



Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus*'larda hVISA Belirlenmesinde İki Farklı Yöntemin Karşılaştırılması

Comparison of Two Different Methods for Determination of hVISA in Methicilline-Resistant *Staphylococcus Aureus*

Nesrin Sakarya¹, Ayşe Büyüktaş Manay¹, Hadiye Demirbakan², Deniz Gazel¹

¹Gaziantep Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep, Türkiye

²Sanko Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep, Türkiye

Özet

Amaç: Vankomisine dirençli *Staphylococcus aureus* (VRSA) ve vankomisine orta derecede dirençli *S. aureus* (VISA) dışında, stafilocok enfeksiyonlarının tedavi sürecindeki başarısızlığın önemli nedenlerinden birisinin de vankomisine heterojen-orta dirençli *S. aureus* (hVISA) olduğu düşünülmektedir. Ancak, hVISA'yı tespit etmek yoğun emek isteyen ve uzmanlık gerektiren bir süreçtir. Çalışmamızda üçüncü basamak üniversite hastanesinden izole edilmiş Metisilin Dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatlarında hVISA oranlarının belirlenmesi ve popülasyon analizi profili (PAP) yöntemi ile Satola testinin kıyaslanması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Altmış MRSA izolatu çalışmaya alınmıştır. Öncelikle tüm izolatların sıvı mikro dilüsyon yöntemiyle MİK değerlerine bakılmıştır. Ardından hVISA tespiti için, izolatlar Satola'nın geliştirdiği beyin kalp infüzyon agar tarama yöntemi ve altın standart kabul edilen PAP yöntemi ile çalışılarak, sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Bulgular: Tüm izolatlar vankomisine karşı duyarlı bulunmuş, Satola testinde 48. saatteki sonuçlara göre 28 izolat (%46.66) hVISA olarak saptanmıştır. hVISA olarak tespit edilen izolatlar PAP yönteminde değerlendirilmiştir. 28 MRSA izolatından 12'si hVISA olarak tespit edilmiştir. Satola testinde hVISA oranı %46.66 (28/60) olarak tespit edilmiştir. Bu izolatlara PAP metodu ile araştırma yapıldığında sadece %20 (12/60)'si hVISA olarak tespit edilmiştir.

Sonuç: Çalışmamızda Satola ve PAP yöntemiyle bölgemizde ilk defa hVISA oranları araştırılmıştır. Elde edilen veriler ışığında, Satola testi ile PAP karşılaştırıldığında Satola testinde yalnızca pozitiflik oranının yüksek olduğu saptanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *S. aureus*; MRSA; hVISA; VISA

Abstract

Introduction: Except vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) and vancomycin intermediate *S. aureus* (VISA), one of the important causes of failure in the treatment of staphylococcal infections is considered to be vancomycin heterogeneous-intermediate resistant *S. aureus* (hVISA). But detecting hVISA is a labor-intensive and specialized procedure. In our study, it was aimed to determine the hVISA rates in Methicilline-Resistant *S. aureus* (MRSA) strains isolated from a tertiary university hospital and to compare the population analysis profile (PAP) method with the Satola test.

Materials and Methods: Sixty MRSA isolates were taken to the study. First of all, the MIC values of all isolates were determined using the broth microdilution method. Then the brain heart infusion agar screening method developed by Satola and the PAP method, which is accepted as the gold standard, were compared for detecting hVISA.

Results: All isolates were found to be sensitive to vancomycin. Satola method was performed and 28 isolates (46.66%) were determined as hVISA at the 48th hour. These strains detected as hVISA were re-evaluated in the PAP method. Among these only 20% (12/60 of all isolates) strains were identified as hVISA.

Conclusion: In our study, hVISA rates were investigated for the first time in our region using Satola's method and PAP method. In the light of the data obtained, when the Satola test and PAP were compared, it was determined that the false positive rate was high in the Satola test.

Keywords: *S. aureus*; MRSA; hVISA; VISA.

Giriş

Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ciddi mortalite, morbiditeye yol açan hastane enfeksiyonlarının en sık bakteriyel etkenlerinden birisidir. Bu stafilocok türleri ile meydana gelen ciddi enfeksiyonların tedavisinde, glikopeptidler gibi hücre duvar sentezini inhibe eden ve beta-laktam halkası taşımayan bir antibiyotik kullanımını gereklidir. Klinikte en yaygın kullanılan glikopeptid antibiyotik vankomisin (1).

İlk olarak 1956 yılında kullanıma girmiş ancak hazırlanma aşamasındaki problemler nedeniyle kullanımdan kaldırılmıştır. Daha sonra MRSA'nın yaygınlaşması ile vankomisin tekrar kullanılmaya başlanmıştır. MRSA'lar, aminoglikozidlere, makrolidlere, antistafilokoksik penisilinlere ve tetrasiklinlere direnç geliştirdiği için glikopeptidler son çare olarak kullanılmaktadır. Glikopeptid antibiyotiklerin de yanlış doz ve sürede gereksiz yere kullanımı bu ilaçlara da direnç gelişimine

neden olmuştur (2). Hiramatsu ve ark (3) tarafından 1996 yılında vankomisin için duyarlılığı azalmış MİK değeri 8 µg/ml olan Mu50 suşu tespit edilmiş ve "VISA" olarak tanımlanmıştır. Yine Hiramatsu ve ark. (4) 1997'de yeni bir direnç tipi bildirmişlerdir; vankomisin için MİK değeri duyarlı olmasına rağmen popülasyon içindeki 10^{-5} - 10^{-6} bakterinin, vankomisinin 4-8 µg/ml konsantrasyonlarında üreyebildiğini, yani vankomisine heterojen olarak orta düzeyde duyarlı olduğunu tespit etmişler, bu suşa "Mu3" adını vermişler ve heterojen-VISA (hVISA) olarak tanımlamışlardır. Ardından birçok ülkede farklı oranlarda hVISA bildirilmeye başlanmıştır (4, 5). Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) ölçütlerine göre vankomisine duyarlı değerlerde bulunan (MİK \leq 2 µg/ml) ancak 10^{-5} - 10^{-6} popülasyonda bir sıklıkta olmak üzere, MİK $>$ 2 µg/ml içeren izolatlar "hVISA" olarak tanımlanmaktadır (6). MRSA'lar içerisinde hVISA izolatlarının görülme sıklığı değişkenlik göstermekle beraber %0.71-65 arasında değişmektedir (7). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)'te hVISA, VISA ve VRSA gibi birçok terim olmasına karşın, tüm kategorilerin klinik olarak dirençli kabul edilmesi önerilmektedir (5). Stafilokoklarda, hVISA'nın nedeni peptidoglikan biyosentezindeki değişikliğe bağlı olarak hücre duvarının kalınlaşması ve düzensiz hale gelmesidir. Penisilin bağlayan protein (PBP) 2 üretiminin aşırı artması ve PBP4 ekspresyonunun olmamasının da dirençte etkili olabileceği bildirilmiştir. Bugüne kadar saptanan ve farklı duyarlılık oranına sahip vankomisine orta düzeyde dirençli izolatların vankomisine uzun süre maruziyet sonrası ortaya çıktığı düşünülmektedir (7, 8). VISA/hVISA izolatlarının laboratuvarlarda uygulanan rutin duyarlılık testleriyle saptanması zordur ve rutin duyarlılık testleri popülasyon içindeki dirençli izolatları saptayamadığı için, duyarlıların eradikasyonu ve dirençli izolatların seçilmesi nedeniyle bu izolatlarla gelişen enfeksiyonların tedavisinde başarısızlığa yol açabilmektedir. Bu izolatların saptanması amacıyla, vankomisin içeren (4-6 mg/L) beyin kalp infüzyon agar (BKİ) agar ile tarama, E-test, makro E-test ve popülasyon analiz profili eğri altı alan (PAP) gibi farklı yöntemler kullanılmıştır (9-11). hVISA, laboratuvarlarda kullanılan duyarlılık testlerinden biri olan sıvı mikrodilüsyon ile duyarlı bulunmaktadır. CLSI'nin standart duyarlılık testleri için önerdiği inokulasyon yoğunluğu 5×10^5 CFU/ml'dir. Fakat 5×10^5 CFU/ml gibi düşük yoğunlukta inokulasyonlar ile tespit edilemeyebilir. Wootton ve ark. (10) tarafından tanımlanan popülasyon

analizi PAP yönteminin birçok çalışmada etkinliği ve tekrarlanabilir olduğu görülmüş, hVISA ve VISA suşlarını tespit etmedeki başarı oranı ve etkinliği %100 olarak bulunmuştur. Bu sebeplerden dolayı halen PAP yöntemi birçok araştırmacı tarafından VISA ve hVISA kökenlerinin tanımlanmasında altın standart olarak kabul edilmektedir (10, 11). Özel ekipmana ve teknik donanıma ihtiyaç duyulan çok zahmetli bir yöntemdir. Bu yüzden laboratuvarlarda rutin olarak kullanılmamaktadır. Satola ve ark. (12) 4 µg/ml vankomisin ve 16 g/l kazein içeren Beyin Kalp İnfüzyon (BKİ-VK) bir tarama agarı geliştirmişlerdir. Bu yöntem kolay, yüksek duyarlılıkta ve özgüllükte bulunmuştur. Ancak European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) de belirtildiği gibi bu sonucu destekleyen yalnızca bir çalışma vardır (5). Bu nedenle rutin kullanım için şimdilik olanaklı değildir. hVISA'yı tespit etmek yoğun emek ve uzmanlık isteyen zor bir süreçtir. Bu izolatların özellikle glikopeptid kullanımı yoğun olan merkezlerdeki prevalanslarının bilinmesi önemlidir. Araştırmamızda, Aralık 2017- Mart 2020 tarihleri arasında bir üniversite hastanesinde izole edilen MRSA suşlarında hVISA prevalansını tespit etmek, Satola ve ark. (12) tarafından geliştirilen ve yaptıkları çalışma ile diğer yöntemlere göre pratik ve duyarlı olduğu belirlenen yeni bir hVISA tarama yöntemiyle, altın standart kabul edilen PAP yöntemini karşılaştırmak amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışma grubu: Aralık 2017- Mart 2020 tarihleri arasında Sanko Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar'ında VITEK 2 Compact (BioMerieux, France) otomatik identifikasyon sistemi ile tanımlanan ve farklı hastalara ait klinik örneklerden MRSA olarak izole edilen ilk örnek olup -80°C'de stoklanan 60 MRSA izolatı çalışmaya alındı. Sonraki tüm laboratuvar analizleri Gaziantep Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarında yapıldı.

Laboratuvar analizleri: İzolatlar, %5 koyun kanlı agara (RTA, Türkiye) pasajlandı. 150 ml/L saf gliserol ve 850 ml/L Nutrient buyyon içeren boncuklu tüp (Pro-lab, Türkiye) kullanılarak yeniden -80°C'de stoklandı ve her çalışmadan önce ana tüpten %5 koyun kanlı agara iki kez pasajlandı. İlk aşamada, 60 MRSA izolatı ve kontrol suşu olarak kullanılan *S. aureus* ATCC 25923'dan 0,5 MacFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu elde edildi. Vankomisin tozu (Sigma Aldrich, ABD) sulandırılarak kullanıldı ve MİK değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak

hesaplandı. İzolatların MİK değerleri EUCAST (ISO 20776-1) tarafından önerilen sıvı mikrodilüsyon testi ile saptandı ve EUCAST kriterlerine göre değerlendirildi (13).

Satola testi: Satola ve arkadaşları tarafından önerilen yöntemde, öncelikle stoklanan 60 MRSA izolatı ve hVISA kontrol suşu olarak kullanılan *S. aureus* ATCC 700698 (Mu3) suşu %5 koyun kanlı agara iki kez pasajlandı. Üç ml serum fizyolojik ile doldurulan tüplerin üzerlerine öze ile kolonilerden bir miktar alınıp eklendi, vortekslenildi ve 0.5 Mac Farland bulanıklığında bakteri süspansiyonları elde edildi. Akabinde, 4 µg/ml vankomisin olacak

şekilde, 16 g/l kazein içeren beyin kalp infüzyon agar (GBL, Türkiye) plakları hazırlandı (12, 14). Hazırlanan besiyerleri, petrinin dış yüzeyinden dört kadrana ayrılacak şekilde çizildi (Şekil 1.). Çalışma yapılacak her izolat için, önceden hazırlanan 0.5 MacFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonundan 10'ar µl pipet yardımı ile vankomisin ve kazein içeren agar plaklarının dört kadrana damlatıldı. Beş dakika boyunca oda ısısında kurumaya bırakıldıktan sonra 35°C'lik etüve 48. saatte okunmak üzere kaldırıldı.

Tablo 1: hVISA popülasyon analizi (PAP) sonuçları

İzolat no	İzole edildiği yerler	İzolatların MİK değerleri (µg/ml)	Eğri altı alan oranı (izolat/standart suş)	Beklenen aralık	Sonuç
2	CYB	0.25	0.65	0.9-1.3	NEGATİF
7	G. Servis	0.5	0.96	0.9-1.3	hVISA
13	CYB	0.5	0.92	0.9-1.3	hVISA
17	G. Servis	0.5	0.18	0.9-1.3	NEGATİF
32	G. Servis	0.5	0.41	0.9-1.3	NEGATİF
42	CYB	0.5	0.50	0.9-1.3	NEGATİF
58	Poliklinik	0.5	0.16	0.9-1.3	NEGATİF
3	CYB	0.5	0.90	0.9-1.3	hVISA
4	CYB	0.5	0.24	0.9-1.3	NEGATİF
24	CYB	0.5	0.57	0.9-1.3	NEGATİF
26	YDYB	0.5	1.12	0.9-1.3	hVISA
29	CYB	0.125	0.94	0.9-1.3	hVISA
40	G. Servis	0.5	0.64	0.9-1.3	NEGATİF
41	CYB	0.5	0.79	0.9-1.3	NEGATİF
49	G. Servis	0.5	0.90	0.9-1.3	hVISA
50	CYB	0.25	1.25	0.9-1.3	hVISA
53	Poliklinik	0.5	0.71	0.9-1.3	NEGATİF
55	CYB	1	0.25	0.9-1.3	NEGATİF
22	CYB	0.25	0.65	0.9-1.3	NEGATİF
56	CYB	0.5	0.92	0.9-1.3	hVISA
19	Poliklinik	0.5	0.91	0.9-1.3	hVISA
39	CYB	0.5	0.93	0.9-1.3	hVISA
9	G. Servis	0.5	0.41	0.9-1.3	NEGATİF
20	Poliklinik	0.5	0.61	0.9-1.3	NEGATİF
26	YDYB	0.5	0.53	0.9-1.3	NEGATİF
10	G. Servis	0.25	1.01	0.9-1.3	hVISA
14	CYB	0.5	0.93	0.9-1.3	hVISA
46	Poliklinik	0.125	0.54	0.9-1.3	NEGATİF

Enkübasyon sonunda besiyerinde en az bir kadranda 2 veya daha fazla koloninin üremesi hVISA olarak değerlendirildi (12, 14).

Popülasyon analizi profili eğri altı alan hesaplanması: Satola testinde pozitif bulunan her bir izolat farklı dilüsyonlarda, farklı antibiyotik konsantrasyonu içeren besiyerlerine ekildi (3, 15). Kontrol ve bakteri izolatlarının 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} 'lık seri dilüsyonları hazırlandı. Her bir izolat için, farklı dilüsyonlarda sulandırım yapılmış bakteri süspansiyonlarını, farklı konsantrasyonlarda antibiyotik içeren agar plaklarına ekmek için 1, 2, 4, 5, 6, 8 ve 10 µg/ml konsantrasyonlarında vankomisin içeren BKİ agar plakları hazırlandı (3, 15). Bu yöntemde her bir izolat için toplamda 56 petri (yedi farklı konsantrasyon ve sekiz dilüsyon) kullanılmış oldu. Her bir seri dilüsyondan 50 µl miktar, vankomisinli BKİ agar besiyerlerine damlatılarak yayıldı. Petriler 35°C'lik etüvde 24. ve 48. saatte üreyen koloniler sayılmak üzere enkübe edildi. Enkübasyon sonrasında sayılabilir üreme gözlenen (30-300 koloni arasında) petrilerdeki koloniler sayıldı ve sayım yapılan petriye ait dilüsyon katsayı ile çarpılarak üreyen bakteri sayısı hesaplandı. Antibiyotik konsantrasyonları x ekseninde, koloni sayımlarının logaritması y ekseninde olacak şekilde tüm izolatlar için PAP grafiği oluşturuldu (Şekil 2.). Microsoft Excel programında oluşan bu grafiklerin eğri altı alanları hesaplandı. Çalışma izolatlarının eğri altı alanları eşzamanlı olarak çalışılan Mu3 suşunun eğri altı alanına bölündü. Çıkan oran 0.9-1.3 aralığında ise mikroorganizma "hVISA" olarak kabul edildi (3, 15).

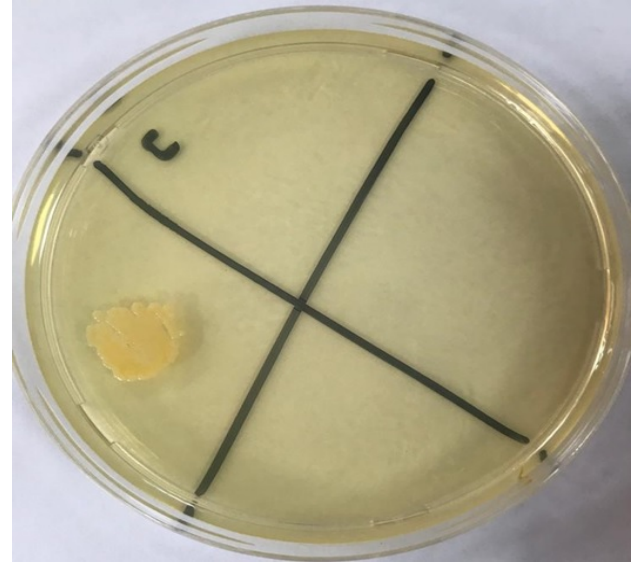
Etik onam: Bu çalışma için Gaziantep Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 27.05.2020 tarih ve 220/180 nolu karar ile izin alınmıştır.

İstatistiksel analiz: Tüm veriler excel programına girilmiş, tanımlayıcı çalışma olduğundan istatistik olarak sayı ve yüzde değerleri verilmiştir.

Bulgular

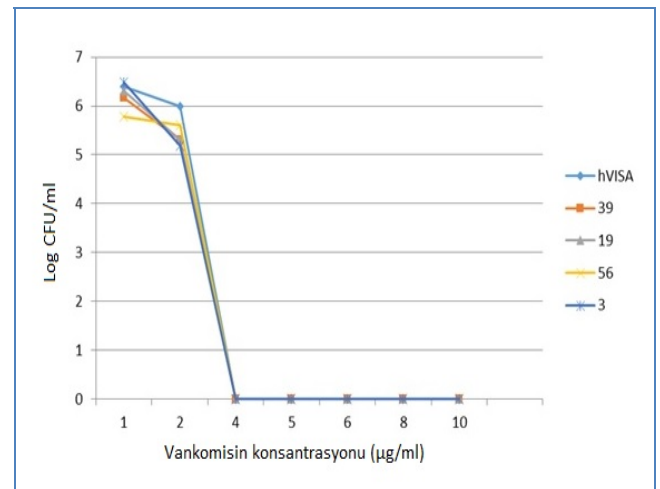
Çalışmaya alınan MRSA suşlarının 22 (%36.66)'si solunum yolu örneği (trakeal aspirat, balgam), 18 (%30)'i yara, 17 (%28.33)'si kan, ikisi (%3.33) kateter, biri (%1.66) plevral sıvı kültüründen izole edilmiştir. Örneklerin; 27 (%45)'si cerrahi yoğun bakım, üçü (%3) yenidoğan yoğun bakım, ikisi (%3.33) kardiyovasküler cerrahi yoğun bakım ünitesi olmak üzere 32'si yoğun bakım, 17 (%28.33)'si servis, 11 (%18.33)'i ise poliklinik hastalarına aitti. Altmış MRSA izolatı vankomisin MİK sonuçlarına göre incelendiğinde, ikisinin MİK değeri 0.125 µg/ml, 12 izolatın 0.25 µg/ml, 44'ünün 0.5 µg/ml ve ikisinin 1 µg/ml olarak

saptanmıştır. Çalışmamızda incelenen izolatların hiç birisinde Vitek otomatize antibiyogram sistemi ile vankomisin dirençli veya orta düzeyde duyarlı MİK değeri tespit edilmemiştir. İzolatlar tarama amaçlı olarak Satola testi ile değerlendirildiğinde 48. saatteki verilere göre 28 (%46.66) izolat hVISA olarak saptanmış (Şekil 1) ve 32 (%53.3) petride ise üreme görülmemiştir. En son aşamada, Satola yönteminde hVISA olarak tespit edilen 28 MRSA suşu, altın standart olan PAP yöntemi ile tekrar çalışılmış ve sadece 12 izolat (%20) hVISA olarak tespit edilmiştir (Tablo 1). Şekil 2 ve Şekil 3'te örnek PAP analiz grafiği ve yöntemde kullanılan petriler gösterilmektedir (Şekil 2 ve 3).

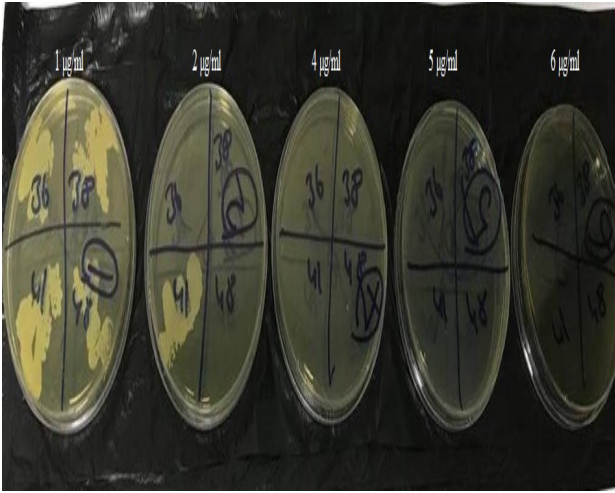


Şekil 1. Satola testinde kullanılan petrilerden bir görüntü

*İnokulumun pipet ile vankomisin ve kazein içeren agar plağının dört kadrana damlatılmasından sonra, en az bir kadranda 2 veya daha fazla koloninin üremesi (şekilde olduğu gibi) hVISA olarak değerlendirilmiştir.



Şekil 2. PAP yöntemi ile hVISA çıkan bazı suşların grafiği (1 no'lu PAP çalışması)



Şekil 3. PAP analizi sırasında ekim yapılan besiyerleri ve üreyen koloniler

*İzolatların, 1, 2, 4, 5, 6 µg/ml vankomisin içeren beyin kalp infüzyon agarda 35°C'de 48 saat enkübasyon sonrası gittikçe azalan miktarda üreme gösteren kolonileri.

Tartışma

Günümüzde MRSA izolatlarına Dünya'nın her yerinde sıkça rastlanılmakta ve oranları ülkelere göre değişiklik göstermektedir. İki binli yılların başında ABD'de yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *S. aureus* izolatları arasında metisilin direnci oranı %60 olarak bildirilmiştir (16). Dünya Sağlık Örgütü Central Asian and European surveillance of antimicrobial resistance 2020 yılı raporunda Türkiye'de MRSA oranlarının oldukça yüksek olduğu belirtilmiştir. Raporda kan ve beyin omurilik sıvısı örneklerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarında MRSA oranı %31 olarak belirtilmiştir (17). Sağlık Bakanlığı Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı (UHESA) özet raporuna göre antimikrobiyal direnç hızlarının persentil dağılımları tablosunda MRSA'nın ağırlıklı genel ortalaması 2021 yılında %48.2 olarak saptanmıştır (18). Hiramatsu ve ark. (19) *S. aureus* izolatlarında vankomisine karşı heterojen direnç mevcudiyetinin, ileride vankomisin maruziyet artışı ile bu ilaca karşı direnç ve tedavi sorunlarına yol açabileceğini bildirmişlerdir. Türkiye'de stafilkoklar için vankomisin direncinin ve duyarlılığının araştırıldığı birçok çalışma yapılmıştır. Gülay ve ark. (20) klinik örneklerden izole edilen 95 MRSA izolatında vankomisin direncini mikrodilüsyon yöntemi ile araştırmışlar ve izolatların beşinde (%5.3) vankomisine azalmış duyarlılık tespit etmişlerdir. Mirza ve ark. (21) 2001-2011 yılları arasında çocuk hastalardan izole edilmiş 94 MRSA izolatını çalışmışlar ve vankomisin değerlerinde yıllara göre herhangi bir artış olmadığını farklı iki yöntem (Mikrodilüsyon ve Gradient test) kullanarak tespit etmişlerdir.

Ayrıca izolatların tamamının da vankomisine duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Aktaş ve ark. (22) 100 stafilkok izolatını agar dilüsyon ile taramışlar ve vankomisine dirençli, bir izolat tespit etmişlerdir. Sünbül ve ark. (23) 102 stafilkok izolatını kullanarak yaptıkları çalışmada vankomisin için MİK değerlerinin 0.25–2 µg/ml aralığında olduğunu bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda ise 60 MRSA izolatının MİK değerlerinin belirlenmesinde altın standart olarak kabul edilen sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılmış, iki MRSA izolatının MİK değeri 0.125 µg/ml, 12 MRSA izolatının MİK değeri 0.25 µg/ml, 44 MRSA izolatının MİK değeri 0.5 µg/ml ve iki MRSA izolatının MİK değeri 1 µg/ml olarak bulunmuştur. İzolatların hiç birisinde vankomisin için dirençli ve orta dirençli düzeyde MİK değeri tespit edilmemiştir. hVISA'nın bildirildiği vaka sayısının az olması ve laboratuvarlarda uygulanan rutin duyarlılık testleri ile tespit edilememesi nedeniyle klinik önemi halen netleştirilememiştir. Ancak MRSA enfeksiyonlarında popülasyonda hVISA'nın bulunması vankomisin etkisinin azalmasına, tedavi süresinin uzamasına hatta tedavide başarısız olunmasına neden olabilir (19). Dolayısıyla hVISA'nın tespit edilmesi önemlidir. hVISA, laboratuvarlarda kullanılan duyarlılık testlerinden biri olan sıvı mikrodilüsyon ile duyarlı bulunmaktadır. CLSI'nin standart duyarlılık testleri için önerdiği inokulasyon yoğunluğu 5×10^5 CFU/ml'dir. Fakat 5×10^5 CFU/ml gibi düşük dansiteli inokulasyonlar ile tespit edilemeyebilir. 2005 yılında Sancak ve ark. (7) 256 MRSA izolatını 4 µg/ml'lik vankomisin ile hazırlanmış BKİ agarı kullanarak çalışmışlar ve 145 (%56) izolatı hVISA olarak tespit etmişlerdir. Korkut ve ark. (15) *mecA* geni tespit edilmiş 52 *S. aureus* izolatını 6 µg/ml vankomisin içeren BKİ agarda taramış, izolatlardan sekizi 24. saatte, biri 48. saatte olmak üzere toplamda dokuz (%17.3) izolatı agar tarama ile hVISA olarak saptamışlardır. Gazel ve ark. (14) 100 MRSA izolatından 43 (%43)'ünü Satola testi ile hVISA olarak saptamışlardır. Feng ve ark. (24) 2013'te yaptıkları çalışmada 456 MRSA izolatı, 6 µg/ml vankomisin içeren BKİ agar kullanarak taramışlar ve 105 (%23) izolatın ürediyini tespit etmişlerdir. Çalışmamızda Satola ve ark. (12) 'nın tarafından geliştirilen yöntem ile 60 MRSA izolatının 28 (%46.66)'i hVISA olarak tespit edilmiştir. Otuziki (%53.33) izolatın bulunduğu petrielerde ise üreme görülmemiştir. Satola yöntemi ile bulduğumuz hVISA oranları, benzer şekilde tarama agar yöntemi kullanan Gazel ve ark. (14) bulduğu oranlara benzerdir. Ancak, Satola ve ark. (12) kullandığı yöntemin, PAP yöntemine alternatif olabilmesi için birden fazla çalışmada

referans yöntemle karşılaştırıldığında duyarlı ve özgül bulunması gerekmektedir. Çalışmamızda, Satola testi ile hVISA olarak tespit edilen 28 izolat, PAP yöntemi ile tekrar değerlendirilmiştir. Satola testinde %46.66 tespit edilen hVISA oranı, altın standart kabul edilen PAP yöntemi ile %20 olarak bulunmuştur. Satola testinin 6 izolatu yalnızca pozitif olarak saptadığı belirlenmiştir. Gülay ve ark. (20) 1998'de Türkiye'deki ilk hVISA izolatu raporlamışlardır. Ardından 2005 yılında Sancak ve ark. (7) MRSA izolatlarında hVISA'yı araştıran ilk çalışmayı yapmışlardır. Bu çalışmada PAP yöntemini kullanarak 256 MRSA izolatu taramışlar ve bu izolatlardan 46 (%18)'sını hVISA olarak tespit etmişlerdir. Kuşçu ve ark. (25) çalışmalarında 148 metisiline dirençli stafilocok kökeni kullanmışlar, hVISA'yı PAP yöntemiyle araştırmışlardır. Yüz yedi MRSA içerisinde bir adet (%0.9) hVISA izolatu tespit etmişlerdir. İlk defa Mirza ve ark. (21) pediyatrik popülasyondan izole edilen MRSA izolatlarını çalışmışlar ve PAP yöntemiyle hVISA'yı %21.3 olarak saptamışlardır. Korkut ve ark. (15) 52 MRSA izolatu içinden PAP yöntemi ile dokuzunu (%17.30) hVISA olarak tespit etmişlerdir. Yunanistan'da Souli ve ark. (26) 175 izolatta PAP yöntemine göre 6 (%3.4) izolatu hVISA olarak bulmuşlardır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda prevalans oranları %0.9 ile %21.3 aralığında farklılık göstermektedir (21, 25). Tüm çalışmalarda farklı sonuçların elde edilmesinin temel sebebi; çalışmalarda kullanılan örneklerin farklı merkezlerden olması veya farklı yöntemler ile değerlendirilmiş olmasından kaynaklı olduğuna bağlanmıştır.

Çalışma kısıtlılıkları: Çalışmanın bir kısıtlılığı ülkemizdeki sadece bir merkezin verilerini yansıtmasıdır. Bir diğer kısıtlılık ise çalışmamızda PAP metodunun yoğun emek gerektiren bir yöntem olması nedeni ile, sadece Satola ve ark.'larının geliştirdiği testte pozitif çıkan örnekler PAP çalışmasına alınabilmiştir. Özgüllük ve duyarlılığın tam olarak hesaplanabilmesi için Satola testinde negatif çıkan örneklerin de PAP ile taranması gerekmektedir

Sonuç

PAP sonuçlarımız ve hVISA prevalansı, ülkemizde daha önce yapılan bazı çalışmaların sonuçları ile yakın bir değerde çıkmıştır. Çalışmamız ile bölgemizde ilk defa olarak hVISA için bir veri kümesi oluşturulmuştur. Satola testi ile hVISA olarak tanımlanan 28 izolattan sadece 12'si PAP metodu ile hVISA olarak doğrulanabilmiştir. Bu bize Satola testinin çok hassas olmadığını ve çok fazla yalnızca pozitifliğin olduğunu göstermiştir. Sonuçlarımıza göre hVISA araştırmasında,

vankomisinli agar bazlı yöntemler yerine direkt olarak popülasyon analizi profili yönteminin tercih edilmesi daha uygun olacaktır. PAP yöntemi birçok araştırmacı tarafından VISA ve hVISA kökenlerinin tanımlanmasında altın standart olarak kabul edilmekle beraber, özel ekipmana ve teknik donanımına ihtiyaç duyulan çok zahmetli bir yöntemdir. Bu yüzden laboratuvarlarda rutin olarak kullanılacak yeni yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Etik onam: Bu çalışma için Gaziantep Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 27.05.2020 tarih ve 220/180 nolu karar ile izin alınmıştır.

Çıkar çatışması: Yazarlar bu çalışma için herhangi bir çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

Finansal destek: Bu çalışma D.G. danışmanlığında yapılmış bir yüksek lisans tez çalışması olup, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi tarafından TF.YLT.21.05 proje no ile desteklenmiştir.

Yazar katkıları: Konsept (NS,DG), Tasarım (NS,DG), Veri Toplama ve/veya İşleme (NS,DG,HD,ABM), Analiz ve/veya Yorumlama (NS,DG,HD,ABM), Gözden geçirme (NS,DG,HD,ABM).

Katkıda bulunanlar: Bu makalenin hazırlanmasında teknik desteklerinden dolayı sayın Prof. Dr. Barış Otlu'ya teşekkürlerimizi sunarız.

Kaynaklar

1. Öksüz L. Gram Pozitif Bakteriler. Sağlık Bilimlerinde Klinik Mikrobiyoloji. Gazel D, Özbek E, Kol Aydoğdu S, (ed). Akademisyen Kitapevi 2021; Bölüm 6 s57-59.
2. Yakupoğulları Y, Gündüz A, Özcan M, Doğukan M, Seyrek A, Yılmaz M. *Staphylococcus aureus* suşlarının siprofloksasin, ofloksasin, levofloksasin ve moksifloksasin duyarlılıkları. *Firat Med J* 2006(11); 1: 45-47.
3. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, Fukuchi Y, Kobayashi I. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet* 1997; 350: 1670-1673.
4. Hiramatsu K, Hanaki H, Ino T, Yabuta K, Oguri T, Tenover FC. Methicilin resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *JAC* 1997; 40: 135-136.
5. European Union Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

- (EUCAST) (2017) The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance Version2.01. Available: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf
6. 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. *CMR* 2010; 23(1): 99-139.
 7. Sancak B, Ercis S, Menemenlioglu D, Colakoglu S, Hasçelik G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin in a Turkish university hospital. *JAC* 2005; 56(3): 519-523
 8. Güneş H. Metisiline dirençli stafilkoklarda glikopeptid antibiyotiklere duyarlılık durumunun araştırılması. Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi, 2008. <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezDetay.jsp?id=eevSgf4oDiitnDIMk5axSg&n=IOqAWqVwwNBsnRu1ezh5lQ>
 9. Hanaki H, Hiramatsu K. Detection methods of glycopeptide resistant *Staphylococcus aureus* I: Susceptibility testing. In: Gillespie SH, ed. Antibiotic resistance methods and protocol Totowa, New Jersey: Humana Press, 2001: p85-92.
 10. 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. *JAC* 2001; 47: 399-403.
 11. Walsh TR, Bolmström A, Qwamström A, Ho P, Wootton M, Howe RA, et al. Evaluation of current methods for detection of staphylococci with reduced susceptibility to glycopeptides. *JCM* 2001; 39 (7): 2439-2444.
 12. Satola SW, Farley MM, Anderson KF, Patel JB. Comparison of detection methods for heteroresistant vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*, with the population analysis profile method as the reference method. *JCM* 2010; 49: 177-183.
 13. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0, 2021. <http://www.eucast.org>
 14. Gazel D, Erinmez M, Büyükaş A, Zer Y. Investigation of heteroresistant vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus* among MRSA isolates. *J Infect Dev Ctries* 2021; 15(1):89-94.
 15. Korkut TE, Kuzucu Ç, Otlı B. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarında vankomisine karşı azalmış duyarlılığın araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg* 2017; 47(1): 39-46.
 16. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System Report, data summary from January through 1992 June 2004, issued October 2004. *AJIC* 2004; 32(8): 470-485.
 17. WHO Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance, Annual Report 2020. Document number: WHO/EURO:2020-3469-43228-60585. [Erişim tarihi: 8 Ekim 2022]. Erişim adresi: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/345873>
 18. Sağlık Bakanlığı Ulusal Hastane Enfeksiyonları Sürveyans Ağı (UHESA) Özet Raporu 2021. [Haziran 2022; Erişim tarihi: 8 Ekim 2022]. Erişim adresi: https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Bulasici-hastaliklar-db/hastaliklar/SHIE/Raporlar/USHIESA_OZET_RAPOR_2021.pdf
 19. Hiramatsu K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. *Lancet Infectious Diseases* 2001; 1: 147-155.
 20. Gülay Z, Atay T, Yuluğ N. *Staphylococcus aureus* suşlarında vankomisin direncinin araştırılması. *ANKEM Derg* 1998; 12 (2):101
 21. Mirza HC, Sancak B, Gur D. The prevalence of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* and Heterogeneous VISA among methicillin-resistant strains isolated from pediatric population in a Turkish university hospital. *MDR* 2015; 21(5): 537-544.
 22. Aktaş Z, Şalcıoğlu M, Akbulut K, Bal Ç, Anğ Ö. Stafilkoklarda fusidik asit, vankomisin ve teikoplanin etkinliğinin agar dilüsyon yöntemi ile karşılaştırılması. 4. 51 Antimikrobik Kemoterapi Günleri Program ve Özet Kitabı (Türk Mikrobiyoloji

- Cemiyeti Yayını No:37) İstanbul 1999; 5: 209.
23. Sünbül M, Erođlu C, Çınar T, Saniç A, Leblebiciođlu H. Stafilocok suşlarının vankomisin ve teikoplanine duyarlılıkları. ANKEM Derg 1998; 12: 77-80.
24. Feng NN. The incidence and risk factors for heterogeneous vancomycin intermediate *Staphylococcus aureus*. Zhonghua Nei Ke Za Zhi 2013; 52:318-322.
25. Kuşçu F, Öztürk D, Gürbüz Y, Tütüncü E, Şencan İ, Gül S. Metisiline dirençli stafilocoklarda azalmış vankomisin duyarlılığının araştırılması. Mikrobiyol Bul 2011; 45(2): 248-257.
26. Souli M, Karaiskos I, Galani L, Maraki S, Perivolioti E, Argyropoulou A, et al. Nationwide surveillance of resistance rates of *Staphylococcus aureus* clinical isolates from Greek hospitals, 2012-2013. Infectious Diseases 2016; 48(4): 287-292.