Özgün Çalışma/Original Article *Mikrobiyol Bul 2022;56(4):593-605*/doi: 10.5578/mb.20229601

Geliş Tarihi (Received): 20.12.2021 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 13.09.2022

Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* İzolatlarında Çeşitli Yöntemlerle VISA ve hVISA Varlığının Araştırılması

Investigation of the VISA and hVISA Presence in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates by Various Methods

Şerife UÇAR(ID), Yücel DUMAN(ID), Elif Seren TANRIVERDİ(ID), Mehmet Sait TEKEREKOĞLU(ID), Barış OTLU(ID)

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya.
İnönü University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Malatya, Türkiye.

**Bu çalışma, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: TTU-2020-2304). Bu çalışma, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında tıpta uzmanlık tezi olarak hazırlanmıştır.*

Makale Atıfı: *Uçar Ş, Duman Y, Tanrıverdi ES, Tekerekoğlu MS, Otlu B. Metisiline dirençli Staphylococcus aureus izolatlarında çeşitli yöntemlerle VISA ve hVISA varlığının araştırılması. Mikrobiyol Bul 2022;56(4):593-605.*

ÖZ

Staphylococcus aureus toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlara yol açan önemli bir insan patojenidir. Metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) enfeksiyonlarının tedavisinde vankomisinin yeri tartışılmazdır. Ancak, vankomisin kullanımı esnasında tedavide başarısızlıklara neden olan vankomisine orta duyarlı *S.aureus* (VISA) ve heterojen VISA (hVISA) izolatları rutin laboratuvar yöntemleriyle tespit edilememektedir. Bu izolatların tespitinde altın standart yöntem popülasyon profili analizi-eğri altında kalan alan (PAP-AUC) yöntemidir. Çalışmada, MRSA izolatlarında metisilin direncine neden olan *mec*A ve *mec*C gen bölgelerini, izolatlar arasındaki klonal ilişkiyi, VISA ve hVISA varlığını belirlemek amaçlanmıştır. Çalışmaya, 2015-2020 yılları arasında hastanenin mikrobiyoloji laboratuvarında izole edilen 68 MRSA dahil edilmiştir. İzolatların tanımlanması matriks aracılı lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş süresi kütle spektrometrisi [matrix assisted laser desorptionization-time of flight mass spectrophotometry (MALDI-TOF MS) (VITEK MS, BioMérieux, Fransa)] ile yapılmıştır. İzolatlarda, metisilin direnci sefoksitin (30 µg, Bioanalyse, Türkiye) diski kullanılarak disk difüzyon, vankomisin minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri sıvı mikrodilüsyon (SMD) yöntemiyle, polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] yöntemi ile *mec*A ve *mec*C gen bölgesi varlığı araştırılmıştır. VISA ve hVISA varlığı modifiye agar tarama, makro gradiyent difüzyon testi tarama yöntemleri ve PAP-AUC doğrulama yöntemiyle, izolatlar arasındaki klonal ilişki pulsed field jel elektroforezi [pulsed field gel elecrophoresis (PFGE)] yöntemi ile araştırılmıştır. Tüm izolatlarda *mec*A gen bölgesi belirlenmiş, ancak hiçbir izolatta *mec*C gen bölgesine rastlanmamıştır. SMD yöntemi ile izolatların $MİK_{50}$ değeri 1 µg/mL, $MİK_{90}$ değeri ise 2 µg/mL olarak belirlenmiştir. Modifiye agar tarama yöntemiyle altı VISA, dört hVISA şüpheli izolat tespit edilmiştir. Altın standart olan PAP-AUC yöntemi ile, modifiye agar tarama yöntemiyle şüpheli belirlenen bir izolat VISA, bir izolat hVISA olarak değerlendirilmiştir. PFGE ile baskın bir salgın suşu tespit edilmemiştir. Sonuç olarak, hastanede VISA ve hVISA varlığı belirlenmiştir. Bu izolatların artması ciddi bir endişe kaynağıdır. Bu nedenle belirli dönemlerde MRSA izolatlarında VISA/hVISA oranlarının araştırılması, toplumda ve hastane ortamında bu izolatların yayılımını önleyecek

İletişim (Correspondence): *Doç. Dr. Yücel Duman, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya, Türkiye.* ***Tel (Phone):*** *+90 (422) 341 06 60-48 03,* ***E-posta (E-mail):*** *yucel.duman@inonu.edu.tr*

tedbirlerin ve uygulamaların hayata geçirilmesi için gerekli enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınmasının faydalı olacağı kanısına varılmıştır.

Anahtar kelimeler: *MRSA; mecC; hVISA; VISA; PAP-AUC.*

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is an important human pathogen that causes community and hospital-acquired infections. The role of vancomycin in the treatment of methicillin-resistant *S.aureus* infections is indisputable. However, vancomycin intermediate susceptible *S.aureus* (VISA) and heterogeneously VISA (hVISA) isolates, that cause treatment failures during the use of vancomycin, cannot be detected by routine laboratory methods. The gold standard method for the detection of these isolates is the population profile analysis-area under the curve (PAP-AUC) method. In this study, it was aimed to determine the presence of *mec*A and *mec*C gene regions that cause methicillin resistance, the clonal relationship between isolates, and the presence of VISA and hVISA. A total 68 methicillin-resistant *S.aureus* (MRSA) strains were included in this study which were isolated in the microbiology laboratory of the hospital between 2015-2020. Identification of the isolates were determined by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrophotometry (VITEK MS, BioMérieux, France). Methicillin resistance was investigated by disk diffusion method using cefoxitin (30 µg, Bioanalyse, Türkiye) disk and vancomycin MIC values were determined by broth microdilution method. *mec*A and *mec*C gene regions were investigated by polymerase chain reaction (PCR) method. The presence of VISA and hVISA were investigated by modified agar screening, macro gradient diffusion test and confirmated by PAP-AUC methods, and the clonal relationship between isolates were investigated by pulsed field gel electrophoresis method. The *mec*A gene region was determined in all isolates, but the *mec*C gene region was not found in any of the isolates. The MIC_{50} value of the isolates was determined as 1 µg/mL and the MIC_{90} value was determined as 2 µg/mL by broth microdilution method. Six VISA and four hVISA suspected strains were detected by a modified agar screening method. Among the isolates identified as suspicious by the modified agar screening method, one isolate was evaluated as VISA and one isolate was evaluated as hVISA by the gold standard PAP-AUC method. No dominant epidemic isolate has been identified by PFGE. As a result, VISA and hVISA were determined in the hospital. The increase in these isolates is a serious concern. For this reason, it is believed that it would be beneficial to investigate the VISA/hVISA ratios in MRSA isolates at certain periods, and to take necessary infection control measures to implement measures and practices to prevent the spread of these isolates in the community and hospital environment.

Keywords: *MRSA; mecC; hVISA; VISA; PAP-AUC.*

GİRİŞ

Staphylococcus aureus, toplum kaynaklı (TK) ve sağlık bakım ilişkili (SBİ) enfeksiyonlara neden olan önemli bir insan patojenidir. Antimikrobiyallere karşı geliştirdiği direnç nedeniyle tedavide önemli sorunlara yol açabilir[1,2]. *S.aureus*'un neden olduğu ciddi enfeksiyonlarda uygun antimikrobiyal tedaviyle rağmen mortalite oranları yüksektir. Metisiline dirençli *S.aureus* izolatlarının (MRSA) neden olduğu enfeksiyonlar, metisiline duyarlı *S.aureus*'ların (MSSA) neden olduğundan daha yüksek ölüm oranlarına, hastanede yatış sürelerinin uzamasına ve sağlık bakım maliyetlerinin artmasına yol açmaktadır. MRSA, SBİ *S.aureus* enfeksiyonlarının en az %25-50'sinden sorumludur[3].

MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde en uygun seçenek, dar spektrumlu bakterisidal bir antibiyotik olan vankomisindir[4]. İlk vankomisine dirençli *S.aureus* (VRSA) 2002 yılında enterokoklardan *van*A geninin plazmit aracılı aktarımının neden olduğu bir izolatta bildirilmiştir[5]. 1997'de ise Japonya'da *van*A geni içermeyen vankomisine azalmış duyarlılığa sahip, vankomisine orta duyarlı *S.aureus* (VISA) olarak tanımlanan izolatlar gösterilmiştir[6]. Hiramatsu ve arkadaşları[6,7] yapmış olduğu çalışmalarda enfeksiyon etkeni olarak *S.aureus*

izole edilen ve vankomisin tedavisi alan bir hastada tedavi yanıtsızlığı olduğu, bu izolatın *van*A geni taşımadığı ve elektron mikroskobunda bakıldığında hücre duvar kalınlığının kontrol suşuna göre iki kat daha fazla olduğunu belirledikleri bu izolat heterojen VISA (hVISA) olarak isimlendirilmiştir. Son yıllarda vankomisin tedavisi altındaki hastalardan izole edilen MRSA'larda VISA ve hVISA bildirimleri artmaktadır. VRSA'daki direnç ekzojen olmasına rağmen hVISA ve VISA'daki direncin endojen olduğu düşünülmektedir[3].

Yapılan çalışmalarda hVISA enfeksiyonlarının kalıcı bakteriyemi, tedavi başarısızlığı veya tedaviye zayıf bir yanıtla ilişkili olduğu bildirilmektedir[8]. In vitro testlerde vankomisin duyarlı olan ve vankomisin tedavisi alan hastalarda tedavi yanıtının olmaması durumunda hVISA akla getirilmelidir. Özellikle dolaşım sistemi enfeksiyonlarında hVISA bulunmasının mortaliteyi artırabileceği bildirilmektedir. MRSA ile enfekte hastalarda VISA ve hVISA varlığını belirlemek, hasta yönetiminde gerek hastanede yatış süresi gerek tedaviye cevap açısından kritik öneme sahiptir. Ancak bu izolatlar rutin laboratuvar yöntemleri ile tespit edilememektedir[8].

Çalışmada, hastanede beş yıllık dönemde izole edilen TK ve SBİ MRSA izolatlarında metisilin direncine neden olan *mec*A ve *mec*C gen bölgelerini, izolatlar arasındaki klonal ilişkiyi, VISA ve hVISA varlığını belirlemek amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar ve Yayın Etiği Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 03.03.2020 ve Karar No: 2020/512).

Bakteriyel İzolatlar ve Tanımlama

Çalışmaya, 2015-2020 yılları arasında hastanenin tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarı stok kültürlerinden elde edilen 55 SBİ, 13 TK toplam 68 MRSA izolatı dahil edildi. İzolatların TK veya SBİ olduğu, Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol Merkezi [Centers for Diseases Control and Prevention (CDC)] kriterleri doğrultusunda belirlendi[3,9]. Aynı hastaya ait tek bir izolat çalışmaya dahil edildi.

Skim milk (Oxoid, İngiltere) besiyerinde -80°C'de stoklanmış olan *S.aureus* izolatları; %5 koyun kanlı agara ekilerek 35°C'de 18-24 saat inkübasyon sonrasında yeniden saf kültürleri elde edildi. Elde edilen kolonilerin tanımlanması, Gram boyama, katalaz, koagülaz testi sonrasında VITEK MS (BioMérieux, Fransa) ile yapıldı.

Metisilin Direncinin Araştırılması

Metisilin direnci fenotipik olarak Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi [European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)] önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile sefoksitin (30 µg, Bioanalyse, Türkiye) diskleri kullanılarak belirlendi[10]. Fenotipik yöntemle MRSA olarak belirlenen izolatlarda, polimeraz zincir reaksiyonu [polymerase chain reaction (PCR)] ile *mec*C ve *mec*A gen bölgesi araştırıldı. Bu amaçla izolatlarından DNA izolasyonu Qiasymphony otomatize DNA ekstraksiyon cihazında (Qiagen, Almanya) QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Alman-

ya) kitleri kullanılarak yapıldı. PCR ile *mec*A gen bölgesinin belirlenmesinde; F= 5′-GGG ATC ATA GCG TCA TTA TTC-3′ ve R= 5′-AAC GAT TGT GAC ACG ATA GCC-3′ *mec*C gen bölgesinin belirlenmesinde; F= 5′-GAA AAA AAG GCT TAG AAC GCC TC-3′ ve R= 5′-GAA GAT CTT TTC CGT TTT CAG C-3′ primerleri kullanıldı[11]. *mec*C geni için pozitif kontrol olarak NCTC 13552 standart suşu kullanıldı. *mec*A ve *mec*C gen bölgelerini görüntülemek için PCR sonrası elde edilen ürünler agaroz jelde (Vivantis, Malezya) yürütüldü. Elektroforezde oluşan bantların fotoğrafları (Gel logic 2200 imaging system, 1708 X 1280 pixel, Kodak Company, NY, ABD) çekilerek değerlendirildi.

Vankomisin Direncinin Araştırılması, hVISA ve VISA Belirlenmesi

Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemiyle Vankomisin Minimal İnhibitör Konsantrasyon Değerinin Belirlenmesi

Sıvı mikrodilüsyon (SMD); EUCAST önerileri doğrultusunda 96 kuyucuklu paneller kullanılarak gerçekleştirildi. SMD minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) test aralığı 32 µg/mL-0.06 µg/mL olarak belirlendi. Vankomisin (Koçak farma, Türkiye) MİK değeri 2 µg/mL ve altında bulunan izolatlar duyarlı olarak kabul edildi[10]. Kontrol olarak ATCC 29213 *S.aureus* standart suşu kullanıldı.

Modifiye Vankomisin Agar Tarama

Agar tarama yöntemi VRSA/VISA şüpheli izolatların tespiti için CDC önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi[12]. Koyun kanlı agarda 18 ± 2 saatlik inkübasyon sonunda üreyen kolonilerden, 0.5 McFarland bulanıklığına eş değer hazırlanan bakteri süspansiyonundan 10 µl alınarak 6 µg/mL vankomisin içeren beyin kalp infüzyon (BKI) (Oxoid, İngiltere) agar plaklarına ekildi. Ancak, 6 µg/mL vankomisin içeren BKI agarda VRSA ve VISA şüpheli izolat belirlenemediğinden yöntem modifiye edilerek 2 µg/mL vankomisin içeren BKI agar tarama amacı ile kullanıldı. İnkübasyon sonrası 24. saat sonunda üreme görülen plaklardaki izolatlar potansiyel VISA, 48. saat sonunda üreme görülen plaklardaki izolatlar olası hVISA ve 48 saat sonunda üreme görülmeyen izolatlar vankomisine duyarlı olarak değerlendirildi[13].

Makro Gradiyent Difüzyon Test Yöntemiyle hVISA Varlığı Taranması

MRSA izolatlarında VISA/hVISA varlığı Wootton ve arkadaşlarının[14] uyguladığı tarama testi olan makro gradiyent difüzyon test (MGT) yöntemi ile araştırıldı. Bu amaçla, 2.0 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonundan 100 µl BKI agar yüzeyine yayılıp, vankomisin ve teikoplanin şeritleri (Bioanalyse, Türkiye) yerleştirilerek inkübe edildi. Vankomisin ve teikoplanin için 48 saat sonunda MİK≥ 8 µg/mL tespit edilen veya teikoplanin MİK≥ 12 µg/mL izolatlar VISA/hVISA şüpheli olarak değerlendirildi.

hVISA, VISA Varlığının Popülasyon Profili Analizi-Eğri Altında Kalan Alan Yöntemiyle Araştırılması

VISA/hVISA belirlenmesinde doğrulama testi olarak Wootton ve arkadaşlarının[15] tarif ettiği yöntemle PAP-AUC yapıldı. PAP-AUC yöntemi modifiye agar tarama ile şüpheli

bulunan izolatlara uygulandı. 0.5 MacFarland bulanıklığında MRSA izolatlarından süspansiyon hazırlandı. Bu süspansiyondan 10 kat seri dilüsyonlar yapılarak, VISA ve hVISA şüpheli olan her izolat için 10^3, 10^6 kob/mL konsantrasyonlarda bakteri süspansiyonları elde edildi. Hazırlanan süspansiyonlardan 100 µl alınarak 0.25, 0.5, 1, 2, 4 ve 8 µg/mL vankomisin içeren BKI agara ekildi. Kırk sekiz saatlik inkübasyonun sonunda her plakta oluşan koloni sayıları belirlendi. Her bir MRSA izolatı için vankomisin konsantrasyonuna karşı gelen mililitredeki koloni sayısının logaritması alınarak grafikler çizildi. Bu grafikle her suş için elde edilen eğri altında kalan alan yamuk kuralı (trapezoid rule) kullanılarak hesaplandı. Daha sonra her bir suşun eğri altında kalan alan (AUC) değeri, Mu3 kontrol suşu için hesaplanan AUC değerine oranlandı. Bu oran ≤ 0.90 ise vankomisine duyarlı stafilokok, 0.90-1.3 ise hVISA, ≥ 1.3 ise VISA olarak kabul edildi[15]. Çalışmada, hVISA pozitif kontrol suşu Mu3 (ATCC 700698), VISA kontrol suşu Mu50 (ATCC 70699) ve ATCC 29213 *S.aureus* standart suşları kullanıldı.

PFGE Analizi ile Klonal İlişkinin Araştırılması

*mec*A pozitif bulunan 68 izolat arasında epidemiyolojik açıdan, klonal ilişkinin değerlendirilmesi amacıyla Durmaz ve arkadaşları[16] tarafından modifiye edilen PFGE protokolü uygulandı. Elektroforez tamamlandıktan sonra Gel logic 2200 imaging system kullanılarak bantlar görüntülendi. GelCompar II yazılım sistemi (version 3.0, Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belçika) kullanılarak bant profilleri analiz edildi. Her resimde bulunan kontrol kalıpları kullanılarak resimler arası normalizasyon yapıldı. Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA) kullanılarak dendrogram oluşturulup kümeleşme analizleri yapıldı. Dice benzerlik katsayısına göre suşlar arasındaki ilişki belirlendi. Bant ve profil toleransı %1-1.5 arasında tutuldu.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 68 izolatın 24 (%35.3)'ü kan, 30 (%44.1)'u yara, 11 (%16.2)'i solunum yolu [balgam (n= 4), trakeal aspirat (n= 7), idrar (n= 1), eklem sıvısı (n= 1) ve beyin omurilik sıvısı (n= 1)] kültür örneklerinden elde edilmiştir. İzolatların 25 (%36.8)'i kadın, 43 (%63.2)'ü erkek hastalara ait bulunmuştur. Metisilin direncini belirlemede kullanılan disk difüzyon yöntemi ile izolatların tamamı sefoksitin ve oksasilin dirençli olarak belirlenmiştir. PCR yöntemi ile ise izolatların tamamında *mec*A gen bölgesi belirlenirken, *mec*C gen bölgesi saptanmamıştır.

SMD yöntemi ile çalışmaya alınan 68 izolatın vankomisin $MİK_{50}$ değeri 1 µg/mL, $MİK_{90}$ değeri ise 2 µg/mL olarak belirlenmiştir. SMD yöntemiyle bir izolat VISA olarak saptanmıştır.

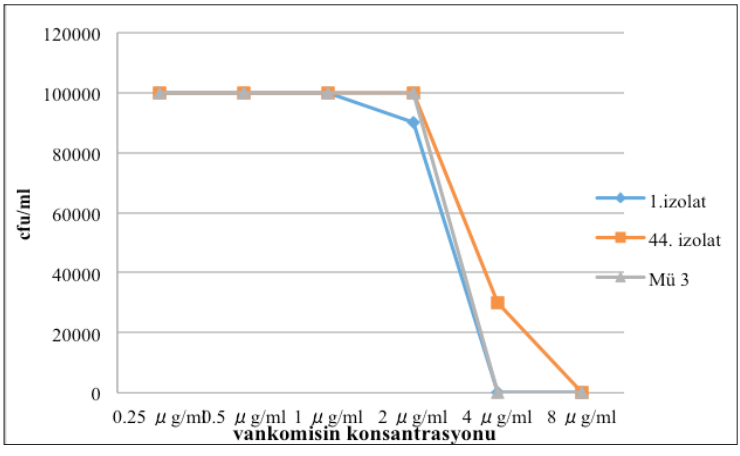
Makro gradiyent difüzyon yöntemi ile 48 saat sonunda vankomisin ve teikoplanin için MİK≥ 8 µg/mL veya teikoplanin MİK≥ 12 µg/mL olan izolat tespit edilmesi nedeniyle bu yöntemle VISA/hVISA şüpheli izolat belirlenmemiştir. Modifiye agar tarama yöntemi ile VISA (n= 6), hVISA (n= 4) toplam 10 şüpheli izolat saptanmıştır. İzolatların birinin TK, dokuzunun SBİ olduğu belirlenmiştir. VISA/hVISA şüpheli suşların SMD ve MGT vankomisin MİK değerleri, PAP-AUC analiz değerleri Tablo I'de gösterilmiştir. Altın standart PAP-AUC

Tablo I. *VISA/hVISA Şüpheli Suşların Vankomisin SMD MİK, MGT Vankomisin, Teikoplanin ve PAP-AUC Değerleri*

İzolat no	SMD µg/mL	MGT µg/mL		PAP-AUC
	Vankomisin	Vankomisin	Teikoplanin	
1*	1	1.5	1.5	0.99 (hVISA)
24*	0.5	1	1.5	0.181
31*	0.5	1	1	0.199
34**	1	1	1.5	0.426
42**	0.5	0.75	1	0.451
44**	4	4	6	1.977 (VISA)
53*	0.5	1	2	0.29
56**	0.5	1	1.5	0.45
61**	1	1.5	2	0.45
63**	1	1	1.5	0.58

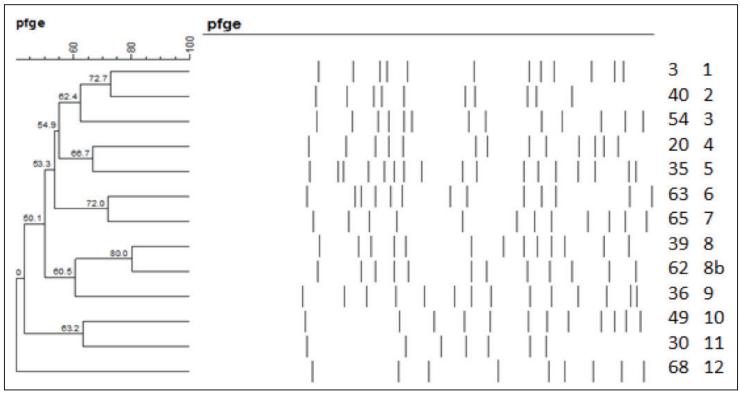
*hVISA şüpheli izolat, **VISA şüpheli izolat.

analizi ile bir (%1.5) izolat hVISA, bir (%1.5) izolat VISA olarak saptanmıştır. VISA ve hVISA belirlenen iki izolat yara örneklerinden izole edilmiştir. Bu izolatların izole edildiği hastaların vankomisin ve teikoplanin tedavisi altında olmadığı belirlenmiştir. Uygulanan PAP-AUC yöntemiyle eğri altında kalan alanlar, yamuk kuralı kullanılarak hesaplanmıştır. Buna göre 1 no'lu klinik izolatın eğri altında kalan alanın Mu3 izolatının eğri altında kalan alanına oranı 0.99 olarak belirlendiğinden hVISA olarak değerlendirilmiştir. 44 no'lu klinik izolatın eğri altında kalan alanının Mu3 suşunun eğri altında kalan alanına oranı ise 1.97 olarak belirlendiğinden izolat VISA olarak değerlendirilmiştir. 1 ve 44 no'lu klinik izolatlar ile Mu3 standart suşuna ait izolatına ait grafikler Şekil 1'de gösterilmiştir.

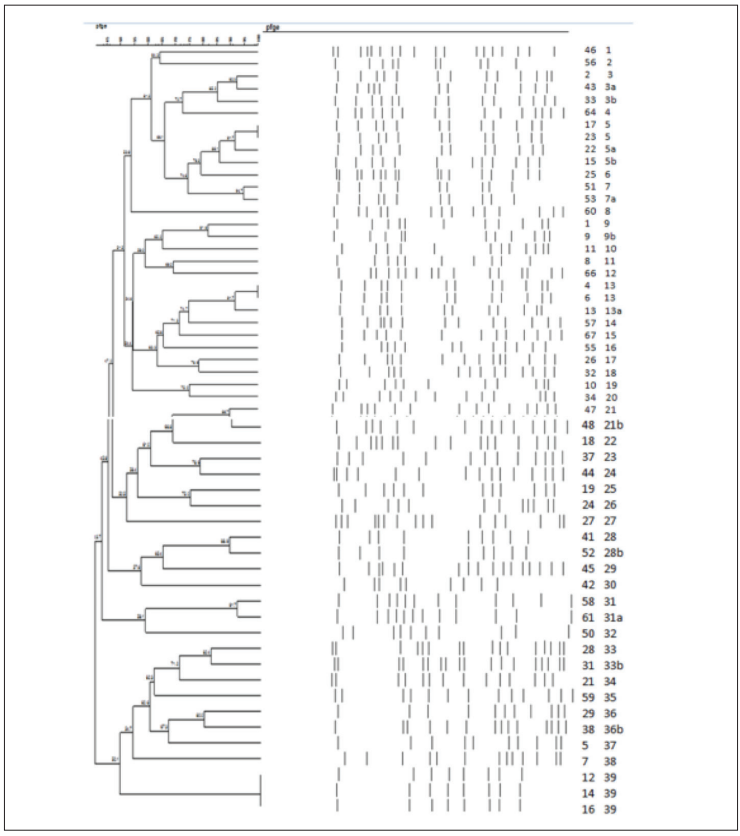


Şekil 1. *1 ve 44 no'lu klinik izolatlar ile Mu3 standart suşuna ait PAP-AUC grafiği.*

Toplum kaynaklı MRSA izolatlarının PFGE analizleri Şekil 2'de, SBİ izolatlarının ise Şekil 3'te gösterilmiştir. TK-MRSA izolatlarında 12, SBİ izolatlarda 39 farklı genotip tespit edilmiştir. Her iki grupta da baskın bir salgın izolatı belirlenmemiştir.



Şekil 2. *Toplum kaynaklı izolatların PFGE analizi.*



Şekil 3. *Sağlık bakım ilişkili izolatların PFGE analizi.*

TARTIŞMA

Metisilin direnci, *S.aureus*'a bağlı enfeksiyonların tedavisinde önemli zorluklara, morbidite ve mortalitenin artmasına neden olmaktadır[1,3]. MRSA, CDC tarafından halk sağlığı açısından acil mücadele edilmesi gereken önemli bir tehdit olarak kabul edilmektedir[3,9]. Ülkemizde yapılan çalışmalarda MRSA oranını Tanrıverdi ve arkadaşları[17] %23.3, Özel ve arkadaşları[18] %17.9, Nazik ve arkadaşları[19] ise yoğun bakımlarda kan kültürlerinde %75.7 olarak bildirmişlerdir. Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance (CAESAR) çalışması[20] verilerine göre *S.aureus* ülkemizde SBİ invaziv örneklerden en sık izole edilen mikroorganizmalar arasında üçüncü sırada yer almakta ve SBİ enfeksiyonlarda MRSA oranı %31 olarak bildirilmektedir. Duman ve arkadaşları[2] yapmış olduğu çalışmada TK-*S.aureus* enfeksiyonlarının %12'sini, SBİ enfeksiyonların ise %42'sini MRSA olarak saptamışlardır. Çalışmada, 68 MRSA izolatının 13 (%19.1)'ü TK, 55 (%80.8)'i SBİ olarak belirlenmiştir. Tüm izolatlara PFGE uygulanmış olup salgın izolatı tespit edilememiştir. Bu bize MRSA izolatlarına bağlı enfeksiyonların toplumda azımsanmayacak düzeyde bulunduğunu göstermektedir. MRSA ile olan savaşı lehimize çevirebilmek için MRSA suşlarının virülansını tanımlayan faktörleri iyi bilmek oldukça önemlidir[3].

S.aureus'ta metisilin direnci *Staphylococcal cassette* chromosome *mec* (*SCCmec*) içinde yer alan *mec*A genine bağlıdır[3]. Ancak, *mec*A gen bölgesi içermeyen, *mec*A ile %69 oranında benzerlik gösteren *mec*C olarak adlandırılan gen bölgesi bulunan izolatlarda da metisilin direnci bildirilmektedir[21]. *mec*A tarafından kodlanan penisilin bağlayan protein 2a (PBP2a) ve *mec*C tarafından kodlanan PBP2c biyokimyasal açıdan farklılık gösterseler de laboratuvar taramalarında MRSA olarak tanımlanmaktadırlar. Kim ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada[22] *mec*C tarafından kodlanan PBP2c'nin, oksasiline sefoksitinden daha yüksek afinite gösterdiği, *mec*A tarafından kodlanan PBP2a'nın ise oksasiline kıyasla sefoksitine karşı daha yüksek direnç gösterdiği belirlenmiştir. Çetinkol ve arkadaşlarının 256 izolat ile yapmış oldukları bir çalışmada[23] oksasilin disk difüzyon testi ile metisiline dirençli 183 izolat, sefoksitin disk difüzyon testi ile ise 181 izolat dirençli saptanmıştır. Bu çalışmada, metisilin direnci sefoksitin ve oksasilin disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir. İzolatların tamamı sefoksitin ve oksasilin dirençli saptanmıştır. Çalışmada, tüm izolatların sefoksitin ve oksasilin dirençli belirlenmesine ve izolatlarda *mec*C gen bölgesi saptanmasına rağmen, bu gen bölgesinin laboratuvarlarda ön tespiti için sefoksitin ve oksasilinin birlikte kullanımının ön değerlendirme yapmada daha yüksek doğruluk oranı sağlayacağı kanısına varıldı. Çıkman ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada[11] 494 MRSA izolatında *mec*C geni varlığına bakılmış ancak hiç *mec*C genine rastlanmamış, 315 izolatta ise *mec*A geni gösterilmiştir. Almanya'da yapılan bir başka çalışmada, farklı yıllarda toplanan 3207 MRSA izolatında *mec*C geni araştırılmış ancak bu çalışmada da *mec*C içeren izolata rastlanmamıştır[24]. Becker ve arkadaşları[25] rutin MRSA taraması sırasında metisiline dirençli ancak *mec*A ve *mec*C geni içermeyen bir izolata rastlamış ve plazmit aracılığıyla taşınan *mec*B geni varlığını göstermiştir. Yapılan bu çalışmada, metisilin dirençli belirlenen 68 izolatın tamamında PCR ile *mec*A gen bölgesi varlığı gösterilmiştir. Tüm izolatlarda *mec*A geninin bulunması metisilin direncinde ana rolün *mec*A geninde olduğunu doğru-

lamaktadır. Ancak, çalışmada, diğer çalışmalara benzer şekilde *mec*C gen bölgesi içeren izolat belirlenmemiştir. *mec*C geni içeren izolatların halk sağlığı açısından büyük problem oluşturabileceğine dair ciddi endişeler bulunsa da insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda *mec*C gen bölgesi varlığının çok yüksek düzeylerde olmadığı görülmektedir.

Heterojen VISA vankomisine duyarlı bir *S.aureus* popülasyonunun içinde vankomisin MİK değeri> 2 µg/mL olan az sayıda (~ 1/10-6) alt grup bulunması olarak tanımlanmaktadır[6,7,26]. VISA/hVISA oluşum mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte, VRSA oluşumundan farklıdır. Yapılan çalışmalarda, hVISA/VISA ile hücre duvar kalınlaşması, otolizde azalma ve yüksek anyonik yüklerin azalması ilişkilendirilmiştir[26]. Yapılan bazı çalışmalarda vankomisin MİK değeri> 1.5 µg/mL olan hastaların vankomisin tedavisine yanıtının kötü olduğu ve MİK değeri bu değerin üstünde olan izolatlarda tedavi başarısızlığı riskinin yüksek olduğu bildirilmiştir[6]. Musta ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada[27] vankomisin MİK değeri≤ 1 µg/mL olan izolatların hiçbirisinde hVISA tespit edememiş ancak MİK değerlerindeki artışla birlikte hVISA saptama oranlarında artış saptanmıştır. Iyer ve arkadaşları MRSA izolatları (n= 50) ile yaptıkları çalışmada[28] bir izolatta hVISA varlığını göstermiş, Liu ve arkadaşları[29] 7920 *S.aureus* izolatında hVISA oranının %1.67 olduğunu bildirmiştir. Ülkemizde yapılan çalışmalara bakıldığında hVISA %0.9-21.3, VISA %0-2 arasında değişen oranlarda saptanmıştır[13,30-38]. Çalışmada, tüm izolatlara modifiye agar tarama yöntemi ve MGT tarama yöntemi uygulanmıştır. Modifiye agar tarama yöntemi ile VISA (n= 6), hVISA (n= 4) şüpheli izolat belirlenmiştir. MGT tarama yöntemi ile ise VISA ve hVISA şüpheli izolat saptanmamıştır. Modifiye agar tarama yöntemi ile belirlenen şüpheli izolatlara uygulanan PAP-AUC analizi sonucunda bir (%1.5) izolat VISA, bir (%1.5) izolat ise hVISA olarak değerlendirilmiştir. Ülkemizde yapılan çalışmalar irdelendiğinde elde edilen oranların önemli farklılıklar gösterdiği görülmektedir. Bunun sebepleri araştırıldığında bazı çalışmalarda her izolata PAP-AUC yöntemi uygulandığı[32,34,37], bazı çalışmalarda ise tarama testleri sonrası pozitif bulunan izolatlara PAP-AUC yöntemi uygulandığı[13,30,33,36], bazılarında ise PAP-AUC yönteminin uygulanmadığı[31,35,38] görülmüştür. MGT yönteminin uygulandığı bazı çalışmalarda ise agar tarama sonrasında pozitif bulunan izolatlara bu yöntemin uygulandığı[13,30,31] görülürken, agar tarama yönteminin kullanıldığı çalışmalarda yöntemsel farklılıklar olduğu ve bazı çalışmalarda BKI-V6[13,30,33] veya BKI-V4[31,35,36,38] kullanıldığı göze çarpmaktadır. Çalışmaya dahil edilen bakterilerin izole edildiği klinik örneklerin kan[37] ya da tüm klinik örnekler[31,33,35,37] olmak üzere farklılık göstermesi, çalışmaya dahil edilen hastaların erişkin[13,30-33] ya da çocuk[34] hastaların olmasının VISA ve hVISA oranlarının farklı belirlenmesinde önemli nedenler olduğu düşünülmüştür. Ayrıca, uygulanan yöntemlerin deneyimli personel gerektirmesi, kimyasal ve antimikrobiyallerin potens kayıpları ve marka farklılıkları oranları farklı belirlemede etkisi olabilir. Çalışmada agar tarama yönteminin modifiye edilmesi VISA ve hVISA belirleme olasılığını artırmıştır. Çalışmada tüm izolatlara PAP-AUC analiz yönteminin uygulanmamasının ve yalnız şüpheli 10 izolata uygulanması VISA ve hVISA oranlarının düşük saptanmasının önemli bir nedeni olabileceği kanısına varılmıştır.

Glikopeptit direncini belirlemede PAP-AUC altın standart yöntem olmasına rağmen, maliyet etkinliği tartışmalıdır. Bu amaçla, daha az maliyetli ve daha az zahmetli çeşitli yöntemler denenmektedir. Vankomisin gradiyent test şeritlerinin kullanılması bunlardan biridir. Uygulanması kolay olan bu yöntem ile PAP-AUC yöntemi karşılaştırılmış ancak performansının istenen düzeyde olmadığı anlaşılmıştır[8,26,29]. Çalışmada SMD yöntemi ile izolatların $MİK_{50}$ değeri 1 µg/mL, $MİK_{90}$ değeri ise 2 µg/mL olarak belirlendi. SMD ve PAP-AUC yöntemleriyle bir izolat VISA olarak belirlenmiştir.

VISA/hVISA araştırmasında kullanılan agar tarama ve MGT yöntemlerinin duyarlılıkları ve özgüllükleri çalışmadan çalışmaya farklılık göstermektedir. Çapin ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada[32], bütün izolatlara uygulanan MGT tarama yöntemi ile %4.7 oranında şüpheli izolata rastlanmış ancak hiçbiri PAP-AUC yöntemi ile doğrulanamamıştır. Chaudhari ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada[39] tarama amaçlı kullanılan yöntemleri karşılaştırmışlar, BKI-V6, MGT ve standart gradiyent (MİK> 2 µg/mL olan izolatların taranması) yöntemlerin PAP-AUC yöntemine göre duyarlılıklarının sırasıyla %75, %67 ve %100; pozitif öngörü değerlerinin ise %43, %40 ve %27 olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada bu amaçla tüm izolatlara MGT yöntemi ile tarama yapılmış ancak VISA/hVISA açısından şüpheli izolat tespit edilmemiştir. Her ne kadar PAP-AUC yöntemi zaman alıcı ve pahalı olması, deneyimli personel gerekliliği gibi dezavantajlara sahip olsa da altın standart yöntem olması itibariyle epidemiyolojik araştırmalarda kullanılmasının önemli olduğu kanısına varılmıştır. Daha kolay ve uygulanabilir yöntemler geliştirilmesine ihtiyaç vardır. VITEK MS gibi kütle spektrometresi kullanılarak yapılan bir çalışmada, VISA, hVISA ve MSSA izolatları bu yöntemle belirlenmeye çalışılmış olup, VISA izolatları %100'e yakın bir oranla, hVISA izolatları %76 oranla doğru olarak belirlenmiştir. hVISA belirleme oranının düşük olmasının nedeni, popülasyondaki hVISA oranının ~$1/10^{-5}$-10^{-6} olmasından kaynaklı diğer izolatların pik oluşturmadaki baskınlığının bu izolatları gizlemesi olarak düşünülmüştür. Bu sistemin avantajı ise hasta başına maliyetin oldukça düşük olması, harcanan emek ve zamanın az olmasıdır[40]. Bu tip yöntemlerin geliştirilmesinin laboratuvarlara ciddi katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol Merkezi içinde 6 µg/mL vankomisin bulunan BKI agar ile VRSA ve VISA taraması yapılmasını önermektedir[12,35]. Ancak, çalışmada 6 µg/mL vankomisin içeren BKI agarda VISA ve VRSA şüpheli izolat tespit edilememesi nedeniyle yöntem modifiye edilerek 2 µg/mL vankomisin içeren BKI agar tarama amacıyla kullanılmıştır. Çalışmada agar tarama yönteminin modifikasyonu ile VISA, hVISA şüpheli 10 izolat saptanmıştır. Agar tarama yönteminin modifikasyonunun şüpheli izolatları belirlemede etkisini değerlendirebilmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu kanısına varılmıştır. PAP-AUC yöntemi ile VISA, hVISA şüpheli izolatlardan biri hVISA, biri de VISA olarak belirlenmiştir. hVISA olan izolatın MİK değeri 1 µg/mL, VISA olanın MİK değeri ise 4 µg/mL olarak bulunmuştur. Bu hVISA izolatlarını belirlemede PAP-AUC yönteminin önemini gözler önüne sermektedir. Ancak, PAP-AUC yönteminin uygulanmasındaki zorluk, maliyet ve zaman gibi kavramlar göz önüne alındığında, bu yöntemin laboratuvarlarda rutin uygulamaya konulması zordur. Çalışmada, PAP-AUC yöntemi ile VISA

ve hVISA oldukları saptanan iki izolatın yara kültür örneklerinden izole edildiği ve izole edildiği hastaların hastanede daha önce vankomisin veya başka bir glikopeptit grubu antimikrobiyal tedavisi almamış, izole edildiği dönemde vankomisin ve başka bir glikopeptit grubu antimikrobiyal tedavisi almıyor oldukları belirlenmiştir. VISA ve hVISA oluşumunun temelinde yatan durumlar üzerine daha fazla moleküler ve genetik çalışmaların yapılması bu konuya ışık tutacaktır.

Sonuç olarak, hastanede MRSA'ya bağlı enfeksiyonların tedavisinde ilk seçilecek olan glikopeptit grubu antibiyotiklerle tedavide başarısızlığa yol açan VISA ve hVISA izolatları belirlenmiştir. Bu izolatların hastanede belirlenmesi ciddi bir endişe kaynağıdır. Ayrıca, belirlenen bu izolatlar tedavide seçenekleri kısıtlamaktadır. Bu nedenle, belirli dönemlerde MRSA izolatlarında VISA/hVISA oranlarının araştırılması, toplumda ve hastane ortamında bu izolatların yayılımını engelleyecek önlemlerin ve uygulamaların hayata geçirilmesi çok önemlidir. Dolayısıyla, MRSA'ların neden olduğu, özellikle sağlık bakım ilişkili enfeksiyonlarda bu izolatların direnç oranlarının takip edilmesinin ve dirençli izolatların hastanelerde kolonizasyonunun önlemesi için gerekli enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınmasının faydalı olacağı kanısına varılmıştır.

ETİK KURUL ONAYI

Bu çalışma, İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar ve Yayın Etiği Kurulu onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 03.03.2020 ve Karar No: 2020/512).

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Yazarlar bu makale ile ilgili herhangi bir çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Bagnoli F, Rappuoli R & Grandi G. *Staphylococcus aureus*: Microbiology, Pathology, Immunology, Therapy and Prophylaxis. 1st ed. 2017. https://doi.org/10.1007/978-3-319-72063-0
2. Duman Y, Tekerekoğlu MS, Otlu B. Toplum ve hastane kökenli *Staphylococcus aureus* klinik izolatlarında Panton-Valentine lökosidin varlığının ve klonal ilişkinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2013; 47(3): 389-400. https://doi.org/10.5578/mb.5760
3. Lakhundi S, Zhang K. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Molecular characterization, evolution, and epidemiology. Clin Microbiol Rev 2018; 31(4): e00020-18. https://doi.org/10.1128/CMR.00020-18
4. Song KH, Kim M, Kim CJ, Cho JE, Choi YJ, Park JS, et al. Impact of vancomycin MIC on treatment outcomes in invasive *Staphylococcus aureus* infections. Antimicrob Agents Chemother 2017; 61(3): e01845-16. https://doi.org/10.1128/AAC.01845-16
5. Chang S, Sievert DM, Hageman JC, Boulton ML, Tenover FC, Downes FP, et al. Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *van*A resistance gene. N Engl J Med 2003; 348(14): 1342-7. https://doi.org/10.1056/NEJMoa025025
6. 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): 135-46. https://doi.org/10.1093/jac/40.1.135
7. Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, Kawasaki S, Hosoda Y, Hori S, et al. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. Lancet 1997; 350(9092): 1670-3. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)07324-8

8. 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. https://doi.org/10.1128/CMR.00042-09
9. CDC. Available from: https://www.cdc.gov/hai/organisms/mrsa-infection.html (Accessed date: 11.02.2021).
10. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0, 2021. Available from: http://www.eucast.org (Accessed date: 11.02.2021).
11. Çıkman A, Aydın M, Gülhan B, Karakeçili F, Kurtoğlu MG, Yüksekkaya S, et al. Absence of the *mec*C 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. https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.01.063
12. CDC. Available from: https://www.cdc.gov/hai/settings/lab/visa_vrsa_lab_detection.html (Accessed date: 11.02.2021).
13. Kuşçu F, Öztürk D, Gürbüz Y, Tütüncü E, Şencan İ, Gül S. Metisiline dirençli stafilokoklarda azalmış vankomisin duyarlılığının araştırılması. Mikrobiyol Bul 2011; 45(2): 248-57.
14. Wootton M, Mac Gowan AP, Walsh TR, Howe RA. A multicentre study evaluating the current strategies for isolating *Staphylococcus aureus* strains with reduced susceptibility to glycopeptides. J Clinic Microbiol 2007; 45(2): 329-32. https://doi.org/10.1128/JCM.01508-06
15. 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. https://doi.org/10.1093/jac/47.4.399
16. Durmaz R, Köksal F, Hoşoğlu S. Hastane infeksiyonu etkeni olan *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp, *Escherichia coli*, *Staphyococcus aureus* ve *Acinetobacter baumannii* izolatlarının moleküler tiplendirmesinde kullanılacak pulsed field gel electrophoresis (PFGE) yöntemlerinin standardizasyonu ve kit formatı haline getirilmesi. TÜBİTAK Proje No: 106S211 (SBAG-3459). Ankara, 2009.
17. Tanrıverdi ES, Duman Y, Tekerekoğlu MS. Evaluation of *Staphylococcus aureus* isolates in a tertiary hospital between years of 2018 and 2019. Fırat Med J 2020; 25(4): 184-8.
18. Özel Y, Büyükzengin KB, Yavuz MT. Klinik örneklerden izole edilen metisiline dirençli ve duyarlı *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotik direnç profilinin araştırılması. ANKEM Derg 2017; 31(2): 41-7.
19. Nazik S, Cingöz E, Şahin AR, Güler S. The alteration of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* strains isolated from blood culture over years. Kocaeli Med J 2018; 7(1): 32-6. https://doi.org/10.5505/ktd.2018.94824
20. Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance. Annual report 2020. Available from: https://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/publications/2020/central-asian-and-european-surveillance-of-antimicrobial-resistance.-annual-report-2020. (Accessed date: 12.02.2022).
21. García-Álvarez L, Holden MT, Lindsay H, Webb CR, Brown DF, Curran MD, et al. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mec*A homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: A descriptive study. Lancet Infect Dis 2011; 11(8): 595-603. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(11)70126-8
22. Kim C, Milheirico C, Gardete S, Holmes MA, Holden MT, de Lencastre H, et al. Properties of a novel PBP2A protein homolog from *Staphylococcus aureus* strain LGA251 and its contribution to the beta-lactam-resistant phenotype. J Biol Chem 2012; 287(44): 36854-63. https://doi.org/10.1074/jbc.M112.395962
23. Çetinkol Y, Altındiş M, Çetinkaya Z, Aktepe OC. Stafilokoklarda metisilin direncinin farklı yöntemlerle araştırılması ve çoklu antibiyotik direncinin saptanması. Mikrobiyol Bul 2008; 42(1): 119-24.
24. Schaumburg F, Köck R, Mellmann A, Richter L, Hasenberg F, Kriegeskorte A, et al. Population dynamics among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates in Germany during a 6-year period. J Clin Microbiol 2012; 50(10): 3186-92. https://doi.org/10.1128/JCM.01174-12

25. Becker K, van Alen S, Idelevich EA, Schleimer N, Seggewiß J, Mellmann A, et al. Plasmid-encoded transferable *mec*B-mediated methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Emerg Infect Dis 2018; 24(2): 242-8. https://doi.org/10.3201/eid2402.171074

26. Xu J, Pang L, Ma XX, Hu J, Tian Y, Yang YL, et al. Phenotypic and molecular characterisation of *Staphylococcus aureus* with reduced vancomycin susceptibility derivated in vitro. Open Med (Wars) 2018; 13: 475-86. https://doi.org/10.1515/med-2018-0071

27. Musta AC, Riedere K, Shemes S. Vancomycin MIC plus heteroresistance and outcome of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteremia: Trends over 11 years. J Clin Microbiol 2009; 47(6): 1640-4. https://doi.org/10.1128/JCM.02135-08

28. Iyer RN, Hittinahalli V. Modified PAP method to detect heteroresistance to vancomycin among methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a tertiary care hospital. Indian J Med Microbiol 2008; 26(2): 176-9. https://doi.org/10.1016/S0255-0857(21)01939-3

29. Liu C, Chambers HF. *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin: Epidemiology, clinical significance, and critical assessment of diagnostic methods. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47(10): 3040-5. https://doi.org/10.1128/AAC.47.10.3040-3045.2003

30. Tunç EK, Kuzucu Ç, Otlu B. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarında vankomisine karşı azalmış duyarlılığın araştırılması. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2017; 47(1): 39-46.

31. Çıkman A, Aydın M, Gülhan B, Parlak M, Gültepe B, Kalaycı Y, et al. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* izolatlarının antibiyotik direnci ve azalmış vankomisin duyarlılığının araştırılması: Çok merkezli bir çalışma. Mikrobiyol Bul 2015; 49(2): 240-8. https://doi.org/10.5578/mb.9230

32. Özmen Çapın BB, Tekeli A, Karahan ZC. Evaluation of the presence and characterization of vancomycin-intermediate and heterogeneous vancomycin-intermediate level resistance among bloodstream isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Microb Drug Resist 2020; 26(3): 238-44. https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0178

33. Avcıoglu F, Öztürk CE, Şahin İ, Öksüz Ş, Kızılırmak A, Akar N. Metisiline dirençli stafilokoklarda azalmış vankomisin duyarlılığının araştırılması. DU Health Sci Inst 2020; 10(1): 81-6. https://doi.org/10.33631/duzcesbed.578228

34. Mirza HC, Sancak B, Gür D. The prevalence of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* and heterogeneous visa among methicillin-resistant strains isolated from pediatric population in a Turkish university hospital. Microb Drug Resist 2015; 21(5): 537-44. https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0048

35. Aktaş E. Klinik örneklerden izole edilen MRSA suşlarinda vankomisine karşı azalmış duyarlılığın araştırılması. Mikrobiyol Bul 2010; 44(2): 339-41.

36. Sancak B, Ercis S, Menemenlioğlu D, Çolakoglu S, Hasçelik G. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin in a Turkish university hospital. J Antimicrob Chemother 2005; 56(3): 519-23. https://doi.org/10.1093/jac/dki272

37. Sancak B, Yağcı S, Gür D, Gülay Z, Öğünç D, Söyletir G, et al. Vancomycin and daptomycin minimum inhibitory concentration distribution and occurrence of heteroresistance among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* blood isolates in Turkey. BMC Infect Dis 2013; 13: 583. https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-583

38. Torun MM, Bahar H, Demirci M, Altaş K, Bağdatlı Y, Kocazeybek B, et al. Two heterogeneously vancomycin-intermediate clinical isolates of methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Turkish university hospital: Brief report of a surveillance study. Int J Antimicrob Agents 2005; 26(2): 508-10. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.09.001

39. Chaudhari CN, Tandel K, Grover N, Sen S, Bhatt P, Sahni AK, et al. Heterogeneous vancomycin-intermediate among methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Med J Armed Forces India 2015; 71(1): 15-8. https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2014.03.008

40. Mather CA, Werth BJ, Sivagnanam S, SenGupta DJ, Butler-Wu SM. Rapid detection of vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 2016; 54(4): 883-90. https://doi.org/10.1128/JCM.02428-15