59, 63). *S. aureus*'ta da effluks taşıyıcıları florokinolon direncine katkıda bulunur ancak delafloksasin direncinde in vitro aktiviteyi etkilediği gösterilememiştir. Bir in vitro duyarlılık çalışmasında, NorA effluks pompasının up-regülasyonu ile birlikte tek bir topoizomeraz nokta mutasyonu olan, delafloksasine dirençli bir adet *S. aureus* izolatı tanımlanmıştır (64).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmanın İzni

Bu çalışma Hitit Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 28/02/2023 tarihinde 2023-20 karar numarası ile onaylanmıştır.

3.2. *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Toplanması

Çalışmaya Haziran 2021 ve Ekim 2023 tarihleri arasında Hitit Üniversitesi Çorum Erol Olçok Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı bakteriyoloji bölümüne gönderilen klinik örneklerden (yara, doku, derin trakeal aspirat [DTA], balgam) izole edilen toplam 105 *S. aureus* izolatı dahil edildi. Bir hastanın farklı klinik örnek kültüründe de *S. aureus* izole edildiğinde örnek türlerinden sadece ilki çalışmaya dahil edildi.

3.3. *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Tanımlanması

Laboratuvarımıza gelen hasta numunelerinden besiyerinde üreyen kolonilerden stafilokok morfolojisi ile uyumlu koloniler konvansiyonel yöntemler ve kütle spektrometrisi birlikte kullanılarak tanımlandı.

3.3.1. Konvansiyonel Yöntemlerle *Staphylococcus aureus*'un Tanımlanması

Laboratuvarımıza gelen balgam, DTA, yara kültürü ve doku kültürü örnekleri normal atmosferik şartlar altında, 37 °C'de ve 18-24 saat inkübe edildikten sonra, KKA'da üreyen *S. aureus* kolonilerine benzeyen kolonilere Gram boyama yapıldı. Gram boyamada gram pozitif kümeler oluşturmuş kokların görüldüğü kolonilere katalaz ve tüpte koagülaz testleri uygulandı ve pozitif çıkan bakteriler *S. aureus* olarak isimlendirildi.

3.3.2. K t le spektrometrisi temelli yöntemlerle *Staphylococcus aureus*'un Tanımlanması

Çalışmamızda konvansiyonel yöntemle *S. aureus* olarak tanımlanan izolatların tamamı Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Bruker Microflex Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonics, Almanya) ile de tanımlandı. Koloni  ze ile alınarak MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Almanya) metal plakası üzerindeki işaretli bölgeye konuldu, üzerine 1  l formik asit eklenip (Formik Asit hücre duvarını "sindirir" ve matriksin tanımlama için kullanılan ribozomal proteinleri  evrelemesine ve iyonize etmesine olanak tanır) kurumaya bırakıldı ve kuruma gerçekleşince tekrar koloni üzerine 1  l matriks solüsyonu (10 mg/ml  -siyano-4-hidroksisinamik asit, %50 asetonitril, %2,5 trifloroasetik asit) (mikrobiyal moleküllerin ayrışmasını sağlayarak parçalanmasını önler) pipetlenerek oda ısısında kurumaya bırakıldı. Hazırlanan metal plak MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Almanya) cihazına konularak Flex Analysis bilgisayar programı ile k t le spektrometreleri elde edildi. Elde edilen protein profilleri Bruker BioTyper v3.1 yazılımı ve rutin veri tabanı kullanılarak incelendi ve mikroorganizmalar tanımlandı.

MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Almanya) cihazına tanımlama için yüklenen bakteri, lazer ışınları ile iyonize hale geçip hızlandırılarak elektromanyetik alandan geçer. Burada serbest forma geçen genellikle tek yüklü iyonlar uçuş tüpüne ilerler ve iyonların geçirdikleri zamana göre k t le spektrumu elde edilir. Hücrelerde bol bulunan,  vre ve bakterilerin üreme koşullarından en az etkilenen ribozomal proteinler sayesinde her bakteri için ayrı bir k t le spektrumu elde edilir (65).

3.4. *Staphylococcus aureus* İzolatların Saklanması ve Canlandırılması

Çalışmaya dahil edilen izolatlar çalışma gününe kadar -80 C'de, %15 gliserol içeren Beyin Kalp İnfüzyon (BKİ) broth besiyeri içerisinde saklandı. Çalışma günü, stok bakteri kültürlerinin oda sıcaklığında çözünmesi sağlandı ve %5

KKA plağına seyreltme ekim ile pasajları yapılarak 18-24 saat 37°C’de inkübe edildi.

SS3.5. *Staphylococcus aureus* İzolatlarında Metisilin Direncinin Belirlenmesi

3.5.1. Sefoksitin Disk Difüzyon Yöntemi ile Metisilin Direncinin Belirlenmesi

Çalışmamızda, *S. aureus* izolatlarının metisilin direnci Kirby-Bauer disk difüzyon testi yöntemi ile belirlendi. İzolatlar serum fizyolojik içerisinde homojenize edilerek 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlandıktan sonra, steril bir eküvyonla Müller Hilton Agar (MHA) plağına üç farklı yönde homojen bir şekilde inoküle edildi ve sefoksitin (30 µg) (Bioanalyse, Türkiye) antibiyotik diski yerleştirildi. MHA plakları etüvde 37°C sıcaklıkta 18-24 saat normal atmosferik koşullarda inkübe edildi. İnkübasyon tamamlandıktan sonra sefoksitin’e ait zon çapları ölçüldü ve EUCAST uluslararası antimikrobiyal duyarlılık rehberine göre metisilin direnci belirlendi. Sefoksitin zon çapı ≥ 22 mm olan *S. aureus* izolatları metisilin duyarlı, zon çapı < 22 mm olan *S. aureus* izolatları metisilin dirençli olarak değerlendirildi (66, 67).

3.5.2. Otomatize Antimikrobiyal Duyarlılık Sistemi ile Metisilin Direncinin Belirlenmesi

İzolatların otomatize antimikrobiyal duyarlılık sistemi ile metisilin direncinin belirlenmesi Hitit Üniversitesi Erol Olçok Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı’nda VITEK 2 Compact (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemi kullanılarak yapıldı. VITEK 2 AST GP kartlarındaki (P664-P640) sefoksitin tarama ve oksasilin MİK sonuçları EUCAST önerileri doğrultusunda değerlendirilmektedir. Oksasilin MİK > 2 mg/L olan izolatlar metisilin dirençli, MİK ≤ 2 mg/L olan izolatlar metisilin duyarlı olarak

değerlendirildi. Sefoksitin tarama sonucu pozitif olan izolatlar metisilin dirençli, negatif olan izolatlar metisilin duyarlı olarak değerlendirildi.

3.5.3. Moleküler Yöntemle *mecA* ve *mecC* Saptanması

DNA ekstraksiyonu yapılacak izolatlar bir gün öncesinden stok besiyerinden alınıp KKA besiyerine ekimleri yapılarak normal atmosferik şartlar altında 37°C’de 18-24 saat inkübe edildi. Saf üreyen *S. aureus* izolatlarının gen analizi için polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi kullanıldı. DNA izolasyonu yapıldıktan sonra *mecA* ve *mecC*’ye özgü primerler ile PZR yöntemi uygulandı. PZR ile çoğaltılan DNA bölgeleri agaroz jel elektroforezi ile yürütülüp transillüminatör üzerine alınarak ultraviyole ışık altında bantlar görüntülendi.

DNA Ekstraksiyonu

DNA’yı izole etmek için EURx GeneMATRIX TISSUE & BACTERIAL DNA Purification kiti (v. 1.3 EURx, Gdańsk, Poland) üretici firmanın talimatları doğrultusunda kullanıldı.

PZR Yöntemi ile DNA’nın Çoğaltılması

S. aureus izolatları için *mecA* ve *mecC* gen bölgesi PZR yöntemi ile araştırıldı. Pozitif kontrol olarak metisilin dirençli *S. aureus* NCTC 12493 (*mecA* pozitif) izolatı ve metisilin dirençli *S. aureus* NCTC 13552 (*mecC* pozitif) kullanıldı. Liyofilize haldeki *mecA* ve *mecC* primerleri (Metabion) distile su ile 5 µM konsantrasyonda olacak şekilde sulandırıldı. Primer süspansiyonları alikotlanarak çalışma gününe kadar -20°C’de saklandı.

Her bir izolat için ependorflara 24 µl PZR karışımı ve 1 µl ekstraksiyonu yapılmış bakteri DNA’sı toplam reaksiyon hacmi 25 µl olacak şekilde hazırlandı. PZR işlemi, Thermal Cycler (Master Cycler, Eppendorf, Germany) cihazında gerçekleştirildi. *mecA* ve *mecC* için kullanılan primer dizisi Tablo 3.1’de, *mecA* için kullanılan protokol Tablo 3.2’de, *mecC* için kullanılan protokol Tablo 3.3’te, her bir reaksiyon için hazırlanan PZR karışımı içeriği ise Tablo 3.4’te açıklandı.

Tablo 3.1. *mecA* ve *mecC* gen bölgesi için kullanılan primer dizisi

Hedef Gen	Oligonükleotid dizisi (5'-3')	Baz çift (bç)	Referans
<i>mecA</i>	F: TCCAGATTACAACCTTCACCAGG	162 bç	(Cikman'dan, (48))
	R: CCACTTCATATCTTGTAACG		
<i>mecC</i>	F: GAAAAAAAGGCTTAGAACGCCTC	138 bç	
	R: GAAGATCTTTTCCGTTTTCAGC		

Tablo 3.2. *mecA* gen bölgesi için amplifikasyon prosedürü (Cikman'dan, (48))

<i>mecA</i>	İlk denatürasyon	94 °C	4 dakika	1 döngü
	Denatürasyon	94 °C	30 saniye	30 döngü
	Bağlanma	53 °C	30 saniye	
	Uzama	72 °C	1 dakika	
	Son uzama	72 °C	4 dakika	1 döngü

Tablo 3.3. *mecC* gen bölgesi için amplifikasyon prosedürü

<i>mecC</i>	İlk denatürasyon	94 °C	4 dakika	1 döngü
	Denatürasyon	94 °C	30 saniye	35 döngü
	Bağlanma	55 °C	30 saniye	
	Uzama	72 °C	1 dakika	
	Son uzama	72 °C	10 dakika	1 döngü

Tablo 3.4. *mecA* ve *mecC* PZR reaksiyon içeriği

PZR bileşenleri	Her bir reaksiyondaki hacim	Karışımındaki son konsantrasyon
DNA	1 µl	
Primer-F	1 µl	200 nM
Primer-R	1 µl	200 nM
DNA polimeraz	0,25 µl	0,05 U/µl
dNTP	1 µl	200 µM
10X Tampon	2,5 µl	1X
MgCl ₂	1,5 µl	1,5 mM
dH ₂ O	16,75 µl	
Toplam	25 µl	

Agaroz Jel Elektroforezi

PZR ile amplifikasyonun sonunda çoğalan DNA'ların görüntülenmesi için % 2'lik agaroz içeren 1 litre hacimde 1x Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) ile agaroz jel hazırlandı. %2 konsantrasyonda agaroz jel elde etmek için hassas terazide tartılan 1,6 gr agaroz, 80 mL 1x TAE tampon çözeltisinde mikrodalga fırın kullanılarak homojen şekilde çözdürüldü ve 45- 50°C'ye soğumaya bırakıldı. 7 µl etidyum bromid solüsyonu eklendi ve tank havuzuna döküldü, taraklar yerleştirildi ve tamamen soğumaya bırakıldı. Soğuma gerçekleşince taraklar çıkarıldı. Hibriğin 100 bç DNA Ladder Plus belirteci birinci kuyucuğa yüklendi. 10 µl *mecA* ya da *mecC* pozitif izolat amplifikasyon ürünü loading buffer ile karıştırıldı ve ikinci kuyucuğa yüklendi. Geri kalan kuyucuklara diğer örneklerin 10 µl amplifikasyon ürünleri loading buffer ile karıştırılarak yüklendi. DNA bantları 100 bç DNA ladder belirteci ve *mecA* ve *mecC* nin pozitif kontrolü ile karşılaştırıldı. *MecA* için amplifikasyon ürünleri elektroforez tankında (Biorad) 100 voltta 60 dakika ve *mecC* için 130 voltta 45 dakika yürütüldü ve agaroz jel, transillüminatöre (Major Science) aktararak ultraviyole ışık altında bantlar görüntüledi.

3.6. *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Glikopeptid Duyarlılıklarının

Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi İle Tespiti

S. aureus izolatlarının teikoplanin ve vankomisin MİK değerleri SMD yöntemi ile EUCAST önerilerine uyularak tespit edildi.

Katyon Ayarlı Müller Hinton Broth (KAMHB) besiyeri (BD BBL Müller-Hinton II Broth) ile vankomisin (Carbosynth, İngiltere) ve teikoplanin (Carbosynth, İngiltere) antibiyotiğinin toz şekli sıvı mikrodilüsyon yönteminde kullanılmıştır. Antibiyotik stok çözeltileri, üretici firmaların önerileri ile EUCAST'ın ve Clinical and Laboratory Standards Institute'nin (CLSI) önerileri doğrultusunda hazırlandı (68, 69).

3.6.1. Vankomisin ve Teikoplanin Stok Çözeltisinin Hazırlanması

1280 mg/L konsantrasyonda (C) vankomisin ve teikoplanin stok çözeltisi oluşturmak için üretici firmanın talimatları uygulandı. Distile su antibiyotik tozlarını çözücü ve sulandırıcı olarak kullanıldı. Her iki antibiyotik için işlem ayrı ayrı gerçekleştirildi.

$$\text{Ağırlık (mg)} = \text{Hacim (mL)} \times \text{İstenen konsantrasyon (C, } \mu\text{g/mL)} / \text{Potens (} \mu\text{g/mg)}$$

Tartılan antibiyotik tozları 10 mL distile su ile homojen olana kadar karıştırıldı ve 1'er mL olacak şekilde alikotlandı ve çalışma gününe kadar -20°C'de saklandı.

3.6.2. Bakteri İnokulumunun Hazırlanışı

KKA'daki *S. aureus* kolonilerinden 0,5 McFarland bulanıklığında (10^8 koloni oluşturan birim [CFU]/mL) hazırlanan süspansiyondan 10 µl alınarak 990 mikrolitre (µl) KAMHB besiyeri ile dilüe edildi ve bakteri süspansiyonunun konsantrasyonu 1×10^6 CFU/mL oldu. Antimikrobiyal duyarlılık testinde *S. aureus* ATCC 29213 kalite kontrol suşu kullanıldı.

3.6.3. Mikrodilüsyon Plaklarının Hazırlanması ve Değerlendirilmesi

1280 mg/L konsantrasyondaki stok antibiyotik çözeltisinden 1 mL alınarak 9 mL distile su ile 1/10 oranında dilüe edilerek 128 mg/L konsantrasyonda antibiyotik çözeltisi elde edildi. SMD yöntemi için steril U tabanlı 96'lık mikropalaklar kullanıldı. İlk olarak sekizli pipet kullanılarak son iki sütundaki besiyeri kontrolü ve üreme kontrolü haricindeki tüm kuyucuklara 50 µl KAMHB pipetlendi. Besiyeri kontrolü olan 11. sütundaki kuyucuklara 100 µl KAMHB, üreme kontrolü olan 12. sütundaki kuyucuklara 50 µl KAMHB ve 50 µl bakteri inokulumundan pipetlendi ve her iki sütundaki kuyucuklara antibiyotik stok çözeltisinden ilave edilmedi. İlk sütundaki kuyucuklara sekizli pipet kullanılarak 128 mg/L konsantrasyonundaki antibiyotik stok çözeltisinden 50 µl pipetlendi. İlk sütundaki kuyucuklardan sekizli pipet kullanılarak 50 µl alınıp 10. sütundaki

kuyucuklar dahil olmak üzere iki kat seri dilüsyon yapıldı. 10. sütundaki kuyucuklardan 50 µl alınıp dışarı atıldı. İlk sütundaki kuyucuklarda antibiyotik konsantrasyonu 64 mg/L, 10. sütundaki kuyucuklardaki antibiyotik konsantrasyonu 0,125 mg/L oldu. İlk 10 sütuna 8’li pipet yardımı ile 1×10^6 CFU/mL konsantrasyondaki bakteri süspansiyonu 50 µl pipetlendi ve ilk 10 sütundaki her kuyucukta bakteri süspansiyonunun konsantrasyonu 5×10^5 CFU/mL’ye düştü. Antibiyotik konsantrasyonu ise birinci sütunda 32 mg/L, 10. sütunda ise 0,06 mg/L oldu. Steril kapakla mikropiplakların üzeri kapatıldı ve $35 \pm 2^\circ\text{C}$ ’de 24 saat inkübasyona bırakıldı.

İnokülasyondan hemen sonra üreme kontrol kuyusundan eş zamanlı inkübasyon için KKA’a pasaj yapılarak inokulumun saflığı kontrol edildi. Ayrıca doğru inokulum varlığının (5×10^5 CFU/mL) kontrolü için başlangıç inokulumdan (10^6 CFU/mL) 10 µL alınarak 10 mL tuzlu suda seyreltildi ve KKA’a 100 µL ekilerek inkübe edildi. İnkübasyondan sonra koloni sayısı yaklaşık 20-80 ise; inokulum saf ise; pozitif kontrol kuyusunda üreme var ise test geçerli kabul edildi, test değerlendirildi. Kuyucuklarda bulanıklık veya kuyucuğun dibinde hücre birikiminin görülmesi üreme varlığı olarak değerlendirildi, organizmanın gözle görülen üremesini tamamen engelleyen en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlendi (68). Belirlenen MİK değerleri EUCAST’da belirtilen *S. aureus* izolatlarının vankomisin ve teikoplanin MİK değerlerine göre yorumlandı. *S. aureus* için EUCAST’te belirlenen vankomisin ve teikoplanin MİK sınır değerleri Tablo 3.5’te açıklanmıştır (66).

Tablo 3.5. EUCAST’in *S. aureus* için belirlenmiş vankomisin ve teikoplanin MİK sınır değerleri (66)

MİK Değerleri (mg/L)	<i>S. aureus</i>	
	S	R
Vankomisin	≤ 2	> 2
Teikoplanin	≤ 2	> 2

S: duyarlı, R: dirençli

3.7. *Staphylococcus aureus* İzolatlarında hVISA Taraması

3.7.1. Teikoplanin Tarama Agar Yöntemi ile hVISA Taraması

5 mg/L teikoplanin içeren Müller Hinton plağı EUCAST'ın önerileri ile hVISA taraması için kullanıldı. 5 mg/L teikoplanin içeren Müller Hinton plağı hazırlarken öncelikle üretici firma talimatları doğrultusunda balon jode toz MHA besiyeri (Condalab, İspanya) distile su ile homojen şekilde çözdürüldü. MHA besiyeri otoklavda 15 dakika 121°C'de steril edilip oda sıcaklığında 45°C'ye kadar soğutuldu. MHA besiyerine eklenmesi gereken 1280 mg/L konsantrasyonundaki teikoplanin stok çözeltisi miktarı $C1 \times V1 = C2 \times V2$ formülü ile hesaplandı. İki litre 5 mg/L teikoplanin içeren Müller Hinton plağı elde etmek için 7,81 ml 1280 mg/L konsantrasyonundaki teikoplanin stok çözeltisinden MHA besiyerine eklenerek homojen şekilde karışması sağlandı. Besiyerleri, EUCAST önerilerine göre 90 mm çapındaki steril petri kaplarına 4 mm $\pm$ 0.5 mm olacak şekilde döküldü. *S. aureus* kolonileri %0.9 serum fizyolojikle süspanse edilerek 2.0 McFarland bulanıklıkta bakteri inokulumu elde edildi. Bu bakteri süspanسیونundan agar yüzeyine 10 µl steril bir pipet ile bir nokta şeklinde damlatıldı. 35°C'de normal atmosferde 48 saat inkübe edilen plaklarda inokulum damlatılan alanda bir veya daha fazla koloninin varlığı azalmış glikopeptid duyarlılığı şüphesi olarak değerlendirildi. Negatif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 29213 suşu kullanırken pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 700698 (Mu3) (hVISA) ve *S. aureus* ATCC 700699 (Mu50) (VISA) suşları kullanıldı (57, 70)

3.7.2. Makro Gradyent Test Yöntemi ile hVISA Taraması

Bu test ile elde edilen MİK değerleri *S. aureus*'un vankomisin ve teikoplanin MİK değerlerini vermez, azalmış vankomisin duyarlılığını değerlendirmek için kullanılır (57)

Tüm *S. aureus* izolatlarında Makro Gradyent Test Yöntemi Wootton ve ark.'nın (70) uyguladığı şekilde çalışıldı. KKA'da üreyen saf *S. aureus* kolonilerinden 2,0 McFarland bulanıklığında bakteri süspanسیونu MHB içerisinde

hazırlandı. 90 mm'lik steril petrilere üretici firmanın önerileri doğrultusunda hazırlanan BKİ (Condalab, İspanya) agara 100 µl 2,0 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu inoküle edildi. İlk olarak sadece teikoplanin gradyent test şeritleri (bioMérieux, Fransa) konuldu. 48 saat boyunca 35°C'de normal atmosferik koşullar altında inkübe edildi. Teikoplanin için MİK <8 mg/L olan izolatlar hVISA şüpheli olarak değerlendirilmedi, teikoplanin MİK ≥12 mg/L olan izolatlar hVISA şüpheli olarak değerlendirildi. Teikoplanin için MİK ≥8 mg/L olan izolatlara vankomisin ve teikoplanin gradyent test şeritleri (bioMérieux, Fransa) birlikte konuldu. Eğer vankomisin ve teikoplanin sonucu ≥8 mg/L ise izolatlar hVISA şüpheli şeklinde yorumlandı. Çalışmada, pozitif kontrol için Mu3 (ATCC 700698) ve negatif kontrol için ATCC 29213 *S. aureus* izolatı kullanıldı.

3.8. *Staphylococcus aureus* İzolatlarında Populasyon Analizi Profili-Eğri Altında Kalan Alan Yöntemi İle hVISA Varlığı Araştırılması

hVISA varlığını doğrulamak için Wootton ve ark.'nın (70) uyguladığı yöntem modifiye edilerek hVISA tarama testleri ile şüpheli bulunan *S. aureus* izolatlarına PAP-AUC (Popülasyon Analizi Profili -Eğri Altında Kalan Alan) yöntemi çalışıldı. PAP-AUC uygulanması için 0,5; 1; 2; 2,5; 4 ve 8 mg/L konsantrasyonunda vankomisin içerecek şekilde farklı konsantrasyonlarda BKİ besiyerleri hazırlandı. Öncelikle üretici firma talimatları doğrultusunda toz halde bulunan BKİ besiyeri (Condalab, İspanya) hazırlandı. BKİ besiyeri otoklavda 15 dakika 121°C'de steril edilip oda sıcaklığında 45°C'ye kadar soğutuldu.

Altı farklı balon jojeye 500 mL 0,5; 1; 2; 2,5; 4; 8 mg/L konsantrasyonda vankomisinli BKİ elde etmek için eklenmesi gereken 1280 mg/L konsantrasyonundaki vankomisin stok çözeltisi miktarı $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$ formülü ile hesaplandı. 1280 mg/L konsantrasyonundaki stok çözeltisinden hesaplanan miktarlar eklenerek homojen şekilde karışması sağlandı. Besiyerleri, EUCAST önerilerine göre 90 mm çapındaki steril petri kaplarına 4 mm ±0.5 mm olacak şekilde döküldü. Her izolat için 0,5; 1; 2; 2,5; 4 ve 8 mg/L vankomisin içeren BKİ agar hazırlandı. Besiyerleri kullanılacağı zamana kadar +4°C'deki dolapta saklandı.

İzolatların 0,5 McFarland bulanıklıkta süspansiyonları hazırlandı (10^8 CFU/ml). Bu 10^8 'lık konsantrasyondaki süspansiyondan steril salinle dilüe edilerek 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 10^3 konsantrasyonlar hazırlandı. İlk olarak hVISA şüpheli bulunan izolatların her birinden hazırlanan 10^8 , 10^6 ve 10^3 bakteri konsantrasyonundaki süspansiyonlardan 100'er µl alınarak 0; 0,5; 1; 2; 2,5; 4 ve 8 mg/L vankomisin içeren BKİ agara pipetle tek bir damla şeklinde bırakıldı. 48 saat 35 °C'de normal atmosferik koşullarda inkübe edilen besiyerlerindeki koloniler sayıldı. Koloni sayısı net sayılamayan üremelerde farklı konsantrasyonlarda (10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3) bakteri süspansiyonu farklı (100 µl 10 µl, 1 µl) miktarlarda, pipetle tek damla olacak şekilde damlatıldı ve inkübasyon tekrarlandı. Değerlendirme şu formüle göre yapıldı:

Koloni sayısının CFU/ml: Koloni sayısı / Dilüsyon katsayısı $\times$ İnokulum volümü

Şüpheli hVISA bulunup PAP-AUC çalışmasına alınan her *S. aureus* izolatı için farklı vankomisin konsantrasyonlarına karşı gelen koloni sayısının logaritması alınmış grafikler çizildi. Her izolatın grafiğinin eğri altında kalan alanı Microsoft Excel programıyla hesaplandı. Grafikler pozitif kontrol Mu3 (ATCC 700698) ve negatif kontrol ATCC 29213 için de çizildi ve eğri altında kalan alanlar hesaplandı. Her izolatın eğri altında kalan değeri Mu3 suşunun eğri altında kalan değerine oranlandı. Bu değer 0.90-1.3 ise hVISA olarak yorumlandı. Bu değer ≤ 0.90 ise VSSA, ≥ 1.3 ise VISA olarak yorumlandı.

3.9. *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Delafloksasin Duyarlılığının Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi İle Tespiti

Çalışmaya alınan *S. aureus* izolatlarının tamamına (n:105) delafloksasin duyarlılığı çalışıldı. Delafloksasin MİK değerleri SMD yöntemi ile EUCAST önerilerine göre yapıldı. KAMHB besiyeri (BD BBL Müller-Hinton II Broth) ile delafloksasin (Carbosynth, İngiltere) antibiyotiğinin toz şekli sıvı mikrodilüsyon yönteminde kullanıldı. Antibiyotik stok çözeltileri, üretici firmaların önerileri ile EUCAST'ın ve CLSI' ın önerileri doğrultusunda hazırlandı.

3.9.1. Delafloksasin Stok Çözeltilisinin Hazırlanması

160 mikrogram (μg)/mL konsantrasyonda delafloksasin stok çözeltisi oluşturmak için üretici firmanın talimatları, CLSI ve EUCAST'ın önerileri dikkate alınarak antibiyotik stok çözeltisi hazırlandı. Çözücü olarak 1/2 hacim distile steril su (5 ml) eklendi ve kalan 1/2 hacim ise damla damla 0,1 mol/L NaOH (5 ml) ile tamamlandı. Sulandırıcı olarak distile su kullanıldı. 10 mL homojen olarak elde edilen antibiyotik çözeltisi 1'er mL olacak şekilde alikotlandı ve çalışma gününe kadar -20°C 'de saklandı.

$$\text{Ağırlık (mg)} = \text{Hacim (mL)} \times \text{İstenen konsantrasyon (C, } \mu\text{g/mL)} / \text{Potens (} \mu\text{g/mg)}$$

3.9.2. Bakteri İnokulumunun Hazırlanışı

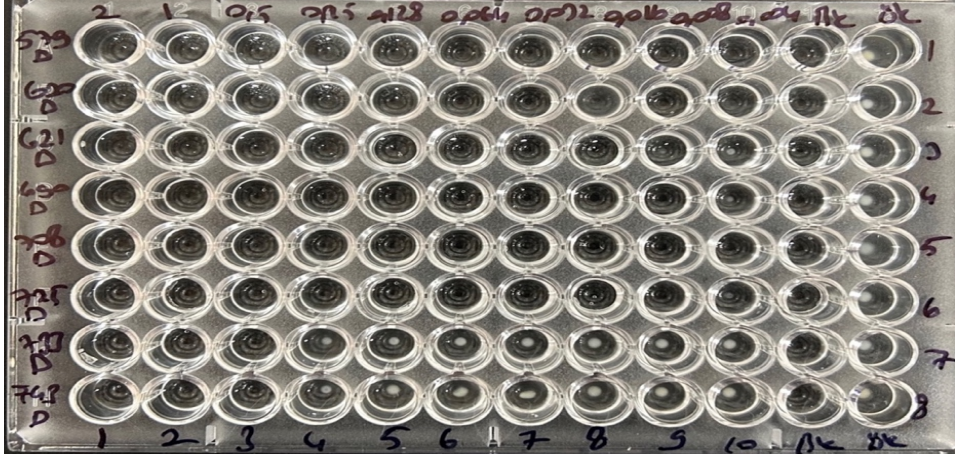
KKA'daki *S. aureus* kolonilerinden 0,5 McFarland bulanıklığında (10^8 CFU/mL) hazırlanan süspansiyondan 10 μl alınarak 990 μl KAMHB besiyeri ile dilüe edildi ve bakteri süspansiyonunun konsantrasyonu 1×10^6 CFU/mL oldu. Antimikrobiyal duyarlılık testinde *S. aureus* ATCC 29213 kalite kontrol suşu kullanıldı.

3.9.3. Mikrodilüsyon Plaklarının Hazırlanması ve Değerlendirilmesi

160 mg/L konsantrasyondaki stok antibiyotik çözeltisinden 1 mL alınarak 19 mL distile su ile 1/20 oranında dilüe edilerek 8 mg/L konsantrasyonda antibiyotik çözeltisi elde edildi. SMD yöntemi için steril U tabanlı 96'lık mikropalaklar kullanıldı. İlk olarak 8'li pipet kullanılarak son iki sütundaki besiyeri kontrolü ve üreme kontrolü haricindeki tüm kuyucuklara 50 μl KAMHB pipetlendi. Besiyeri kontrolü olan 11. sütundaki kuyucuklara 100 μl KAMHB, üreme kontrolü olan 12. sütundaki kuyucuklara 50 μl KAMHB ve 50 μl bakteri inokulumundan pipetlendi ve her 2 sütundaki kuyucuklara antibiyotik stok çözeltisinden ilave edilmedi. İlk sütundaki kuyucuklara sekizli pipet kullanılarak 8 mg/L konsantrasyonundaki antibiyotik stok çözeltisinden 50 μl pipetlendi. İlk sütundaki kuyucuklardan 8'li pipet kullanılarak 50 μl alınıp 10. sütundaki kuyucuklar dahil

olmak üzere iki kat seri dilüsyon yapıldı. 10. sütundaki kuyucuklardan 50 µl alınıp dışarı atıldı. İlk sütundaki kuyucuklarda antibiyotik konsantrasyonu 4 mg/L, 10. sütundaki kuyucuklardaki antibiyotik konsantrasyonu 0,008 mg/L oldu.

İlk 10 sütuna 8’li pipet yardımı ile 1×10^6 CFU/mL konsantrasyondaki bakteri süspansiyonu 50 µl pipetlendi ve ilk 10 sütundaki her kuyucukta bakteri süspansiyonunun konsantrasyonu 5×10^5 CFU/mL’ye düştü. Antibiyotik konsantrasyonu ise birinci sütunda 2 mg/L, 10. sütunda ise 0,004 mg/L oldu. Steril kapakla mikropalakların üzeri kapatıldı ve $35 \pm 2^\circ\text{C}$ ’de 18 saat inkübasyona bırakıldı. İnokülasyondan hemen sonra üreme kontrol kuyusundan eş zamanlı inkübasyon için KKA’a pasaj yapılarak inokulumun saflığı kontrol edildi. Ayrıca doğru inokulum varlığının (5×10^5 CFU/mL) kontrolü için başlangıç inokulumdan (10^6 CFU/mL) 10 µL alınarak 10 mL tuzlu suda seyreltildi ve KKA’a 100 µL ekilerek inkübe edildi. İnkübasyondan sonra koloni sayısı yaklaşık 20-80 ise; inokulum saf ise; pozitif kontrol kuyusunda üreme var ise test valid kabul edildi, test değerlendirildi. Kuyucuklarda bulanıklık veya kuyucuğun dibinde hücre birikiminin görülmesi üreme varlığı olarak değerlendirildi, organizmanın gözle görülen üremesini tamamen engelleyen en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlendi (68). EUCAST’in *S. aureus* için belirlemiş olduğu delafloksasin MİK sınır değerlerine göre toplum kökenli pnömoni için $\text{MİK} \leq 0,016$ mg/L bulunan izolatlar duyarlı, $\text{MİK} > 0,016$ mg/L izolatlar dirençli olarak kabul edildi. Deri ve deri ekleri enfeksiyonları için $\text{MİK} \leq 0,25$ mg/L izolatlar duyarlı, $> 0,25$ mg/L izolatlar dirençli olarak kabul edildi (66). (Şekil 3.1)



Şekil 3.1. Delafloksasin SMD MİK sonuçlarının değerlendirilmesi

3.10. Otomatize Antimikrobiyal Duyarlılık Sistemi ile Levofloksasin Duyarlılığının Belirlenmesi

İzolatların otomatize antimikrobiyal duyarlılık sistemi ile levofloksasin direncinin belirlenmesi Hitit Üniversitesi Erol Olçok Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda VITEK 2 Compact (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemi kullanılarak yapıldı. VITEK 2 AST GP kartlarındaki (P664-P640) levofloksasin MİK sonuçları EUCAST önerileri doğrultusunda değerlendirilmektedir. EUCAST'ın *S. aureus* için belirlemiş olduğu levofloksasin MİK sınır değerlerine göre $MİK \leq 0,001$ mg/L bulunan izolatlar duyarlı, $MİK > 1$ mg/L izolatlar dirençli olarak kabul edildi (66).

3.11. İstatiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS versiyon 23.0 kullanılarak yapıldı. Veriler tanımlayıcı istatistikler kullanılarak analiz edildi. Kategorik veriler sayı (n) ve yüzde (%) olarak hesaplandı. Yöntemlerin etkinlik karşılaştırmaları duyarlılık, özgüllük, pozitif ve negatif prediktif değer analizleri yapılmıştır. Duyarlılık için gerçek pozitiflik /gerçek pozitif+ yanlış negatif; özgüllük için doğru negatif/yanlış pozitif+doğru negatiflik; pozitif prediktif değer için gerçek pozitif/gerçek pozitif+ yanlış pozitif; negatif prediktif değer için gerçek negatif/ gerçek negatif+ yanlış negatif formülleri kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Çalışmaya Dahil Edilen *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Özellikleri

Çalışmamıza toplam 105 *S. aureus* izolatu dahil edildi. İzolatların 18'i (%17,1) poliklinik, 46'sı (%43,8) yataklı servis ve 41'i (%39) yoğun bakım ünitesinden gönderilen çeşitli örneklerden izole edilmiştir. İzolatların 15'i (%14,3) balgam, 37'si (%35,2) derin trekal aspirat, 50'si (%47,6) yara sürüntü örneği ve üçü (%2,9) de doku örneğinden oluşmaktadır. Çalışmaya dahil edilen *S. aureus* izolatlarının %60'ı 2023 yılında gelmiştir. *S. aureus* izolatlarının izole edildiği yıllara göre dağılımı Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. *S. aureus* izolatlarının izole edildiği yıllara göre dağılım

Yıl	n (%)
2021	2 (1,9)
2022	40 (38,1)
2023	63 (60)

4.2. *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Disk Difüzyon, VITEK 2 ve Moleküler Yöntemlerle Metisilin Direnci Sonuçları

4.2.1. Sefoksitin Disk Difüzyon Yöntemi ile Metisilin Direnci Sonuçları

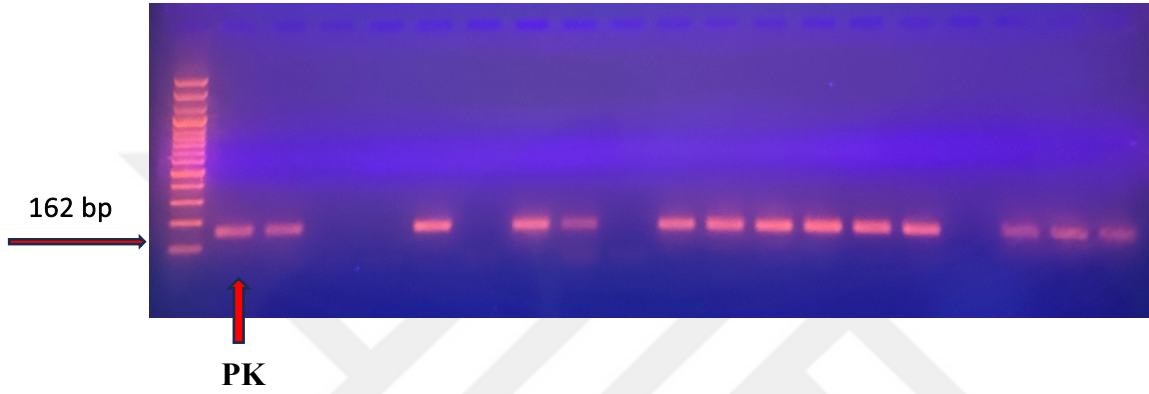
Sefoksitin diski zon çapı 65 (%61,9) izolatta <22 mm, 40 (%38,1) izolatta ≥ 22 mm olarak saptandı.

4.2.2. Otomatize Antimikrobiyal Duyarlılık Sistemi ile Metisilin Direnci Sonuçları

Sefoksitin tarama sonucu; 69 (%65,7) izolat için pozitif, 36 (%34,3) izolat için negatif olarak saptandı. Oksasilin MİK sonuçları ise 67 (%63,8) izolatta MİK > 2 mg/L, 38 (%36,2) izolatta MİK ≤ 2 mg/L olarak saptandı.

4.2.3. PZR ile Metisilin Direnci Sonuçları

Tüm izolatlarda (n:105) *mecA* ve *mecC* geni araştırıldı. Multipleks PZR sonucunda 64 (%61) izolatta *mecA* geni tespit edilirken, 41 (%39) izolatta *mecA* geni tespit edilmedi. Hiçbir izolatta *mecC* geni tespit edilmedi. *mecA* ve *mecC* geni için yapılan PZR' ye ait agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü Şekil 4.1'de ve 4.2'de gösterilmektedir.



PK: Pozitif kontrol

Şekil 4.1. *mecA* geni için yapılan PZR' ye ait agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü



PK: Pozitif kontrol

Şekil 4.2. *mecC* geni için yapılan PZR'ye ait agaroz jel elektroforez görüntüsü

Metisilin direnci saptamada dört farklı yöntem tüm izolatlarda çalışılmıştır. PZR ile metisilin direnci saptanması altın standart yöntem olarak kabul edilerek istatistiksel olarak duyarlılık ve özgüllük hesaplanmıştır. Pozitif *mecA* izolatlarının tamamı (n:64) diğer yöntemlerle de pozitif sonuç vermiş ve duyarlılık %100 bulunmuştur. Bununla birlikte, özgüllükleri açısından farklılık göstermişlerdir. Negatif *mecA* sonucu olan bir izolat sefoksitin disk difüzyon ile metisilin dirençli saptanmış ve testin özgüllüğü %97,6 bulunmuştur. Negatif *mecA* sonucu olan beş izolat ise VITEK 2 sefoksitin tarama ile pozitif sonuç vermiş ve özgüllük %87,8 bulunmuştur. Negatif *mecA* sonucu olan üç izolat ise VITEK 2 oksasilin MİK ile dirençli saptanmış ve özgüllüğü %92,7 bulunmuştur. VITEK 2 sefoksitin tarama özgüllüğü ve pozitif prediktif değeri diğer yöntemlerden daha düşük bulundu. Genel olarak, sefoksitin disk difüzyonun performansı daha üstündü. PZR ile *mecA* gen tespiti ile birlikte sefoksitin disk difüzyon, VITEK 2 oksasilin MİK'ten ve VITEK 2 sefoksitin taramadan daha iyi performans gösterdi (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Metisilin direnci saptamada sefoksitin diskinin ve VITEK 2 sonuçlarının *mecA* geni varlığına göre karşılaştırılması

Yöntem	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)	Pozitif prediktif değer (%)	Negatif prediktif değer (%)
D-FOX	100	97,6	98,5	100
V-FOX	100	87,8	92,7	100
V-OXA	100	92,7	95,5	100

D-FOX: Sefoksitin disk difüzyon, V-FOX: VITEK 2 Sefoksitin tarama, V-OXA: VITEK 2 Oksasilin MİK

PZR ile *mecA* geni saptanmayan toplam altı izolatta diğer yöntemler ile uyumsuzluklar saptandı (Tablo 4.3).

480., 579., 850. stok numaralı izolat: Sefoksitin tarama pozitif saptanarak uyumsuz kalmıştır. Bu izolatların sefoksitin disk difüzyonu ve oksasilin MİK sonuçları uyumludur.

35. stok numaralı izolat: Sefoksitin disk difüzyon ve VITEK 2 sistemi (sefoksitin tarama ve oksasilin MİK) yöntemlerinin üçünde de dirençli olarak saptanmıştır.

430. stok numaralı izolat: Sefoksitin disk difüzyon ile uyumlu ancak VITEK 2 sistemi (sefoksitin tarama ve oksasilin MİK) ile metisilin dirençli tespit edilmiştir.

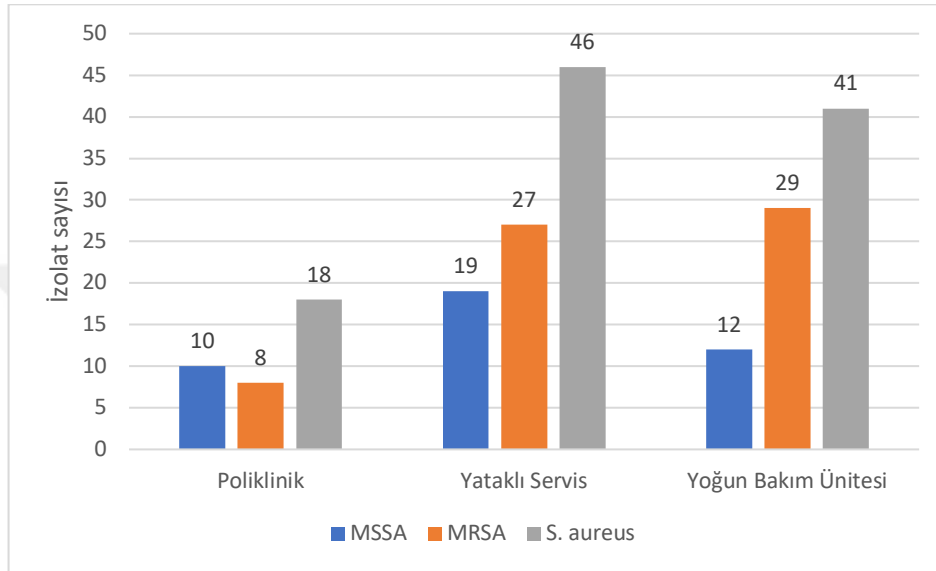
463. stok numaralı izolat: Sefoksitin disk difüzyon ve sefoksitin tarama ile duyarlı bulunmuş bu izolda oksasilin MİK uyumsuz sonuç saptamıştır.

Tablo 4.3. Farklı yöntemlerle tespit edilen metisilin direncinde uyumsuz sonuçlar

İzolat stok numarası	PZR	D-FOX	V-FOX	V-OXA
35	NEG	R (18mm)	POZ	R (>2 mg/L)
430	NEG	S (25 mm)	POZ	R (>2 mg/L)
463	NEG	S (27 mm)	NEG	R (>2 mg/L)
480	NEG	S (26 mm)	POZ	S (0,5 mg/L)
579	NEG	S (30 mm)	POZ	S (2 mg/L)
850	NEG	S (30 mm)	POZ	S (0.5 mg/L)

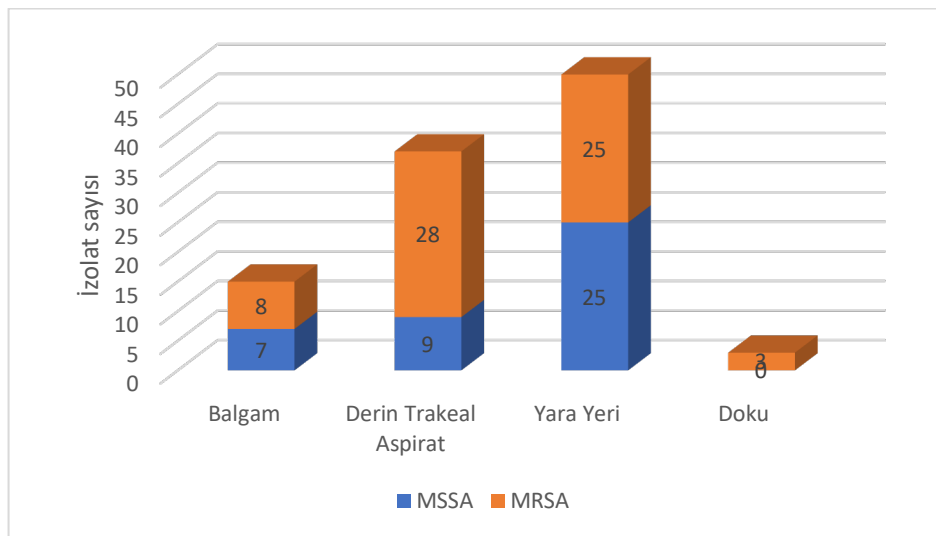
D-FOX: Sefoksitin disk difüzyon, V-FOX: VITEK 2 Sefoksitin tarama, V-OXA: VITEK 2 Oksasilin MİK NEG: Negatif, POZ: Pozitif

Sonuç olarak PZR ile metisilin direnci saptanması altın standart yöntem olarak kabul edilerek 64 izolat MRSA, 41 izolat MSSA olarak değerlendirilmiştir. MRSA ve MSSA olarak değerlendirilen izolatların geldiği bölümler incelendiğinde örneklerin çoğunluğunu yataklı servis ve yoğun bakım ünitelerinden gelen örnekler oluşturmuştur (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. MRSA ve MSSA izolatlarının kliniklere göre dağılımı

MRSA ve MSSA olarak değerlendirilen izolatların izole edildiği örnek türlerinin dağılımı Şekil 4.4'te gösterilmektedir.



Şekil 4.4. MRSA ve MSSA izolatlarının izole edildiği örnek türlerine göre dağılımı

4.3. *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi ile Glikopeptid Duyarlılık Sonuçları

Tüm *S. aureus* izolatlarının (n:105) glikopeptid duyarlılıkları çalışıldı. Çalışmadaki MRSA izolatları vankomisin 0,5-2 mg/L ve teikoplanin 0,125-2 mg/L MİK aralıklarında duyarlı bulunurken bir izolatta teikoplanin 4 mg/L MİK değerinde dirençli bulundu. MSSA izolatları vankomisin 0,5-2 mg/L ve teikoplanine 0,125- 2 mg/L MİK aralıklarında duyarlı bulunurken, dirençli izolat bulunmadı. Çalışmadaki toplam 11 izolatın vankomisin MİK değeri 2 mg/L ve 4 izolatın teikoplanin MİK değeri 2 mg/L'dir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. *S. aureus* izolatlarının vankomisin MİK değeri dağılımı

	MİK (mg/L)	MSSA (n)	MRSA (n)	<i>S. aureus</i> (n %)
Vankomisin	0,5	7	4	11 (10,5)
	1	23	34	57 (54,3)
	2	11	26	37 (35,2)
Teikoplanin	0,125	1	2	3 (2,9)
	0,25	11	16	27 (25,7)
	0,5	21	35	56 (53,3)
	1	6	8	14 (13,3)
	2	2	2	4 (3,8)
	4	0	1	1 (1)

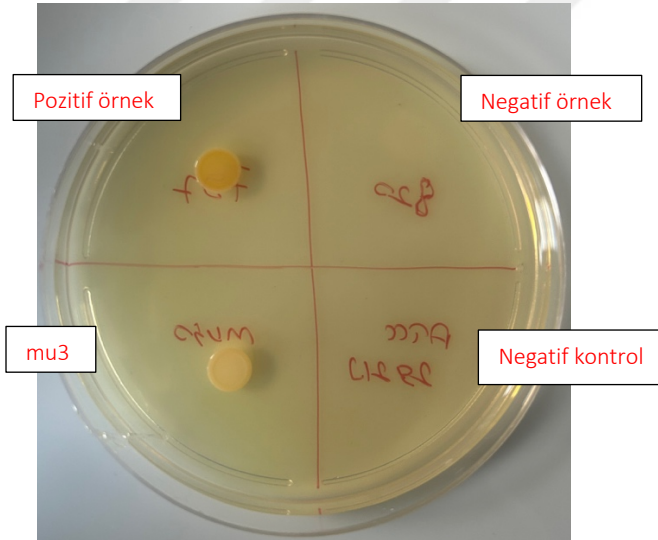
Çalışmamızda *S. aureus* izolatlarının vankomisin için MİK₅₀ (izolatların %50 sini inhibe eden antibiyotik konsantrasyonu) değeri 1 mg/L ve MİK₉₀ (izolatların %90 ını inhibe eden antibiyotik konsantrasyonu) değeri 2 mg/L olarak bulundu. Teikoplanin için MİK₅₀ değeri 0,5 mg/L iken MİK₉₀ değeri 1 mg/L olarak bulundu.

4.4. *Staphylococcus aureus* İzolatlarının hVISA Tarama Sonuçları

Çalışmamızdaki tüm *S. aureus* izolatlarına (n:105) 5 mg/L teikoplanin içeren müller hinton tarama yöntemi ve makro gradiyent test yöntemi uygulandı.

4.4.1. 5 mg/L Teikoplanin İçeren Müller Hinton Tarama Yöntemi

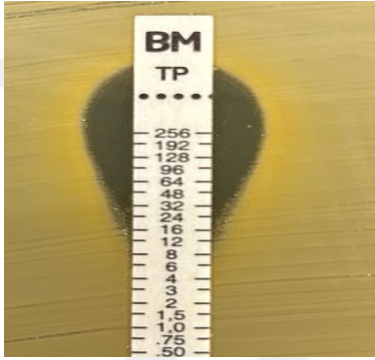
Çalışmamızdaki 105 *S. aureus* izolatına EUCAST önerileri doğrultusunda 5 mg/L Teikoplanin İçeren Müller Hinton Tarama Yöntemi uygulandı. Pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 700698 (Mu3) (hVISA) ve *S. aureus* ATCC 700699 (Mu50) (VISA) suşları, negatif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 29213 suşu kullanıldı. Mu3 pozitif kontrol suşu, *S. aureus* ATCC 29213 negatif kontrol suşu negatif ve pozitif izolatlara ait teikoplanin tarama agar görüntüsü Şekil 4.5'te gösterildi. 48 saatlik inkübasyon sonrası toplam 12 izolatta hVISA şüpheli olarak değerlendirildi. hVISA şüpheli değerlendirilen 12 izolatın dokuzunda metisilin direnci tespit edilmiş olup, üçünde metisilin direnci saptanmamıştır.



Şekil 4.5. *S. aureus* ATCC 29213 negatif kontrol suş, mu3 pozitif kontrol suşu, negatif ve pozitif örneklere ait 5 mg/L teikoplanin içeren Müller Hinton tarama yöntemi görüntüsü

4.4.2. Makro Gradyent Test Yöntemi

Çalışmamızdaki 105 *S. aureus* izolatına teikoplanin gradyent test şeritleri (bioMérieux, Fransa) konuldu. Teikoplanin için şüpheli sonuç veren 10 izolata vankomisin ve teikoplanin gradyent test şeritleri (bioMérieux, Fransa) birlikte konuldu. Makro gradyente yöntemine göre hVISA saptanmadı. Pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 700698 (Mu3) (hVISA) ve *S. aureus* ATCC 700699 (Mu50) (VISA) suşları, negatif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 29213 suşu kullanıldı. Şekil 4.6’da Mu3 pozitif kontrol suşu gösterildi.



Şekil 4.6 Makro gradyent yöntemine göre mu3 pozitif kontrol örneğinin E-test görüntüsü, Teikoplanin MİK: 16 mg/L

hVISA şüpheli değerlendirilen ve PAP-AUC çalışmasına alınan 12 izolatın özellikleri ve hVISA için risk faktörleri tablo 4.5’te verilmiştir. Hastaların dosya bilgileri incelendiğinde daha önceden vankomisin tedavisi almadığı ve pozitif kültür sonucu ile iki hastanın (369-797) vankomisin, iki hastanın (503-744) teikoplanin tedavisi aldığı gözlenmiştir.

Tablo 4.5. hVISA şüpheli değerlendirilen ve PAP-AUC çalışmasına alınan 12 izolatın özellikleri

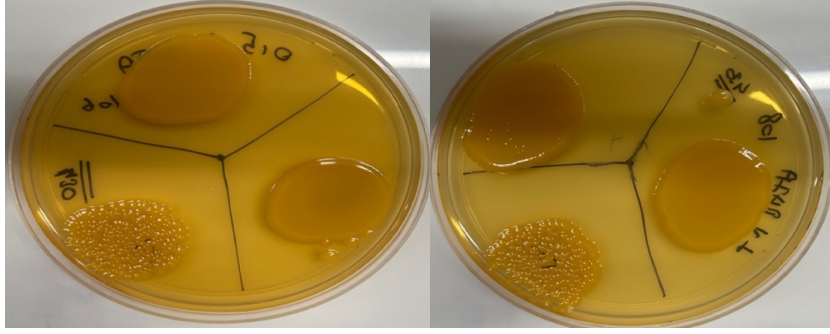
İzolat Stok Numara	Klinik	Örnek Türü	<i>mecA</i>	<i>mecC</i>	Vankomisin MİK	Teikoplanin MİK	MHA5T	MET	Geçirilmiş MRSA enfeksiyonu	Diabet	Malignite öyküsü	Ameliyat öyküsü
232	YB	DTA	POZ	NEG	1 mg/L	0,25 mg/L	POZ	NEG	HAYIR	HAYIR	HAYIR	HAYIR
346	YB	DTA	POZ	NEG	2 mg/L	0,5 mg/L	POZ	NEG	HAYIR	HAYIR	HAYIR	HAYIR
361	YB	DTA	POZ	NEG	1 mg/L	0,5 mg/L	POZ	NEG	HAYIR	HAYIR	EVET	EVET
369	YB	YARA	POZ	NEG	2 mg/L	0,25 mg/L	POZ	NEG	EVET	HAYIR	HAYIR	HAYIR
391	YB	BALGAM	POZ	NEG	2 mg/L	4 mg/L	POZ	NEG	EVET	HAYIR	HAYIR	HAYIR
430	YB	DTA	NEG	NEG	1 mg/L	2 mg/L	POZ	NEG	HAYIR	HAYIR	HAYIR	HAYIR
469	SERVİS	YARA	POZ	NEG	2 mg/L	2 mg/L	POZ	NEG	EVET	HAYIR	HAYIR	EVET
503	YB	YARA	POZ	NEG	2 mg/L	1 mg/L	POZ	NEG	HAYIR	HAYIR	HAYIR	HAYIR
744	SERVİS	BALGAM	NEG	NEG	2 mg/L	0,25 mg/L	POZ	NEG	HAYIR	HAYIR	HAYIR	HAYIR
797	YB	DTA	POZ	NEG	1 mg/L	2 mg/L	POZ	NEG	HAYIR	HAYIR	HAYIR	HAYIR
835	SERVİS	BALGAM	POZ	NEG	1 mg/L	0,5 mg/L	POZ	NEG	HAYIR	EVET	EVET	EVET
843	POLİKLİNİK	YARA	NEG	NEG	1 mg/L	0,5 mg/L	POZ	NEG	HAYIR	HAYIR	HAYIR	HAYIR

POZ: Pozitif, NEG: Negatif, YB: Yoğun Bakım, MHA5T: 5 mg/L Teikoplanin İçeren Müller Hinton Tarama Yöntemi, MET: Makro Gradyent Test Yöntemi

4.5. *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Populasyon Analizi Profili-

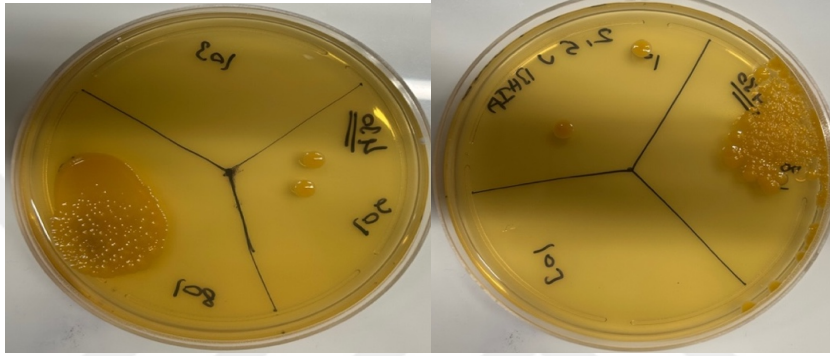
Eğri Altında Kalan Alan Yöntemi Sonuçları:

hVISA varlığını doğrulamak için 5 mg/L Teikoplanin içeren Müller Hinton Tarama Yöntemi ile pozitif bulunan 12 izolata ve pozitif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 700698 (Mu3) (hVISA), negatif kontrol olarak *S. aureus* ATCC 29213 izolatına altın standart yöntem olan PAP-AUC çalışıldı. 430 stok numaralı izolata ait PAP-AUC yöntemi Şekil 4.7’de gösterilmektedir. Her bir izolat için elde edilen grafiklerdeki eğri altında kalan alan, Mu3 (ATCC700698) hVISA standart suşunun grafiğinden elde edilen eğri altında kalan alana oranlandı. Wootton ve ark. (69) bu oran değeri $\geq 0,9$ olan izolatları hVISA olarak kabul etmişlerdir. Çalışmadaki izolatlar arasında PAP-AUC analizi ile iki izolata (430 ve 469 stok numaralı) ait oran $\geq 0,9$ bulundu ve hVISA olarak değerlendirildi. İzolatlar arasında PAP-AUC değeri Mu3’ünki ile oranlandığında elde edilen en düşük değer 0,28, en yüksek değer 1,12 bulundu. hVISA olarak değerlendirilen izolatların ise değerleri 1,12 ve 0,97 olarak bulundu. ≥ 1.3 olan izolat tespit edilmedi. En düşük PAP-AUC alanına sahip izolat (232 stok numaralı izolat), hVISA olarak değerlendirilen 2 izolat (430 ve 469 stok numaralı izolat) ve mu3 pozitif kontrol izolatına ait PAP-AUC grafiği Şekil 4.8’de verilmiştir. Ayrıca hVISA olarak değerlendirilen iki izolatın özellikleri Tablo 4.6’da görülmektedir.



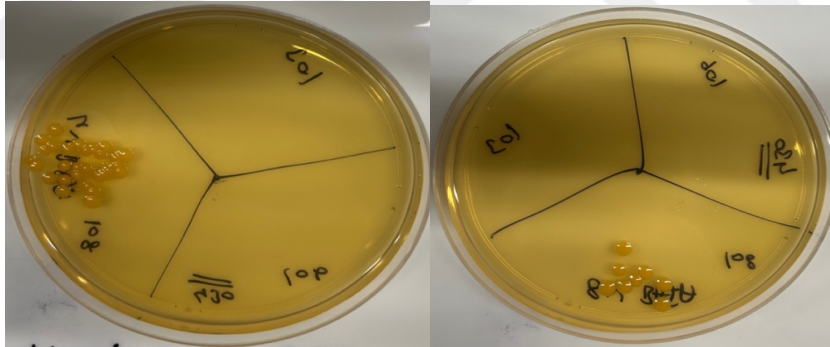
a) 0,5 mg/L Vankomisin BKİ Agar

b) 1 mg/L Vankomisin BKİ Agar



c) 2 mg/L Vankomisin BKİ Agar

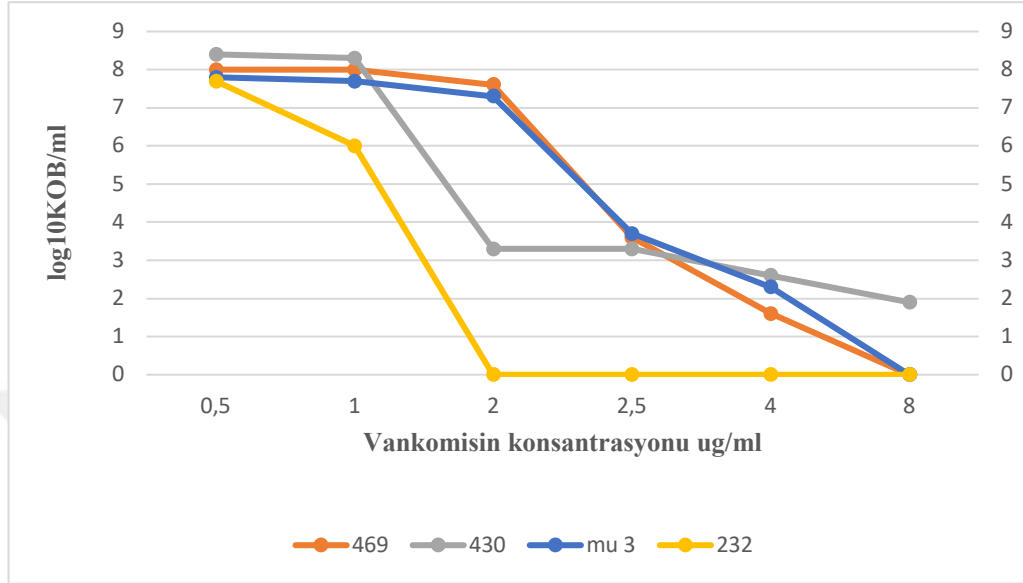
d) 2,5 mg/L Vankomisin BKİ Agar



e) 4 mg/L Vankomisin BKİ Agar

f) 8 mg/L Vankomisin BKİ Agar

Şekil 4.7. PAP-AUC Yöntemi'ne göre 430 stok numaralı izolatın farklı konsantrasyonlardaki bakteri süspansiyonlarının farklı konsantrasyonlardaki vankomisin BKİ agarda üreyen kolonilerin görüntüsü. a) 0,5 mg/L vankomisin BKİ Agar, b) 1 mg/L vankomisin BKİ Agar, c) 2 mg/L vankomisin BKİ Agar, d) 2,5 mg/L vankomisin BKİ Agar, e) 4 mg/L vankomisin BKİ Agar, f) 8 mg/L vankomisin BKİ Agar



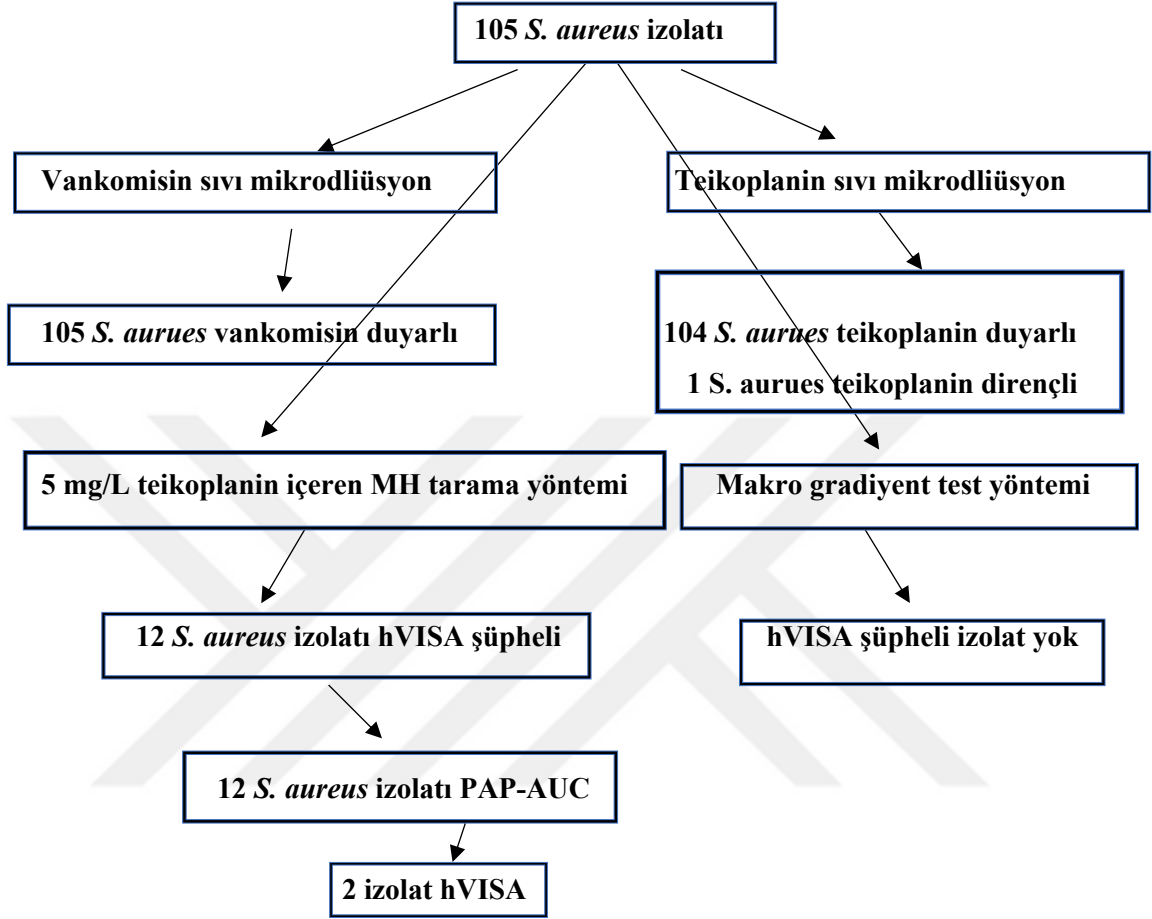
Şekil 4.8. En düşük PAP-AUC alanına sahip izolat (232 stok numaralı izolat), hVISA olarak değerlendirilen iki izolat (430 ve 469 stok numaralı izolat) ve mu3 pozitif kontrol izolatına ait PAP-AUC grafiği

Tablo 4.6. hVISA olarak değerlendirilen iki izolatın özellikleri

İzolat Stok No	Klinik	Vankomisin SMD MİK	Teikoplanin SMD MİK	MET	MHA5T	PAP-AUC değeri	mecA	mecC
430	Yoğun Bakım	1 mg/L	2 mg/L	Neg	Poz	1,12	Neg	Neg
469	Servis	2 mg/L	2 mg/L	Neg	Poz	0,97	Poz	Neg

MET: Makro gradiyent test yöntemi, MHA5T: 5 mg/L teikoplanin içeren müller hinton tarama yöntemi, Neg: Negatif, Poz: Pozitif

Sonuç olarak *Staphylococcus aureus* izolatlarının hVISA tarama yöntemlerinden Makro Gradiyent Test Yöntemi ile hVISA şüpheli izolat bulunmazken, 5 mg/L Teikoplanin İçeren Müller Hinton Tarama Yöntemi ile 12 hVISA şüpheli izolat bulundu. Bu 12 şüpheli izolat PAP-AUC yöntemine alındı ve iki izolat hVISA olarak değerlendirildi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9. hVISA çalışma algoritması

4.6. *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi İle

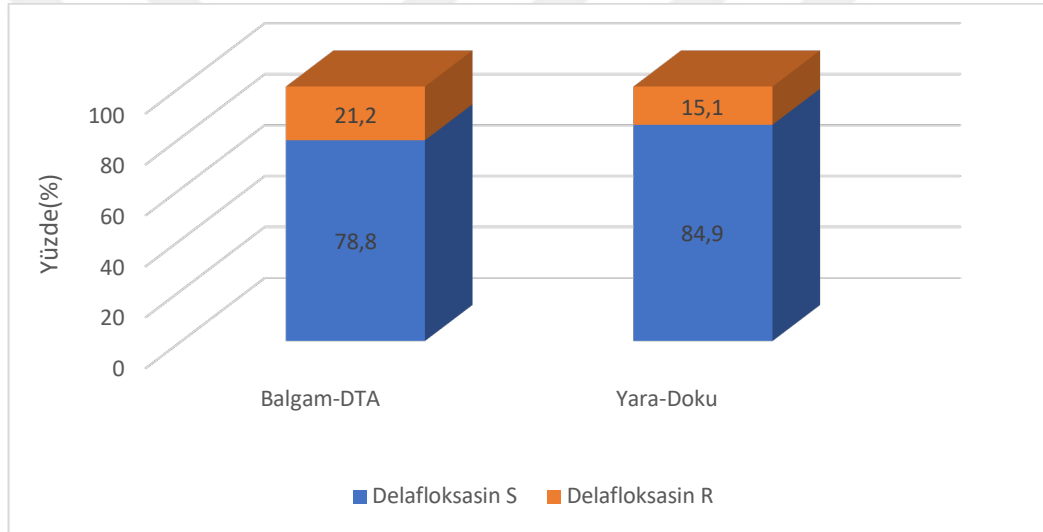
Delafloksasin ve Otomatize Sistem ile Levofloksasin Duyarlılık Sonuçları

Bu çalışmada 105 *S. aureus* izolatının 19'u (%18,1) delafloksasine dirençli bulundu. Delafloksasin duyarlılık oranı *S. aureus* izolatlarında %81,9, MRSA izolatlarında %75, MSSA izolatlarında %92,7 saptandı. Çalışmamızda levofloksasin direnç oranı *S. aureus* izolatlarında %19 (MRSA izolatlarında %26,6, MSSA izolatlarında %7,3) saptandı (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. *S. aureus* izolatların delafloksasin antibiyotik duyarlılık dağılımı ve metisilin direnci karşılaştırılması

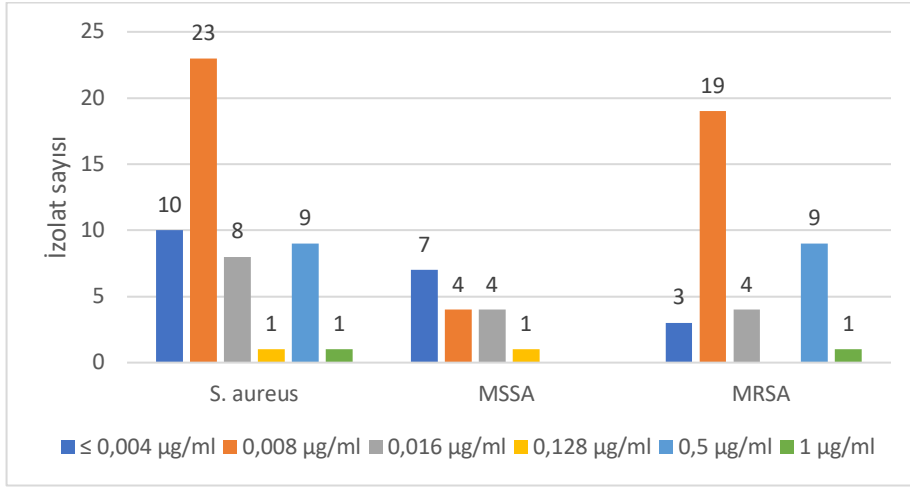
Antimikrobiyal duyarlılık	<i>S. aureus</i> (%n)	MSSA (%n)	MRSA (%n)
Delafloksasin S	86 (%81,9)	38 (%92,7)	48 (%75)
Delafloksasin R	19 (%18,1)	3 (%7,3)	16 (%25)
Levofloksasin I	85 (%81)	38 (%92,7)	47 (%73,4)
Levofloksasin R	20 (%19)	3 (%7,3)	17 (%26,6)

Balgam-DTA izolatlarının %21,2'si, yara-doku izolatlarının ise %15,1'i delafloksasine dirençli bulundu (Şekil 4.10).

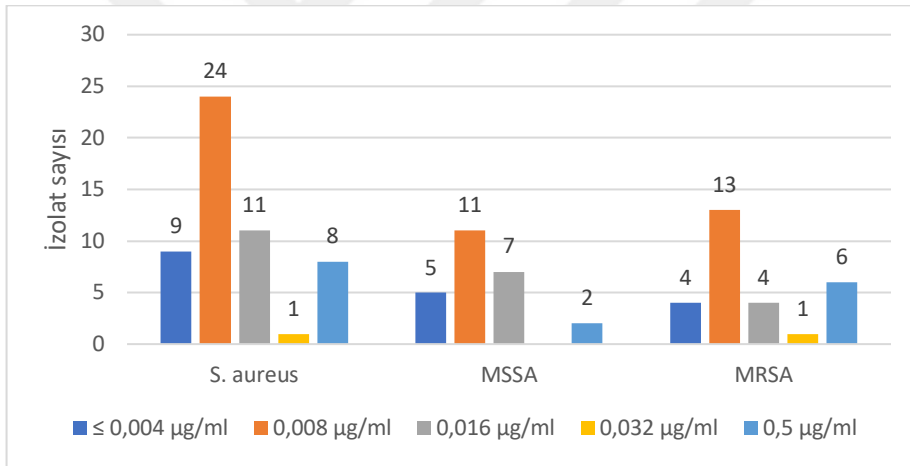


Şekil 4.10. *S. aureus* izolatlarının örnek türü ve delafloksasin duyarlılık oranlarının karşılaştırılması

Çalışmadaki balgam ve DTA'dan izole edilen *S. aureus*'lardan birinde 0,128 mg/L, dokuzunda 0,5 mg/L ve birinde 1 mg/L MİK değeri saptanarak toplam 11 izolat dirençli olarak değerlendirildi. Yara ve doku örneklerinden izole edilen *S. aureus*'lardan sekizinde 0,5 mg/L MİK değeri saptanarak toplam sekiz izolat dirençli olarak değerlendirildi. Balgam ve DTA'dan izole edilen MRSA ve MSSA izolatlarının delafloksasin için MİK değeri dağılımları Şekil 4.11'de; yara ve doku örneklerinden izole edilen MRSA ve MSSA izolatlarının delafloksasin için MİK değeri dağılımları Şekil 4.12'de gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Balgam-DTA örneklerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının delafloksasin MİK değeri dağılımı



Şekil 4.12. Yara-doku örneklerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının delafloksasin MİK değeri dağılımı

Çalışmamızda balgam-DTA örneklerinden ve yara-doku örneklerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının delafloksasin için MİK₅₀ değeri 0,008 mg/L ve MİK₉₀ değeri 0,5 mg/L saptandı. MSSA izolatları için MİK₅₀ değeri 0,008 mg/L ve MİK₉₀ değeri 0,016 mg/L; MRSA izolatları için MİK₅₀ değeri 0,008 mg/L ve MİK₉₀ değeri 0,5 mg/L saptandı.

5. TARTIŞMA

Son yıllarda MRSA dünyada ve ülkemizde yaygın olarak görülmekte olup antibiyotik direncinde ve mortalitede artışa neden olmaktadır. Bu nedenle metisilin direncinin doğru bir şekilde tespiti önem taşımaktadır (71, 72). MRSA izolatları *mecA* geni ile kodlanan ve beta-laktam antibiyotiklere düşük afiniteli bir PBP2a üretir (73, 74). Büyük çoğunluğunu heterojen direncin oluşturduğu *mecA* geni ile kontrol edilen *S. aureus* 'taki metisilin direnci homojen dirençle de oluşmaktadır (75). Heterojen direnç mekanizması tam anlaşılamamış olup *femA*, *femB* (PBP2a ile hücre duvarı peptidoglikan sentezinde görevli) gibi diğer genler ile de oluşabilir (76, 77). Uyumsuz sonuçların en sık görüldüğü ve direnci belirlemede zorlukların en sık yaşandığı izolatlar heterodirençli *mecA* pozitif izolatlar ve düşük düzey oksasilin direncine yol açan *mecA* dışı mekanizmalara sahip izolatlardır (78, 79). Bu yüzden *mecA* geninin tespiti metisilin direnci saptamada altın standart olarak gösterilmektedir (79). Bizim çalışmamızda MRSA izolatlarını belirlemek için *mecA* geni referans yöntem olarak alınmıştır.

Metisilin direnci tespitindeki yanlış sonuçlar yetersiz tedaviye, vankomisin gibi glikopeptid türevi antibiyotiklerin gereksiz kullanımına ve vankomisin direncine yol açmaktadır. Moleküler yöntemlerle *mecA* geninin tespiti zaman alıcı ve pahalıdır; güvenilir, kolay ve hızlı uygulanabilir fenotipik testlere gereksinim duyulmaktadır. Bu nedenle bu testlerin karşılaştırılmasının yapıldığı çalışmalar önem kazanmaktadır (80). Bizim çalışmamızda da moleküler yöntemlerle fenotipik yöntemler karşılaştırılmıştır.

Sefoksitin, heterojen metisilin direncinin saptanmasında *mecA* genini kodlayan PBP2a'nın daha iyi bir indükleyicisi olduğu için oksasilinden daha iyi bir belirleyici olarak kabul edilmektedir ve birçok komite ve CLSI tarafından önerilmektedir (73, 76). Bu nedenle bizim çalışmamızda disk difüzyon yönteminde sefoksitin tercih edilmiştir. Ülkemizde ve dünyada metisilin direnci tespitinde çeşitli yöntemlerin kullanıldığı bazı çalışmalar mevcuttur. Ülkemizde yapılan ve PZR ile *mecA* geninin tespiti altın standart kabul edilen çalışmalarda sefoksitin diski ile metisilin direncinin özgüllüğü, duyarlılığı, pozitif prediktif değeri, negatif

prediktif değeri sırasıyla; Özel ve ark.'nın (81) yaptığı çalışmada %100, %94,3, %100, %96, Uzun ve ark.'nın (80) yaptığı çalışmada %100, %98,3, %100, %97,4, Hancı ve ark.'nın (82) yaptığı çalışmada %81,6, %98,7, %91,7, %96,9 bulunmuştur. Hindistan'da yapılan bir çalışmada ise duyarlılık %97,2 ve özgüllük %100 bulunmuştur (76). Bizim çalışmamızda da PZR ile *mecA* geninin tespiti metisilin direnci tespitinde altın standart kabul edilmiştir ve sefoksitin disk difüzyon yöntemi ile metisilin direncinin özgüllüğü %97,6, duyarlılığı %100, pozitif prediktif değeri %98,5, negatif prediktif değeri %100 bulunmuştur. PZR yöntemi ile *mecA* gen tespiti referans yöntem olarak alındığında en iyi performans diğer yöntemlere göre sefoksitin disk difüzyon yöntemi için bulunmuştur.

Metisilin direnci tespitinde otomatize sistemler günümüzde laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (74). Otomatize sistemlerle *mecA* ve *mec C* aracılı metisilin direnci tespitinde çeşitli kartlar kullanılmaktadır. VITEK 2 (bioMérieux, Durham, NC) sistemi ve BD Phoenix (BD Diagnostics, Sparks, MD) sistemi birçok laboratuvar da kullanılmaktadır. Her iki sistem de oksasilin MİK ve sefoksitin tarama içeren paneller ile metisilin direnci tespiti yapmaktadır. Her biri tek başına test edildiğinde ise her zaman doğru sonuçlar vermemektedir (74, 83, 84). Bizim çalışmamızda da VITEK 2 sistemi ile oksasilin MİK ve sefoksitin tarama sonuçları elde edilmiştir. PZR ile *mecA* gen tespiti referans yöntem olarak alınan Uzun ve ark.'nın (80) yaptığı çalışmada otomatize sistemin (Phoenix, BD, ABD) duyarlılığı %100, özgüllüğü %97,4; Atay ve ark.'nın (85) yaptığı çalışmada otomatize sistemin (VITEK) duyarlılığı %100, özgüllüğü %80 olarak saptanmıştır. Alan ve ark.'nın (83) yaptığı çalışmada *mecA* PZR ve oksasilin SMD referans yöntem olarak alınmış ve bu iki yöntem arasındaki uyum %100 gelmiştir. Oksasilin SMD MİK'e göre; VITEK 2 oksasilin MİK ile metisilin direncinin özgüllüğü %99,4, duyarlılığı %98,2, VITEK 2 sefoksitin tarama ile metisilin direncinin özgüllüğü %100, duyarlılığı ise %99,1 saptanmıştır. Hindistan'da yapılan bir çalışmada; VITEK ile sefoksitin tarama ve oksasilin MİK sonuçları birlikte yorumlanmış ve duyarlılık %97,2 ve özgüllük %100 bulunmuştur (76). Yine başka bir çalışmada VITEK 2 sefoksitin tarama testi %100 duyarlılık ve özgüllük, VITEK 2 oksasilin MİK testi %97 duyarlılık ve %100 özgüllük

göstermiştir (74) John ve ark.'nın (73) yaptığı çalışmada VITEK 2 oksasilin MİK ile metisilin direncinin özgüllüğü %77,9, duyarlılığı %93,8, pozitif prediktif değeri %67,2, negatif prediktif değeri %96,3, VITEK 2 sefoksitin tarama ile metisilin direncinin özgüllüğü %93,5, duyarlılığı %94,6, pozitif prediktif değeri %87,5, negatif prediktif değeri %97,3 saptanmıştır. Bizim çalışmamızda ise *mecA* PZR referans yöntem olarak alınmış ve VITEK 2 oksasilin MİK ile metisilin direncinin özgüllüğü %92,7, duyarlılığı %100, pozitif prediktif değeri %95,5, negatif prediktif değeri %100, VITEK 2 sefoksitin tarama ile metisilin direncinin özgüllüğü %87,8, duyarlılığı %100, pozitif prediktif değeri %92,7, negatif prediktif değeri %100 saptanmıştır.

hVISA prevalansının belirlenmesi enfeksiyon kontrolü ve vankomisin tedavisindeki başarısızlıktaki rolü nedeniyle önemlidir fakat çoğu hastanede bu oran bilinmemektedir (56). Bakteriyel endokardit ve kemik eklem enfeksiyonları gibi bakteri yükünün yoğun olduğu enfeksiyonlarda vankomisin tedavi başarısızlığında hVISA izolatlarının sorumlu olabildiği bildirilmektedir (5). Çalışmamızda hVISA saptanmasında EUCAST önerileri doğrultusunda tarama yöntemi olarak makro gradient test ve teikoplanin agar tarama yöntemi, doğrulama yöntemi olarak da PAP-AUC uygulanmıştır. Ülkemizde ve dünyada farklı oranlarda hVISA bildirilmiştir. PAP-AUC yöntemi ile yapılan çalışmalarda Kuşçu ve ark. (86) (n=107) %0,9, Uçar ve ark. (87) (n=68) %1,5, Sancak ve ark. (88) (n=256) %17,9, Tunç ve ark. (89) %17,5 oranında hVISA bildirmiştir. Ülkemizde farklı merkezlerin dahil edildiği agar tarama yöntemi ve makro gradient yöntem kullanılarak yapılan başka bir çalışmada ise, %5 oranında hVISA saptanmıştır (90). Çin'de çok merkezli bir çalışmada PAP-AUC yöntemi ile hVISA oranı %13-16 arasında saptanmıştır (5). Çalışmamızda makro gradient yöntem ile hVISA şüpheli izolat saptanmamış olup, agar tarama yöntemi ile 12 (%11,4) hVISA şüpheli izolat saptanmıştır. PAP-AUC yöntemi ile %1,9 oranında hVISA saptanmıştır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda farklı oranlar olmakla birlikte bizim sonuçlarımıza benzeyen çalışmalar da bulunmaktadır.

hVISA araştırmaları *S. aureus* için çoğunlukla MRSA izolatları üzerinde yapılmaktadır ancak bizim çalışmamızda olduğu gibi MSSA'larda hVISA

araştırılan çalışmalar da bulunmaktadır. Hu ve ark.'nın (91) yaptığı çalışmada, MRSA (60/369) izolatları arasında hVISA oranı %16,3 iken MSSA (16/388) izolatları arasındaki hVISA oranı %4,1'dir. Bizim çalışmamızda hVISA oranı MRSA (1/64) izolatlarında %1,6 ve MSSA (1/41) izolatlarında ise %2,4 olarak saptanmıştır. MRSA izolatlarının yanı sıra MSSA izolatlarının da hVISA araştırılması yapılması hVISA'nın gerçek prevalansını saptamada faydalı olabileceği kanısına varılmıştır.

Vankomisin MİK değeri ile hVISA arasında ilişkiyi araştıran çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Hindistan'da yapılan bir çalışmada vankomisin MİK değeri 1 mg/L ve üzeri olan izolatlarda hVISA oranı daha yüksek bulunmuştur (55). Kanada'da yapılan bir çalışmada vankomisin MİK değeri 2 mg/L olan izolatların %8,1'i, MİK değeri 1 mg/L olan izolatların %1,5'i hVISA olarak saptanmıştır (92). ABD'de yapılan bir çalışmada ise tüm izolatların %0,3'ü, vankomisin MİK değeri 2 mg/L olan izolatların ise %10,5'i hVISA olarak saptanmıştır (93). Çalışmamızda tüm izolatların %1,9'u, MİK değeri 1 mg/L olan izolatların %1,8'i, MİK değeri 2 mg/L olan izolatların %2,7'si hVISA olarak saptanmıştır. Çalışmalar MİK değeri artışı ile hVISA oranı arasında korelasyon olabileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak çalışmalarda hVISA oranların farklı olmasının nedenleri; çalışmalarda tarama için farklı yöntemlerin kullanılmış olması, bazı çalışmalarda referans yöntem olan PAP-AUC'nin uygulanmamış olması, çalışmaya sadece MRSA izolatlarının dahil edilmesi veya vankomisin MİK değeri 1 mg/L ve üzeri izolatların alınmış olması olabilir.

Çalışmamızda teikoplanin MİK değeri 4 mg/L dirençli, vankomisin MİK değeri 2 mg/L duyarlı bir MRSA izolatı saptanmıştır. Benzer şekilde yayınlarda teikoplanine dirençli olup vankomisine duyarlı MRSA izolatları bildirilmiştir (55, 94). İtalya'da *S. aureus* izolatlarında vankomisin ve teikoplanin in vitro etkinliğinin karşılaştırıldığı bir çalışmada teikoplanine dirençli dokuz izolatın dördünün vankomisin MİK değeri 2 mg/L, birinin MİK değeri 1,5 mg/L bulunmuş, diğer dört izolat ise vankomisine dirençli bulunmuştur (95). Teikoplanin dirençli *S. aureus* 'ta teikoplanin direncinden teikoplanin dirençli operon (tca RAB), tca A geni ve tca B

geni sorumlu tutulmuştur (55, 96). Çalışmamızdaki teikoplanin dirençli izolat için de benzer direnç genleri olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda delafloksasin MİK değerleri referans yöntem olan SMD yöntemi ile araştırılmıştır. Aynı yöntemle yapılan çalışmalar bulunmaktadır. Pfaller ve ark.'nın (8) yaptığı çalışmada delafloksasin duyarlılığı, *S. aureus* izolatlarının %92,8'inde (MSSA'nın %98,5'i ve MRSA'nın %83,6'sı) saptanmıştır. Nicola ve ark.'nın (97) yaptığı çalışmada delafloksasin için duyarlılık oranları MRSA izolatlarında %97,5, MSSA izolatlarında %97,7 oranında saptanmıştır. ABD ve Avrupa *S. aureus* izolatlarıyla yapılan bir çalışmada ise ABD izolatlarında %95,6 (MRSA %91,2, MSSA %99,5), Avrupa izolatlarında %98,4 (MRSA %95,3, MSSA %99,5) oranında duyarlılık saptanmıştır (9). Çalışmamızda delafloksasin duyarlılık oranı *S. aureus* izolatlarında %81,9, MRSA izolatlarında %75, MSSA izolatlarında %92,7 olarak saptanmış olup; diğer çalışmalara göre daha düşük duyarlılık oranı gözlenmiştir. Pfaller ve ark.'nın (8) yaptığı çalışmada levofloksasin direnci, *S. aureus* izolatlarının %28,1'inde (MSSA'nın %7,7'si ve MRSA'nın %61,3'ü) saptanmıştır. Levofloksasin dirençli izolatlarının %74,6'sı (levofloksasin dirençli MSSA'nın %80,8'i ve levofloksasin dirençli MRSA'nın %73,3'ü) delafloksasine duyarlı saptanmıştır. Nicola ve ark.'nın (97) yaptığı çalışmada levofloksasin için direnç MRSA izolatlarında %10, MSSA izolatlarında %2,3 oranında saptanmıştır. Çalışmamızda levofloksasin direnç oranı *S. aureus* izolatlarında %19 (MRSA izolatlarında %26,6, MSSA izolatlarında %7,3) saptandı. Levofloksasin dirençli *S. aureus* izolatlarının %10'u (MRSA izolatlarının %5,8'i, MSSA izolatlarının %33,3'ü) delafloksasine duyarlı saptandı. Çalışmamızda levofloksasin direnç oranları diğer çalışmalarla benzer iken, levofloksasin dirençli izolatlarda delafloksasinin direnç oranı yüksek saptanmıştır.

S. aureus izolatlarının delafloksasin için MİK50/90 değerlerinin saptandığı çalışmalar bulunmaktadır. Pfaller ve ark.'nın (8) yaptığı çalışmada *S. aureus* izolatlarının MİK50/90 değeri 0,008 mg/L /0,25 mg/L olarak saptanmıştır. ABD ve Avrupa izolatları ile yapılan bir çalışmada; ABD izolatları için MİK50/90 değeri sırasıyla *S. aureus*'ta $\leq 0,004$ mg/L /0,25 mg/L (MSSA'da $\leq 0,004$ mg/L /0,03 mg/L, MRSA'da 0,06 mg/L/0,5 mg/L) saptanmış; Avrupa izolatları için MİK50/90 değeri

sırasıyla *S. aureus*'ta $\leq 0,004$ mg/L/0,12 mg/L (MSSA'da $\leq 0,004$ mg/L/ $\leq 0,004$ mg/L, MRSA'da 0,12 mg/L /0,25 mg/L) saptanmıştır (9). McCurdy ve ark.'nın (58) yaptığı çalışmada delafloksasin *S. aureus*, MİK50/90 değerleri sırasıyla 0,008 mg/L/0,25 mg/L (MRSA'da 0,12 mg/L/0,25 mg/L) saptanmıştır. Flamm ve ark.'nın (93) yaptığı çalışmada *S. aureus*, delafloksasin MİK50/90 değeri sırasıyla 0.008 mg/L/0.5 mg/L (MRSA'da 0,12 mg/L/1 mg/L) saptanmıştır. Nicola ve ark.'nın (97) yaptığı çalışmada *S. aureus*, delafloksasin MİK50/90 değeri MRSA izolatları için 0.004 mg/L/0.064 mg/L, MSSA izolatları için 0.002 mg/L/0.004 mg/L saptanmıştır. Çalışmamızda *S. aureus* izolatları için delafloksasin için MİK50/90 değerleri sırasıyla 0,008 mg/L/0,5 mg/L (MSSA'da 0,008 mg/L/0,016 mg/L, MRSA'da 0,008 mg/L/0,5 mg/L) olarak diğer çalışmalara benzer değerlerde MİK 50/90 değerleri saptanmıştır.

6. SONUÇLAR

1. Çalışmamıza 2021-2023 yılları arasında izole edilen toplam 105 *S. aureus* izolatu dahil edildi.
2. İzolatların elde edildiği örneklerin %43,8'i yataklı servis, %39'u yoğun bakım ünitesi ve %17,1'i poliklinikten gönderilmiş olup; %47,6'sı yara sürüntü örneği, %35,2'si derin trekal aspirat, %14,3'ü balgam, %2,9'u doku örneğinden oluşmuştur.
3. Çalışmaya dahil edilen 105 *S. aureus* izolatının 64'ünde (%61) *mecA* geni tespit edilirken, 41'inde (%39) *mecA* geni tespit edilmedi. Hiçbir izolatta *mecC* geni tespit edilmedi.
4. Metisilin direnci saptamada *mecA* PZR referans yöntem alınarak sefoksitin disk difüzyon yöntemi, VITEK 2 oksasilin MİK, VITEK 2 sefoksitin tarama değerlendirildiğinde özgüllüğü ve duyarlılığı sırasıyla %97,6,%100; %92,7, %100; %87,8, %100 saptanmıştır. En iyi performans sefoksitin disk difüzyon yöntemi için bulunmuştur.
5. Tüm *S. aureus* izolatları (n:105) SMD yöntemi ile vankomisine duyarlı bulundu. Bir izolat teikoplanine (MİK: 4 mg/L) dirençli saptandı.
6. hVISA saptanması için kullanılan tarama testlerinden makro gradiyent yöntemiyle hVISA şüpheli izolat saptanmazken; teikoplanin tarama agar yöntemi ile toplam 12 izolat (dokuz MRSA, üç MSSA) hVISA şüpheli olarak saptandı.
7. 12 hVISA şüpheli izolatın altın standart yöntem olan PAP-AUC ile doğrulanması sonucu bir MRSA ve bir MSSA izolatu olmak üzere iki izolat hVISA olarak değerlendirildi.
8. hVISA olarak değerlendirilen iki izolatın biri servis biri yoğun bakım hastasıydı, vankomisin MİK değerleri 2 mg/L ve 1 mg/L olarak saptandı. Dosya bilgileri incelendiğinde her iki hastanın da daha önceden vankomisin tedavisi almadığı görüldü.
9. 105 *S. aureus* izolatının 19'u ((%18,1) delafloksasine dirençli bulundu. (Üç MSSA, 16 MRSA)
10. Delafloksasin için MİK_{50/90} değerleri sırasıyla 0,008 mg/L/0,5 mg/L (MSSA'da 0,008 mg/L /0,016 mg/L, MRSA'da 0,008 mg/L 0,5 mg/L) saptandı.

7. ÖZET

Staphylococcus aureus (*S. aureus*), sağlıklı insanların cilt ve burun florasında bulunabilen, deri başta olmak üzere yumuşak doku, kemik, kan dolaşımı ve solunum yolu enfeksiyonları, toksik şok sendromu ve besin zehirlenmesi gibi ciddi enfeksiyonlara da yol açabilen fırsatçı gram pozitif bir bakteridir.

Vankomisin ve teikoplanin metisilin dirençli *S. aureus* (MRSA) enfeksiyonlarının tedavisi için en sık tercih edilen antibiyotiklerdir. Ancak, vankomisin ve teikoplanine karşı direnç artmaktadır, bununla ilişkili olarak yeni antibiyotiklere olan ihtiyaç vardır. Delafloksasin yeni bir antibiyotik olup, metisilin duyarlı *S. aureus* (MSSA) ve MRSA'ya karşı etkili in vitro aktiviteye sahip, çift hedefli anyonik yeni bir florokinolondur. Amerika Birleşik Devletleri gıda ve ilaç dairesi (FDA) tarafından yetişkin hastaların akut bakteriyal deri ve deri yapısı enfeksiyonları (ABDYE) ve toplum kökenli bakteriyal pnömoni (TKBP) tedavisinde duyarlı patojenler için onaylanmıştır.

Bu çalışmanın amaçları, *S. aureus* izolatlarında metisilin direnci saptamada farklı yöntemlerin performansının karşılaştırılması, popülasyon analiz profili-eğri altında kalan alan (PAP-AUC) ile vankomisine heterojen dirençli *Staphylococcus aureus* (hVISA) araştırılması ve delafloksasinin in vitro etkinliğinin sıvı mikrodilüsyon (SMD) yöntemi ile değerlendirilmesidir.

Çalışmaya Haziran 2021 ve Ekim 2023 tarihleri arasında yara, doku, derin trakeal aspirat ve balgam örneklerinden izole edilen toplam 105 *S. aureus* izolatu dahil edildi. Tanımlama konvansiyonel yöntemlerle ve matrix assisted laser desorption ionization time off flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonics, Almanya) ile yapıldı. Metisilin direnci, sefoksitin (30 µg) (Bioanalyse, Türkiye) diski, VITEK 2 otomatize sistem (BioMerieux, Fransa) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile *mecA* ve *mecC* gen bölgesi araştırılarak tespit edildi. *S. aureus* izolatlarında vankomisin, teikoplanin ve delafloksasin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri SMD yöntemi ile tespit edildi. hVISA varlığı teikoplanin agar tarama yöntemi ve makro gradiyent test yöntemi ile araştırıldı ve altın standart yöntem olan PAP-AUC ile doğrulaması yapıldı.

mecA geni PZR ile 64 (%61) izolatta saptandı. *mecC* geni hiçbir izolatta tespit edilmedi. Metisilin direnci saptamada referans yöntem olarak *mecA* PZR alındığında, sefoksitin disk difüzyon yönteminin özgüllüğü, duyarlılığı, pozitif prediktif değeri ve negatif prediktif değeri sırasıyla %97,6, %100, %98,5, %100; VITEK 2 oksasilin MİK için özgüllük, duyarlılık, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değer sırasıyla %92,7, %100, %95,5, %100; VITEK 2 sefoksitin taramanın özgüllük duyarlılık, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değerleri sırasıyla %87,8, %100, %92,7, %100 saptandı. Sefoksitin disk difüzyon yöntemi en iyi performansa sahipti.

S. aureus izolatlarında vankomisin 0,5-2 mg/L ve teikoplanin 0,125-2 mg/L MİK değeri aralıklarında duyarlı bulunurken bir izolatta teikoplanin 4 mg/L MİK değerinde dirençli bulundu. Vankomisin için MİK50 değeri 1 mg/L ve MİK90 değeri 2 mg/L, teikoplanin için MİK50 değeri 0,5 mg/L ve MİK90 değeri 1 mg/L olarak bulundu.

Makro gradiyent test yöntemi ile hVISA şüpheli izolat yoktu. Teikoplanin agar tarama yöntemi ile 12 izolat hVISA şüpheli saptandı. PAP-AUC yöntemi ile sadece iki izolatta (1 MRSA izolatı ve 1 MSSA izolatı) hVISA varlığı doğrulandı.

İzolatların 19'unda (%18,1) delafloksasin direnci bulundu. *S. aureus* izolatlarında delafloksasin duyarlılık oranı %81,9 idi (MRSA izolatlarında %75, MSSA izolatlarında %92,7). Levofloksasin direnç oranı *S. aureus* izolatlarında %19 (MRSA izolatlarında %26,6, MSSA izolatlarında %7,3) tespit edildi. Tüm izolatlarda delafloksasin için MİK50/90 değeri 0,008 mg/L/0,5 mg/L; MSSA izolatlarında 0,008 mg/L/0,016 mg/L; MRSA izolatlarında 0,008 mg/L/0,5 mg/L bulundu.

Sonuç olarak, *S. aureus* izolatlarında metisilin direnci tespitinde sefoksitin disk difüzyon yöntemi en iyi performansa sahiptir; enfeksiyon kontrolünde ve vankomisin tedavi başarısızlığındaki rolü nedeniyle klinikte önemli olan hVISA varlığı izolatların %1,9 oranında saptanmıştır; delafloksasin duyarlılık oranı, özellikle de levofloksasin dirençli izolatlarda, diğer çalışmalara göre daha düşük bulunmuştur.

Anahtar Sözcükler: *S. aureus*, Metisilin direnci, hVISA, PAP-AUC, Delafloksasin



8. ABSTRACT

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is an opportunistic gram-positive bacterium that can be found in the skin and nasal flora of healthy people and can cause serious infections, including skin, soft tissue, bone, bloodstream, respiratory tract, toxic shock syndrome, and food poisoning.

Vancomycin and teicoplanin are the most commonly preferred antibiotics for the treatment of methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) infections. However, resistance to vancomycin and teicoplanin is increasing, resulting in a need for new antibiotics. Delafloxacin is a novel antibiotic, a dual-target anionic fluoroquinolone with in vitro activity against methicillin sensitive *S. aureus* (MSSA) and MRSA. It is Food and Drug Administration (FDA)-approved for the treatment of susceptible pathogens in adult patients with acute bacterial skin and skin structure infections (ABSSSI) and community-acquired bacterial pneumonia (CABP).

The aims of this study are to compare the performance of different methods in detecting methicillin resistance in *S. aureus* isolates, to investigate (population analysis profile-area under the curve) PAP-AUC using heteroresistant vancomycin intermediate *S. aureus* (hVISA), and to evaluate in vitro activity of delafloxacin with the broth microdilution (BMD) method.

A total of 105 *S. aureus* isolates isolated from wound, tissue, deep tracheal aspiration and sputum samples between June 2021 and October 2023 were included in the study. Identification was performed by conventional methods and matrix assisted laser desorption ionization- time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonics, Germany). Methicillin resistance was determined by investigating the *mecA* and *mecC* gene regions using cefoxitin (30 µg) (Bioanalyse, Turkey) disk, VITEK 2 automated system (BioMerieux, France), and polymerase chain reaction (PCR). Vancomycin, teicoplanin, and delafloxacin minimum inhibitory concentration (MIC) values in *S. aureus* isolates were determined by the BMD method. The presence of hVISA was investigated by the teicoplanin agar screening method and the macrogradient test method, and confirmed by using PAP-AUC as the gold standard method.

The *mecA* gene was detected in 64 (61%) isolates by PCR. The *mecC* gene was not detected in any isolate. Using *mecA* PCR as the reference method for detecting methicillin resistance, the specificity, sensitivity, positive predictive value, and negative predictive value of the cefoxitin disk diffusion method were 97.6%, 100%, 98.5%, and 100%, respectively; the specificity, sensitivity, positive predictive value, and negative predictive value for the VITEK 2 oxacillin MIC were 92.7%, 100%, 95.5%, and 100%, respectively; and the specificity, sensitivity, positive predictive value, and negative predictive values of the VITEK 2 cefoxitin screening were 87.8%, 100%, 92.7%, and 100%, respectively. The cefoxitin disk diffusion method had the best performance.

S. aureus isolates were found susceptible to vancomycin at MIC values between 0.5 and 2 mg/L and teicoplanin at MIC values between 0.125 and 2 mg/L, while one isolate was found resistant to teicoplanin at MIC values of 4 mg/L. The MIC₅₀ for vancomycin was 1 mg/L and the MIC₉₀ was 2 mg/L. The MIC₅₀ for teicoplanin was 0.5 mg/L and the MIC₉₀ was 1 mg/L.

There were no isolates suspected of hVISA using the macrogradient test method. The teicoplanin agar screening method identified 12 isolates as suspected of hVISA. The presence of hVISA was confirmed in only two isolates (1 MRSA isolate and 1 MSSA isolate) using the PAP-AUC method.

Delafloxacin resistance was found in 19 (18.1%) of the isolates. The delafloxacin susceptibility rate in *S. aureus* isolates was 81.9% (75% in MRSA isolates, 92.7% in MSSA isolates). Levofloxacin resistance was 19% in *S. aureus* isolates (26.6% in MRSA isolates, 7.3% in MSSA isolates). The MIC_{50/90} value for delafloxacin was found to be 0.008 mg/L/0.5 mg/L in all isolates; 0.008 mg/L/0.016 mg/L in MSSA isolates; and 0.008 mg/L/0.5 mg/L in MRSA isolates.

In conclusion, the cefoxitin disk diffusion method had the best performance in detecting methicillin resistance in *S. aureus* isolates; the presence of hVISA, which is clinically important due to its role in infection control and vancomycin treatment failure, was detected in 1.9% of the isolates; the delafloxacin susceptibility rate, especially in levofloxacin-resistant isolates, was found to be lower than in other studies.

Keywords: *S. aureus*, Methicillin resistance, hVISA, PAP-AUC, Delafloxacin



9. KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Regional Office for Europe. Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance: Annual report. 2018.
2. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2014. Stockholm; 2015.
3. Doğan B, Palaz M, İzgür M. Metisilin Dirençli Staphylococcus aureus ve Önemi. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi 2018; 29(2):157-61.
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. Sun W, Chen H, Liu Y, Zhao C, Nichols WW, Chen M, et al. Prevalence and characterization of heterogeneous vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus isolates from 14 cities in China. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53(9):3642-9.
6. Jorgensen SCJ, Mercurio NJ, Davis SL, Rybak MJ. Delafloxacin: Place in Therapy and Review of Microbiologic, Clinical and Pharmacologic Properties. Infect Dis Ther 2018; 7(2):197-217.
7. McCurdy S, Keedy K, Lawrence L, Nenninger A, Sheets A, Quintas M, et al. Efficacy of Delafloxacin versus Moxifloxacin against Bacterial Respiratory Pathogens in Adults with Community-Acquired Bacterial Pneumonia (CABP): Microbiology Results from the Delafloxacin Phase 3 CABP Trial. Antimicrob Agents Chemother 2020; 64(3):e01949-19.
8. Pfaller MA, Flamm RK, McCurdy SP, Pillar CM, Shortridge D, Jones RN. Delafloxacin In Vitro Broth Microdilution and Disk Diffusion Antimicrobial Susceptibility Testing Guidelines: Susceptibility Breakpoint Criteria and Quality Control Ranges for an Expanded-Spectrum Anionic Fluoroquinolone. J Clin Microbiol 2018; 56(8):e00339-18.
9. Pfaller MA, Sader HS, Rhomberg PR, Flamm RK. In Vitro Activity of Delafloxacin against Contemporary Bacterial Pathogens from the United States and Europe, 2014. Antimicrob Agents Chemother 2017; 61(4):e02609-16.

10. Iregui A, Khan Z, Malik S, Landman D, Quale J. Emergence of Delafloxacin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Brooklyn, New York. *Clin Infect Dis* 2020; 70(8):1758-60.
11. Que Y-A, Moreillon P. *Staphylococcus aureus* (Including Staphylococcal Toxic Shock Syndrome). In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 9th Edition ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 2019. p. 2393-431.
12. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular Characterization, Evolution, and Epidemiology. *Clin Microbiol Rev* 2018; 31(4):e00020-18.
13. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Staphylococcus and Related Gram - Positive Cocci Medical Microbiology*. 9 ed: Elsevier Health Sciences; 2021.
14. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu. Mikrobiyolojik Tanımlama/Bakteriyoloji. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları Cilt 2. Ankara: Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı; 2015.
15. Shoaib M, Aqib AI, Muzammil I, Majeed N, Bhutta ZA, Kulyar MF, et al. MRSA compendium of epidemiology, transmission, pathophysiology, treatment, and prevention within one health framework. *Front Microbiol* 2022; 13:1067284.
16. Jorgensen JH, Pfaller MA. Introduction to the 11th Edition of the Manual of Clinical Microbiology. *Manual of Clinical Microbiology* 2015.
17. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, et al. Gram - Positive Cocci. In: Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, et al., editors. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 7th ed. Philadelphia, PA, USA: Wolters Kluwer Health; 2017. p. 670-732.
18. Gordon RJ, Lowy FD. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis* 2008; 46 Suppl 5(Suppl 5):S350-9.
19. Levinson W, Jawetz E. The *Staphylococci*. *Medical Microbiology & Immunology*. 28th ed: Prentice-Hall International; 1996. p. 205-14.
20. O'Riordan K, Lee JC. *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharides. *Clin Microbiol Rev* 2004; 17(1):218-34.

21. Patel H, Rawat S. A genetic regulatory see-saw of biofilm and virulence in MRSA pathogenesis. *Front Microbiol* 2023; 14:1204428.
22. Idrees M, Sawant S, Karodia N, Rahman A. Staphylococcus aureus Biofilm: Morphology, Genetics, Pathogenesis and Treatment Strategies. *Int J Environ Res Public Health* 2021; 18(14):7602.
23. Yazdani R, Oshaghi M, Havayi A, Pishva E, Salehi R, Sadeghizadeh M, et al. Detection of icaAD gene and biofilm formation in Staphylococcus aureus isolates from wound infections. *Iranian Journal of Public Health* 2006; 35(2):25-8.
24. Vancraeynest D, Hermans K, Haesebrouck F. Genotypic and phenotypic screening of high and low virulence Staphylococcus aureus isolates from rabbits for biofilm formation and MSCRAMMs. *Vet Microbiol* 2004; 103(3-4):241-7.
25. Cheung GYC, Bae JS, Otto M. Pathogenicity and virulence of Staphylococcus aureus. *Virulence* 2021; 12(1):547-69.
26. Lister JL, Horswill AR. Staphylococcus aureus biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Front Cell Infect Microbiol* 2014; 4:178.
27. Tam K, Torres VJ. Staphylococcus aureus Secreted Toxins and Extracellular Enzymes. *Microbiol Spectr* 2019; 7(2).
28. Otto M. Staphylococcus aureus toxins. *Curr Opin Microbiol* 2014; 17:32-7.
29. Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of Staphylococcus aureus. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13(1):16-34, table of contents.
30. Özkul H, Öktem İMA, Gülay Z. Klinik Örneklerden İzole Edilen Staphylococcus aureus Suşlarında Panton-Valentin Lökositidin (PVL) Varlığının Araştırılması. *Mikrobiyol Bült* 2007; 41:357-62.
31. van Hal SJ, Jensen SO, Vaska VL, Espedido BA, Paterson DL, Gosbell IB. Predictors of mortality in Staphylococcus aureus Bacteremia. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25(2):362-86.
32. Lee AS, de Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Nat Rev Dis Primers* 2018; 4:18033.
33. Scott LJ. Delafloxacin: A Review in Acute Bacterial Skin and Skin Structure Infections. *Drugs* 2020; 80(12):1247-58.

34. Tong SY, Davis JS, Eichenberger E, Holland TL, Fowler VG, Jr. Staphylococcus aureus infections: epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clin Microbiol Rev 2015; 28(3):603-61.
35. Ladhani S, Joannou CL, Lochrie DP, Evans RW, Poston SM. Clinical, microbial, and biochemical aspects of the exfoliative toxins causing staphylococcal scalded-skin syndrome. Clin Microbiol Rev 1999; 12(2):224-42.
36. Dündar D. Stafilokoklar. In: Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, editors. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 4th ed. İstanbul: Nobel Tıp; 2017. p. 1804-12.
37. İnfektif Endokarditin Tanısı, Tedavisi ve Önlenmesi: Ulusal Uzlaşı Raporu. 2019.
38. Lappin E, Ferguson AJ. Gram-positive toxic shock syndromes. Lancet Infect Dis 2009; 9(5):281-90.
39. Guo Y, Song G, Sun M, Wang J, Wang Y. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in Staphylococcus aureus. Front Cell Infect Microbiol 2020; 10:107.
40. Altun HU, Sancak B. Staphylococcus aureus' un tedavisinde yeni antibiyotikler. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2010; 40(2):63-74.
41. David MZ, Daum RS. Treatment of Staphylococcus aureus Infections. Curr Top Microbiol Immunol 2017; 409:325-83.
42. Garau J, Bouza E, Chastre J, Gudiol F, Harbarth S. Management of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections. Clin Microbiol Infect 2009; 15(2):125-36.
43. Nascimento-Carvalho CM. Delafloxacin as a treatment option for community-acquired pneumonia infection. Expert Opin Pharmacother 2021; 22(15):1975-82.
44. Mlynarczyk-Bonikowska B, Kowalewski C, Krolak-Ulinska A, Marusza W. Molecular Mechanisms of Drug Resistance in Staphylococcus aureus. Int J Mol Sci 2022; 23(15):8088.

45. De Oliveira DMP, Forde BM, Kidd TJ, Harris PNA, Schembri MA, Beatson SA, et al. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. Clin Microbiol Rev 2020; 33(3):e00181-19.
46. Lade H, Joo HS, Kim JS. Molecular Basis of Non-beta-Lactam Antibiotics Resistance in Staphylococcus aureus. Antibiotics (Basel) 2022; 11(10).
47. Foster TJ. Antibiotic resistance in Staphylococcus aureus. Current status and future prospects. FEMS Microbiol Rev 2017; 41(3):430-49.
48. Cikman A, Aydin M, Gulhan B, Karakeçili F, Kurtoglu MG, Yuksekkaya S, et al. Absence of the mecC gene in methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from various clinical samples: The first multi-centered study in Turkey. J Infect Public Health 2019; 12(4):528-33.
49. Kaur DC, Chate SS. Study of Antibiotic Resistance Pattern in Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus with Special Reference to Newer Antibiotic. J Glob Infect Dis 2015; 7(2):78-84.
50. Ariza-Miguel J, Hernandez M, Fernandez-Natal I, Rodriguez-Lazaro D. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus harboring mecC in livestock in Spain. J Clin Microbiol 2014; 52(11):4067-9.
51. Kilic A, Dogan E, Kaya S, Baysallar M. [Investigation of the presence of mecC and Panton-Valentine leukocidin genes in Staphylococcus aureus strains isolated from clinical specimens during seven years period]. Mikrobiyol Bul 2015; 49(4):594-9.
52. Zeng D, Debabov D, Hartsell TL, Cano RJ, Adams S, Schuyler JA, et al. Approved Glycopeptide Antibacterial Drugs: Mechanism of Action and Resistance. Cold Spring Harb Perspect Med 2016; 6(12):a026989.
53. 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.
54. Gülay Z, Atay T, Yuluğ N. Staphylococcus aureus suşlarında vankomisin direncinin araştırılması ANKEM Derg 1998:12-101.

55. Bakthavatchalam YD, Babu P, Munusamy E, Dwarakanathan HT, Rupali P, Zervos M, et al. Genomic insights on heterogeneous resistance to vancomycin and teicoplanin in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A first report from South India. *PLoS One* 2019; 14(12):e0227009.
56. 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.
57. EUCAST Klinik ve/veya epidemiyolojik önemi olan direnç mekanizmaları ve direnç özelliklerini saptama kılavuzu V 2.0¹ 2017 [Available from: <https://www.tmc-online.org/userfiles/file/EUCAS-CEVIRI-2017.pdf>].
58. McCurdy S, Lawrence L, Quintas M, Woosley L, Flamm R, Tseng C, et al. In Vitro Activity of Delafloxacin and Microbiological Response against Fluoroquinolone-Susceptible and Nonsusceptible *Staphylococcus aureus* Isolates from Two Phase 3 Studies of Acute Bacterial Skin and Skin Structure Infections. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61(9).
59. Remy JM, Tow-Keogh CA, McConnell TS, Dalton JM, Devito JA. Activity of delafloxacin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: resistance selection and characterization. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67(12):2814-20.
60. Shortridge D, Flamm RK. Comparative In Vitro Activities of New Antibiotics for the Treatment of Skin Infections. *Clin Infect Dis* 2019; 68(Suppl 3):S200-S5.
61. Saravolatz LD, Stein GE. Delafloxacin: A New Anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Fluoroquinolone. *Clin Infect Dis* 2019; 68(6):1058-62.
62. Kocsis B, Gulyas D, Szabo D. Delafloxacin, Finafloxacin, and Zabofloxacin: Novel Fluoroquinolones in the Antibiotic Pipeline. *Antibiotics (Basel)* 2021; 10(12):1506.
63. Turban A, Guerin F, Dinh A, Cattoir V. Updated Review on Clinically-Relevant Properties of Delafloxacin. *Antibiotics (Basel)* 2023; 12(8):1241.

64. Mogle BT, Steele JM, Thomas SJ, Bohan KH, Kufel WD. Clinical review of delafloxacin: a novel anionic fluoroquinolone. *J Antimicrob Chemother* 2018; 73(6):1439-51.
65. Patel R. A Moldy Application of MALDI: MALDI-ToF Mass Spectrometry for Fungal Identification. *J Fungi (Basel)* 2019; 5(1):4.
66. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST): breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters version 15.0 2025 [Available from: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_15.0_Breakpoint_Tables.pdf.
67. EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing Version 11.0 2023 [Available from: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2023_manuals/Manual_v_11.0_EUCAST_Disk_Test_2023.pdf.
68. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) reading guide for broth microdilution 2022 [Available from: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2022_manuals/Reading_guide_BMD_v_4.0_2022.pdf.
69. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). M100 Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. 33rd ed: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2023.
70. Wootton M, MacGowan AP, Walsh TR, Howe RA. A multicenter study evaluating the current strategies for isolating *Staphylococcus aureus* strains with reduced susceptibility to glycopeptides. *J Clin Microbiol* 2007; 45(2):329-32.
71. Kizilarlanoglu MC, Sancak B, Yagci S, Hascelik G, Unal S. [Evaluation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia and comparison of prognosis according to vancomycin MIC values: experience of the last ten years]. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47(2):199-210.
72. Kaase M, Baars B, Friedrich S, Szabados F, Gatermann SG. Performance of MicroScan WalkAway and VITEK 2 for detection of oxacillin resistance in a set of

methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates with diverse genetic backgrounds. *J Clin Microbiol* 2009; 47(8):2623-5.

73. John MA, Burden J, Stuart JJ, Reyes RC, Lannigan R, Milburn S, et al. Comparison of three phenotypic techniques for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus* spp. reveals a species-dependent performance. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63(3):493-6.

74. Yuceel-Timur I, Garner CD, Franklin S, Hardy DJ. Performance evaluation of cefoxitin screen test on two different automated antimicrobial susceptibility test systems: a comparative study. *Microbiol Spectr* 2024; 12(9):e0381523.

75. Atay T, Gülay Z, Kocagöz S, Yuluğ N. *Staphylococcus aureus* izolatlarının metisilin direncinin saptanmasında rutin duyarlılık testleri ve *mecA* gen analizi sonuçlarının karşılaştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2002; 36(2):133-40.

76. Madhavan A, Sachu A, Balakrishnan A, Vasudevan A, Balakrishnan S, Vasudevapannicker J. Comparison of PCR and phenotypic methods for the detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Iran J Microbiol* 2021; 13(1):31-6.

77. Sakoulas G, Gold HS, Venkataraman L, DeGirolami PC, Eliopoulos GM, Qian Q. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: comparison of susceptibility testing methods and analysis of *mecA*-positive susceptible strains. *J Clin Microbiol* 2001; 39(11):3946-51.

78. Witte W, Pasemann B, Cuny C. Detection of low-level oxacillin resistance in *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13(4):408-12.

79. Swenson JM, Lonsway D, McAllister S, Thompson A, Jevitt L, Zhu W, et al. Detection of *mecA*-mediated resistance using reference and commercial testing methods in a collection of *Staphylococcus aureus* expressing borderline oxacillin MICs. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 58(1):33-9.

80. Uzun B, Karatas Sener AG, Gungor S, Afsar I, Yuksel Ergin O, Demirci M. [Comparison of Cefoxitin Disk Diffusion Test, Automated System and Chromogenic Medium for Detection of Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus* Isolates]. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47(1):11-8.

81. Ozel G, Aslan V, Bahar Erdem G, Cagatay M, Sencan I, Mert A. [Comparison of oxacillin, cefoxitin, ceftizoxime, and moxalactam disk diffusion methods for detection of methicillin susceptibility in staphylococci]. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(2):258-65.
82. Hancı H, Ayyıldız A, Baltacı M, Igan H, Uyanık M, Adıgüzel A. Detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates by classical and molecular methods. *Klinik Dergisi* 2018; 31(1):30-3.
83. Junkins AD, Lockhart SR, Heilmann KP, Dohrn CL, Von Stein DL, Winokur PL, et al. BD Phoenix and Vitek 2 detection of mecA-mediated resistance in *Staphylococcus aureus* with cefoxitin. *J Clin Microbiol* 2009; 47(9):2879-82.
84. Al Nakib M, Reglier-Poupet H, Longo M, Adam JM, Raymond J, Zambardi G, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing low-level methicillin resistance may not be detected by the VITEK2(R) system. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 72(2):193-5.
85. Atay T, Gulay Z. Comparison of PBP2a latex agglutination test with disk diffusion, mecA PCR and Vitek for the detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Ankem Dergisi* 2004; 18(4):205-8.
86. Kuscı F, Oztürk DB, Gurbuz Y, Tutuncu EE, Sencan I, Gul S. [Investigation of reduced vancomycin susceptibility in methicillin-resistant staphylococci]. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(2):248-57.
87. Ucar S, Duman Y, Tanriverdi ES, Tekerekoglu MS, Otlı B. [Investigation of the VISA and hVISA Presence in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates by Various Methods]. *Mikrobiyol Bul* 2022; 56(4):593-605.
88. Sancak B, Ercis S, Menemenlioglu D, Colakoglu S, Hascelik G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin in a Turkish university hospital. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56(3):519-23.
89. Korkut Tunç E, Kuzucu Ç, Otlı B. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarında vankomisine karşı azalmış duyarlılığın araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2017; 47(1):39-46.
90. Çıkman A, Aydın M, Gülhan B, Parlak M, Gültepe B, Kalaycı Y. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* izolatlarının antibiyotik direnci ve azalmış

vankomisin duyarlılığının araştırılması: çok merkezli bir çalışma. Mikrobiyol Bul 2015; 49(2):240-8.

91. Hu J, Ma XX, Tian Y, Pang L, Cui LZ, Shang H. Reduced vancomycin susceptibility found in methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Northeast China. PLoS One 2013; 8(9):e73300.

92. Adam HJ, Louie L, Watt C, Gravel D, Bryce E, Loeb M, et al. Detection and characterization of heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* isolates in Canada: results from the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program, 1995-2006. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(2):945-9.

93. Richter SS, Satola SW, Crispell EK, Heilmann KP, Dohrn CL, Riahi F, et al. Detection of *Staphylococcus aureus* isolates with heterogeneous intermediate-level resistance to vancomycin in the United States. J Clin Microbiol 2011; 49(12):4203-7.

94. Szymanek-Majchrzak K, Mlynarczyk A, Mlynarczyk G. Characteristics of glycopeptide-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from inpatients of three teaching hospitals in Warsaw, Poland. Antimicrob Resist Infect Control 2018; 7:105.

95. Tascini C, Flammini S, Leonildi A, Ciullo I, Tagliaferri E, Menichetti F. Comparison of teicoplanin and vancomycin in vitro activity on clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. J Chemother 2012; 24(4):187-90.

96. Maki H, McCallum N, Bischoff M, Wada A, Berger-Bachi B. *tcaA* inactivation increases glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(6):1953-9.

97. Nicola F, Azula N, Santoni G, Smayevsky J. [In vitro activity of delafloxacin against bacterial isolates from osteoarticular and skin infections in Buenos Aires, Argentina]. Rev Argent Microbiol 2022; 54(2):114-9.