

Farklı Klinik Örneklerden İzole Edilen Staphylococcus aureus İzolatlarında Metisilin, Yüksek Düzey Mupirosin ve Fusidik Asit Direncinin Fenotipik ve Genotipik Olarak Araştırılması

Phenotypic and Genotypic Investigation of High Level, Methicillin, Mupirocin and Fusidic Acid Resistance in Staphylococcus aureus Isolates Isolated from Different Clinical Specimens

Zerife ORHAN¹, Arzu KAYIŞ¹, İsmail AKYOL², Murat ARAL³

¹ Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Kahramanmaraş

² Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Kahramanmaraş

³ Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kahramanmaraş

Correspondence / Yazışma Adresi:

Zerife ORHAN

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu
Bahçelievler Yerleşkesi 46100 Kahramanmaraş, Türkiye

P: +90 505 595 17 28

E-mail: zarife70@hotmail.com

Geliş Tarihi / Received : 03.07.2017

Kabul Tarihi / Accepted : 03.08.2017

Özet

- Amaç:** Bu çalışmada, S.aureus izolatlarının metisilin, yüksek düzey mupirosin ve fusidik aside karşı antibiyotik direnç özelliklerinin fenotipik ve genotipik olarak açığa çıkarılması amaçlanmıştır.
- Gereç ve Yöntemler:** Antibiyotik direnç özelliği bilinmeyen 100 farklı Staphylococcus.aureus (S.aureus) izolatı klinik örneklerden saflaştırılmış ve bu izolatların metisilin, yüksek düzey mupirosin ve fusidik asit antibiyotik direnci ve plazmit içerikleri belirlenmiştir. Metisilin, yüksek düzey mupirosin ve fusidik asit duyarlılıklarını phoenixsistemi ile belirlenmiştir. Ayrıca Metisilin direnç özelliği 30 µg sefoksitin diski kullanılarak disk difüzyon yöntemi ile de araştırılmıştır. İzolatlardaki antibiyotik direnç özelliği ile ilgili mecA, ileS-2, fusA, fusB ve fusC genlerinin varlığı ise PCR amplifikasyonu ile araştırılmıştır.
- Bulgular:** Disk difüzyon ve phoenix analiz sonuçlarına göre tanımlanan S. aureus izolatlarının sefoksitin direnci %19 olarak tespit edilmiştir. Phoenix otomote sistem ile yüksek düzey mupirosin ve fusidik asit direnci tespit edilmemiştir. Moleküler analiz sonuçlarına göre ise mecA, fusA ve fusC genlerinin izolatlardaki frekansı sırası ile %19, %98 ve %1 olarak belirlenmiş fakat ileS-2 ve fusB genleri amplifiye edilmemiştir. Antibiyotik direnç ve plazmit varlığı arasındaki ilişkinin belirlenebilmesi için izolatların plazmit varlığı belirlenmiş ve izolatların %79'unda farklı sayılarda plazmit içerdiği tespit edilmiştir.
- Sonuç:** Fenotipik ve genotipik yöntemle elde edilenlere sonuçlar benzerlik göstermesine karşın benzer olmayan bazı sonuçları da içermektedir. Stafilocok enfeksiyonlarının tedavisinde, antibiyotik direnç genlerinin doğru ve hızlı bir şekilde teşhisi, enfeksiyonların yayılmasının önlenmesinde çok önemlidir. Antibiyotik direncinin doğru saptanması için fenotipik yöntemler ile birlikte PCR bazlı moleküler yöntemler de tercih edilmelidir. (**Sakarya Tıp Dergisi 2017, 7(3):131-137**)
- Anahtar Kelimeler:** Staphylococcus aureus; metisilin direnci; fusidik asit direnci; mupirosin direnci; PCR; plazmit içeriği

Abstract

- Objective:** In this study, we inspect to reveal the phenotypic and genotypic expression of antibiotic resistance properties of Staphylococcus.aureus(S. aureus) isolates against methicillin, high levels of mupirocin and fusidic acid.
- Materials and Methods:** One hundred S. aureus isolates with unknown antibiotic resistance were isolated from clinical specimens and methicillin, high level mupirocin and fusidic acid resistance and plasmid contents of these isolates were determined. The phoenix system was used to resolve methicillin, high levels of mupirocin and fusidic acid sensitivities. Also, the resistance to methicillin was also investigated by disc diffusion method using a 30 µg cefoxitin disc. The presence of mecA, ileS-2, fusA, fusB, and fusC genes related to antibiotic resistance property was investigated by PCR amplification in all isolates.
- Results:** The cefoxitin resistance of S.aureus isolates, identified according to the results of disk diffusion and phoenix analysis, was calculated as 19%. Mupirocin and fusidic acid resistance was not distinguish in isolates using the Phoenix automated system. According to the results of molecular analysis, mecA, fusA and fusC gene frequencies were determined as 19%, 98% and 1%, respectively, but ileS-2 and fusB genes were not amplified by PCR. In order to determine the relationship between antibiotic resistance and plasmid presence, plasmids were isolated from identified bacterial isolates. It is found that most of bacterial isolates (79%) contain different numbers plasmids.
- Conclusion:** Although the results obtained by phenotypic and genotypic methods show similarities, they also contain some non-identical results. In the treatment of staphylococcal infections, the accurate and rapid diagnosis of antibiotic resistance genes is crucial in preventing the spread of infections. Phenotypic methods as well as PCR-based molecular methods should be preferred for accurate detection of antibiotic resistance. (**Sakarya Med J 2017, 7(3):131-137**)
- Keywords:** Staphylococcus aureus; methicillin resistance; fusidic acid resistance; mupirocin resistance; PCR; plasmid content

Giriş

Metisilin ve diğer birçok antibiyotiklere dirençli olan *S.aureus* izolatları, dünya çapında hastane enfeksiyonlarının başlıca etkenlerindedir. *S.aureus*'un antibiyotik direnci tedavide zorluklara yol açmaktadır. Metisilin direnci, düşük afiniteli PBP2a kodlayan *mecA* geni tarafından belirlenir ve bu geni taşıyan izolatlar tüm beta-laktam ajanlara karşı dirençlidir. Metisilin direnci genellikle heterojen olduğundan, fenotipik yöntemler ile metisilin direncinin belirlenmesinde doğru olmayan sonuçlar ortaya çıkmaktadır. Bu durum hedefsiz antibiyotik kullanımı sonucu yetersiz tedaviye ve dirençli izolatların yayılmasına sebep olmaktadır. Ayrıca yanlış metisilin direnci tanısı tedavide son çare olarak kullanılması gereken glikopeptid antibiyotiklerin gereksiz yere kullanılmasına neden olmaktadır.¹ Dünyada 1985, Türkiye'de 1991 yılında klinik kullanıma girmiş olan mupirosin, *S.aureus* enfeksiyonlarında ve taşıyıcılık durumunu tedavi etmek için topikal bir antimikrobiyal ajan olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Klinikte yaygın kullanımı sonucu ilk kez 1987'de bu antibiyotikçe karşı direnç tespit edilmiştir.^{2,3} Biyokimyasal olarak mupirosin bakteriyel izölösil-tRNA sentetaz enzimine bağlanıp, protein sentezini inhibe ederek etki göstermektedir. *S.aureus*'ta genellikle kromozom tarafından kodlanmış *ileS* geninde nokta mutasyonları ile ilişkili olan düşük düzey direnç (MIC 8 ila 250 µg/ml) ve mupirosin tarafından bağlanamayan modifiye izölösil-tRNA sentetaz kodlayan genellikle plazmid kodlu gen olan *mupA* (*ileS-2* olarak da adlandırılır) ile ilişkili olan yüksek düzey direnç (MIC ≥ 512 µg/ml) olmak üzere iki mupirosin direnç fenotipi belirlenmiştir.⁴

Fusidik asit *S.aureus*'un neden olduğu cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları, akut ve kronik osteomyelit, vertebra enfeksiyonu, septik artrit ve diğer cihazla ilişkili enfeksiyonlar için tercih edilen tedavi yöntemidir. Ribozom üzerindeki uzama faktörü G'ye (EF-G) bağlanıp protein sentezini inhibe ederek etki gösterir. Birçok ülkede fusidik asite dirençli *S. aureus* izolatların bildirilmiş ve direnç prevalansı, farklı ülkeler arasında son derece farklı bulunmuştur.^{5,6,7}

S. aureus'da iki büyük fusidik asit direnç mekanizması bulunmaktadır. Yüksek seviyeli direnç veren *fusA* (EF-G'yi kodlayan) mutasyonları nedeniyle ilaç hedef bölgesinin değiştirilmesi, diğeri ise düşük seviyeli dirence aracılık eden *fusB*, *fusC* ve *fusD* de dahil

olmak üzere *fusB* ailesinin proteinleri tarafından ilaç hedef alanının korunmasıdır^{7,8}.

S.aureus'larda antibiyotik direncinin hızlı ve doğru saptanması uygun antibiyotik kullanımı ve enfeksiyon kontrolü açısından önem taşımaktadır. Bu yüzden bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen 100 *S.aureus* izolatında metisilin, yüksek düzey mupirosin ve fusidik asit dirençleri fenotipik ve genotipik olarak araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metod

Bakteriyel suşlar

Çalışma Ocak-Eylül 2015 tarihleri arasında Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji ve Üniversite-Sanayi-Kamu İşbirliği Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi Mikrobiyal Genetik Laboratuvarlarında yürütülmüştür.

Çalışmada 100 *S.aureus* izolatı metisilin direnci veya duyarlılığı ayırt edilmeksizin çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş ve daha sonra metisilin direnci tespit edilmiştir. Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen ve koyun kanlı agara ekimleri yapılan örnekler 37°C'de etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası izole edilen izolatların identifikasyonu koloni morfolojisi, Gram boyama, kanlı agarda hemoliz özelliği, katalaz reaksiyonu, tüp koagülaz ve zayıf koagülaz gösteren izolatlar yapılan DNase testleriyle ve BD phoenix tam otomatize sistem ile yapılmıştır. *S.aureus* olduğu saptanan tüm izolatlar çalışma yapıncaya kadar %15 gliserin eklenmiş Tryptone Soya Broth kullanılarak saklanmıştır. Çalışmada kontrol suşu olarak *S.aureus* ATCC 25923 kullanılmıştır.

Biyokimyasal analizler

Metisilin direnci 30 µg'lık sefoksitin diski (Oxoid, İngiltere) kullanılarak Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standartlarına göre Mueller-Hinton agarda 37°C'de 24 saat inkübasyon ile araştırılmıştır. Sefoksitin inhibisyon zon çapı ≤21 mm olan izolatlar dirençli, ≥22 olan izolatlar ise duyarlı olarak değerlendirilmiştir.⁹ İzolatların identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık testlerinde BD Phoenix otomatize mikrobiyoloji sisteminden (Becton Dickinson, ABD) de yararlanılmış ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda çalışılmıştır.

Moleküler analizler

PCR işlemi toplam 30 µl hacimde gerçekleştirilmiştir. 20.5 µl dH₂O, 1'er µl ileri ve geri primerlerden, 3µl buffer (10X), 1µl dNTP, 0.5µl Taq DNA polimeraz (5 U/ml) karıştırılarak hazırlanmıştır. Önceki çalışmalara dayanarak belirlediğimiz primerlerin özellikleri Tablo 1'de verilmiştir. Kalıp DNA olarak 10µl ddH₂O'da çözdürülen koloniden 1µl kullanılmıştır. PCR işlemi tek döngü 94°C'de 5dk. ön denatürasyon ile başlatılmış daha sonra 30 döngü olmak üzere 94°C'de 30sn. denatürasyon, primerler için uygun yapışma sıcaklığı (mecA 50°C, ile S-2 51°C, fusA 62°C, fusB 54°C, fusC 51°C) 30sn. ve 72°C'de 45sn. uzama, son uzama ise fusA için 72°C'de 2 dk., diğerlerinde ise 72°C'de 10dk olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. PCR ile çoğaltılan örnekler %1'lik jel hazırlanarak elektroforeze yüklenmiş, ultraviyole (UV) ışığında görüntülenmiştir. Tüm çalışmada pozitif ve negatif kontroller kullanılmıştır.

Plazmit DNA izolasyonu; Thermo Scientific GeneJET Plazmid Miniprep Kit kullanarak firmanın verdiği prosedüre 1000 ml'ye %0.50 lizozim eklenerek modifiye edilmiş ve gerçekleştirilmiştir.

Bulgular

İzole edilen Bakterilerin Tanımlanması

Bakterileri tanımlamada Gram boyama sonucunda Gram pozitif üzüm salkımı şeklindeki görüntü, kanlı agarda hemoliz oluşturmaması, katalaz testi pozitif, tüpte belirgin pıhtı oluşumu koagülaz pozitif, zayıf koagülaz özelliği gösteren izolatlarda (2 izolatta yapıldı) DNase test agar besiyerinde kolonilerin üzerine 1 N HCl ile kaplandığında koloni etrafında berrak zon oluşması DNase pozitif olarak değerlendirildi ve bu özellikleri gösteren bakteriler S.aureus olarak değerlendirildi. Ayrıca BD phoenix tam otomatize sistem ile de sonuçlar doğrulanmıştır.

Stafilokok izolatları yara (%53), kan (%20), burun (%9), balgam (%7), idrar (%7), boğaz (%3) ve beyin omurilik sıvısından (%1) izole edilmiştir.

1. İzole Edilen Bakterilerin Antibiyotik Direnç Özellikleri

Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi

Metisilin direncini tespit etmek için kullanılan disk difüzyon yönteminin sonucuna göre 100 izolatın %19'u metisiline dirençli bu-

lunmuştur. Bu dirençli izolatlar yara (%10), kan (%5), burun (%1), idrar (%2) ve boğaz (%1) örneklerinden elde edilmiştir. MRSA'nın %9'u kliniklerden, %7'si polikliniklerden %3'ü yoğun bakımlardan izole edilmiştir.

BD Phoenix 100 otomatik sistem

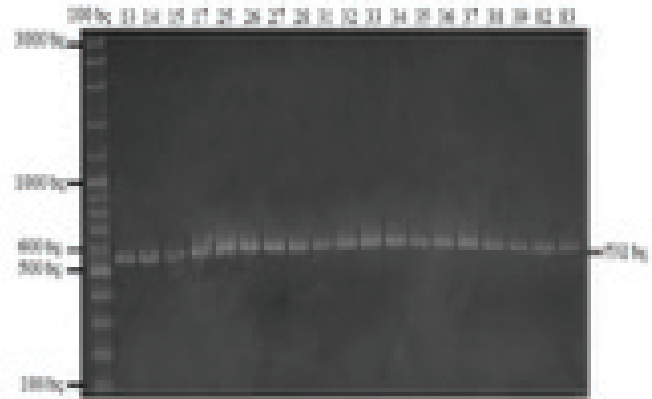
Otomatize sistem sonucuna göre metisilin direnci %19 olarak tespit edilirken yüksek düzey mupirosin ve fusidik asit dirençleri tespit edilmemiştir.

PCR tahlili

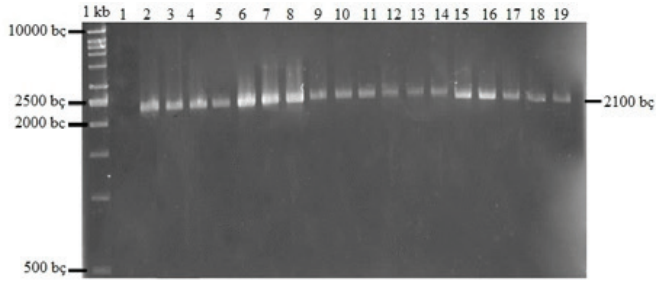
Metisilin direncini tespit etmek için kullanılan 532 baz çifti uzunluğundaki mecA geni izolatların %19'unda (Şekil 1) tespit edilmiştir. Yüksek düzey mupirosin direncini tespit etmek için kullanılan 237 baz çifti uzunluğundaki ileS-2 geni hiçbir izolatta tespit edilmemiştir. Fusidik asit direnci için kullanılan 2100 baz çifti uzunluğundaki fusA izolatların %98'inde, (Şekil 2), 530 baz çifti uzunluğundaki fusC %1 (Şekil 3) oranında görülmüş fakat fusB genine rastlanılmamıştır.

2. İzole Edilen Bakterilerin Plazmit İçerikleri

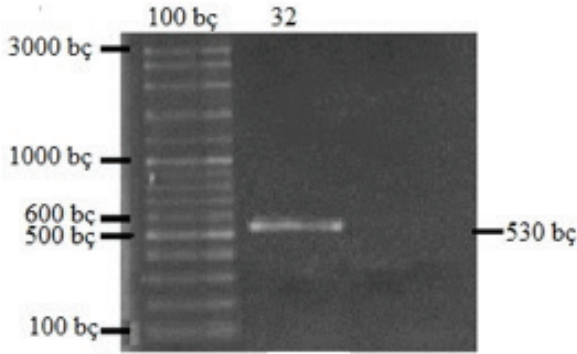
Toplam 100 izolatın 79'unda plazmit tespit edilirken bunlardan 62'sinde bir plazmit, 13'ünde iki, dördünde ise üç adet plazmit tespit edilmiştir (Şekil 4).



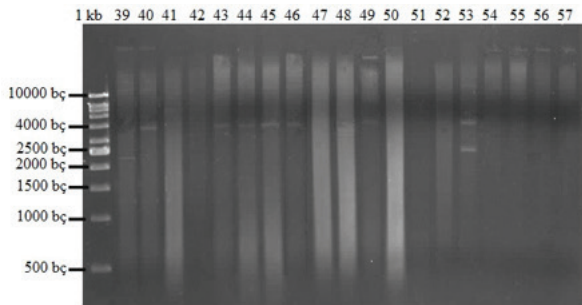
Şekil 1. 13-15, 17, 25-28, 31-39, 82, 83 nolu izolatların PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen mecA geni agaroz jel görüntüsü. M: 100 bç DNA standardı.



Şekil 2. 2-19. izolatların PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen fusA geni agaroz jel görüntüsü. M: 1 kb DNA standardı.



Şekil 3. 32 nolu izolatin PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen fusC geni agaroz jel görüntüsü. M: 100 bp DNA standardı.



Şekil 4. 39-57 nolu izolatların plazmit içeriklerinin %0.8'lik agaroz jeldeki görüntüsü. M: 1 kb DNA standardı.

Tartışma

MRSA'nın erken ve doğru tanısı MRSA enfeksiyonlarının etkin yönetimi ve yayılmasının kontrolünde önemlidir. PCR bazlı tahliller heterojen bir direnç nedeniyle, MRSA tespiti için altın standart

olarak düşünülmektedir. Genotipik yöntemler konvansiyonel duyarlılık yöntemlerine kıyasla metisilin dirençli stafilocok tespitinde daha doğru sonuçlar vermektedir.¹⁵ Çalışmamızda hem fenotipik (phoenix ve disk difüzyon) yöntemler, hem de genotipik yöntemle izolatların %19'unda metisilin direnci saptanmıştır. Aynı şekilde çalışmalarında fenotipik ve genotipik yöntem arasında iyi bir korelasyon bulan çalışmalar bulunmaktadır.^{16,17}

Birçok çalışma, özellikle bakteri ve ilgi genlerin tespit için PCR'in uygun olduğunu¹⁸, stafilokokal antibiyotik direnç genlerinin tespitinde PCR'in uygulanabilirliğini göstermiştir.¹⁹ Ayrıca önceki çalışmalar mecA geninin doğru saptanmasında PCR'in önemini kanıtlamıştır.²⁰

Yapılan bazı çalışmalarda fenotipik yöntemle belirlenemeyen izolatların genotipik olarak mecA genini taşıdığını tespit etmişlerdir. Bu durumu, mecA ekspresyonunun düzenlenmesi ve metisilin direncinin fenotipik ekspresyonu ile bağlantılı konakçı faktörlerinin olmamasına bağlamışlardır.²¹ MRSA'ya karşı son savunma oluşturan vankomisin gibi sadece birkaç antibiyotikğin olması, MRSA'nın artan insidansı ve yayılmasından dolayı çoklu antibiyotiğe dirençli MRSA'nın derhal tespiti için kullanılabilir hızlı ve hassas laboratuvar yöntemlerinin kesinlikle gerekli olduğu vurgulanmıştır.²² Bazı araştırmacılar metisilin direncinin inkulum boyutları, inkübasyon süreleri, sıcaklıkları, pH, ortam tuz konsantrasyonu ve beta-laktam antibiyotiklerine maruz kalma gibi kültür koşullarından etkilendiğini, bu faktörler özellikle direncin düşük olduğu durumlarda metisilin direncinin tespitini karmaşık hale getirdiğini ve fenotipik yöntemlerin en büyük dezavantajının zaman alıcı olduğunu belirtmişlerdir. Bu yüzden genotipik yöntemleri kullanmanın daha sağlıklı sonuçlar vereceğini ifade etmişlerdir.¹⁵

Çalışmamızda her iki yöntem sonuçları korelasyon göstermesine rağmen S.aureus'ta metisilin direncinin belirlenmesinde altın standart olarak kabul edilen PCR ile mecA genini saptama yönteminin rutin laboratuvarlarda kullanımı özellikle, tedaviye klinik yanıt olmadığı ya da direnç sonuçlarının çıkması için zaman kaybedilmesi gereken olgularda kullanılması daha doğru bir tercih olabilir. Ayrıca MRSA'nın erken teşhisi, koruyucu enfeksiyon kontrol stratejilerinin zamanında uygulanmasını sağlar ve maliyetleri düşürür.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan primerlerin özellikleri

Gen	Antibiyotik	Primer	Oligonükleotid Dizisi (5' 3')	Amplifikasyon (bp)	Referans
mecA	Oksasilin	mecAF	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	532	10
		mecAR	AGTTCGAGTACCGAATTG C		
fusA	Fusidik asit	fusAF	CGCGGATCCTATCGTATTTATTCAGTAAT	2100	11
		fusAR	AAGGATCCCTTGATTTTAACCTAGGCTA		
fusB		fusBF	ATTCAATCGGAAACCTATAATGATA	292	
		fusBR	TTATATATTCCGATTTGATGCAAG		
fusC		fusCF	GTACAAACGATATGAATTCC	530	13
		fusCR	ATCATCTAGGTTCTGATTAC		
ileS-2	Yüksek düzey mupirosin	ileS-2 F	GTTTATCTTCTGATGCTGAG	237	14
		ileS-2R	CCCCAGTTACCGATATAA		

Mupirosin, farklı stafilkoksik deri enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Sağlık çalışanları ve hastalarda MRSA nazal taşıyıcılığın ortadan kaldırılmasında yararlı etkisi nedeniyle MRSA salgınlarının kontrolünde önemli bir antimikrobiyal madde olarak görev yapmıştır.²³ Mupirosinin uzun süreli, yaygın veya kontrolsüz kullanımı bu antibiyotiğe karşı direncin ortaya çıkmasına neden olmuştur.²⁴ Dünya çapında değişik oranlarda dirençli izolatlar bildirilmiştir.^{25,26} Dirençli izolatların hassas ve hızlı tespit edilmesi etkin tedavinin başlatılması, hastanın mortalite riskinin azaltılması ve sürveyans programları uygulanması için gereklidir. Birçok çalışma, bakteri ve ilgili genlerin saptanmasında PCR'in son derece etkili olduğunu ortaya çıkarmıştır.²³

Bu çalışmada hem Phoenix otomatize sistem hem de PCR ile yapılan çalışma sonuçlarımız uyumlu bulunmuş olup izolatların hiç birinde yüksek düzey mupirosin direnci tespit edilmemiştir. Çalışmamızda olduğu gibi mupirosin duyarlılık testi ile PCR sonuçları arasında % 100 uyum bulan başka çalışmalar da bulunmaktadır.²³ Fenotipik ve genotipik yöntem arasında hücrelerin bir kısmında ileS-2 geninin ekspresyon eksikliğinden kaynaklanan karışık mupirosin duyarlılıklarına sahip bakteri kolonilerinin seçilmesinden dolayı tutarsızlık bulan çalışmalar da bulunmaktadır.²⁷

Fusidik asite dirençli S.aureus'un %0.3 ila %52.5 arasında değişen prevalansı birçok ülkede rapor edilmiştir ve farklı ülkeler arasında oldukça farklı direnç durumları meydana gelmiştir. ABD ve Avrupa koleksiyonlarında, S.aureus izolatlarında fusC, fusB'den daha

yaygın olarak bulunmuştur.^{8,13}. Yapılan bir çalışmada, fusA mutasyonunun Danimarka hastanelerinde invaziv S.aureus suşları arasında fusB ve fusC'nin varlığı kadar sık olduğu tespit edilmiştir ve S.aureus'un bakteriyemi izolatlarında fusA, fusB ve fusC sınıflarının yaklaşık olarak eşit frekansları bulunmuştur.²⁸ Başka bir çalışmada S.aureus fusidik asit direncinin oluşması için EF-G içinde tek aminoasit değişiminin kritik önemini ortaya koyan kanıtlar sağlayacağı öne sürülmüştür.²⁹

O'Neill ve ark.¹², Avrupa ülkelerinde impetigo bülloza hastalarından elde edilen S.aureus'un birkaç fusidik asite dirençli klinik izolatlarının kromozom üzerindeki fusB determinantı taşıyan bir klonal epidemik izolatı temsil ettiğini göstermişlerdir. Ayrıca çalışmalarında fusA mutasyonlarını nonepidemik fusidik asit dirençli izolatlar olarak tespit etmişlerdir. Chen ve ark.⁶, 45 fusidik asite dirençli MRSA izolatının, 38'inde (%84), 26 MSSA izolatlarının ise 3'ünde fusidik asite yüksek düzeyde direnç kazandıran fusA mutasyonlarının olduğunu, hiçbirinde fusB olmadığını ve 7'sinde (%16) ise fusC olduğunu ifade etmişlerdir. Başka bir çalışmada ise fusidik asit direncinin fusA'daki mutasyon değişikliği ile ilişkili olduğu göstermiştir. Ayrıca fusidik asite dirençli izolatların genetik olarak farklı klonlara ait olduğu bildirilmiştir. 5 Literatürde 30'dan fazla fusA mutasyon tipi tarif edilmiştir. Fakat bunlardan sadece birkaçı fusidik asit direnç sebebi olarak teyit edilmiştir. Fusidik asit direnci ile ilişkili aminoasit değişiklikleri arasında L461K daha yaygın ve fusidik asite direnç seviyesi daha yüksek olduğu, ayrıca bu mutasyonu taşıyan S.aureus izolatlarının poliklonal olduğu bildirilmiştir.

L461S'nin ise düşük fusidik asit MİK değeri ile ilişkili olduğu ifade edilmiştir.¹³

Phoenix otomatize sistem ile yaptığımız çalışmamızda 100 izolatın hiç birinde fusidik asit direncine rastlanılmamıştır. Fakat moleküler olarak fusidik asit direncine baktığımızda ise izolatların %98'inde 2100 bç'lik fusA geni tespit edilmiştir. Bunun sebebi ise kromozom üzerinde gen bulunmakta dolayısı ile PCR amplifikasyonları çalışmaktadır. Ancak gen olduğu halde mRNA sentezlemiyorsa protein sentezlenmeyecek ve direnç oluşmayacaktır.

Çalışmamızda %1 oranında 530 bç'lik fusC geninine rastlanmış olup, izolatların hiçbirinde fusB geni tespit edilememiştir. Fusidik asite dirençli suşlar arasında fusB ve fusC genlerinin olmaması nadir görülen bir durum olmasına rağmen Lim ve ark⁵. yaptıkları çalışmalarında fusB ve fusC direnci saptamamışlardır. Fakat Tayvan'da yapılan çalışma raporunda fusidik asite dirençli suşların %73.5'inin fusC^{8,13} Avrupa ülkesinde yapılan çalışmada ise, izolatların %10'dan fazlasının ya fusB ya da fusC barındırdığını göstermiştir.¹³ Fransa, İngiltere ve İrlanda'da deri ve yumuşak doku enfeksiyonu olan hastalardan izole edilen fusidik asite dirençli S.aureus izolatlarının epidemiyolojik çalışmasında sekiz farklı klonal kompleks tespit edilmiştir. Bu ülkelerden alınan izolatların çoğunluğunu CC121, CC8 ve CC5 oluşturmuştur. CC121 deri enfeksiyonu ile ilişkili tek klonal kompleks olarak tespit edilmiştir. Bu klonal kompleksin ayrıca fusB belirleyicisi içeren ana direnç mekanizmasına sahip olduğu bildirilmiştir. Bu durum yaygın fusidik asit dirençli klonların çeşitli bölgelerde farklı olabileceğini göstermektedir.³⁰ Bizim çalışmamızda da fusB geninin olmaması ve %1 oranında fusC geninin bulunması çalışmada kullandığımız izolatların klonal komplekslerinin farklı olmasından kaynaklanabilir. Bu yüzden klonal komplekslerle ilgili yapılacak bir çalışma bu konuda daha yararlı olabilecektir.

Çalışmamızın sonucuna göre özellikle fusidik asite klinik yanıtın olmadığı olgularda fus genlerinin tespiti için moleküler bir yöntemle başvurulması daha hızlı ve güvenilir bir sonuç alınması açısından önem arz etmektedir.

Sonuç olarak hastalık etkeni mikroorganizmaların doğru tanımlanması ve direnç özelliklerinin belirlenerek tedavi geliştirme sürecin-

de bu moleküler sonuçların kullanılmasının zaman ve etkin tedavi açısından avantajlı olabileceği tespit edilmiştir.

Kaynaklar

- Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ, Smayevsky J, Bell J, Jones RN, et al. Survey of infections due to *Staphylococcus* species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY antimicrobial surveillance program, 1997-1999. *Clin Infect Dis* 2001;32(Suppl. 2):114-32.
- Wielders CLC, Fluit AC, Brisse S, Verhoef J, and Schmitz FJ. *mecA* Gene Is Widely Disseminated in *Staphylococcus aureus* Population. *J Clin Microbiol* 2002;40(11):3970-75.
- Seah C, Alexander DC, Louie L, Simor A, Low DE, Longtin J, and Melanoa, RG. MupB, a New High-Level mupirocin Resistance Mechanism in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56(4):1916-20.
- Simor AE, Stuart TL, Louie L, Watt C, Ofner-Agostini M, Gravel D, et al. and the Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program. Mupirocin-Resistant, Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains in Canadian Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51(11):3880-86.
- Lim KT, Ju Tehb CS, Mohd Yusof MY, and Thong KL. Mutations in *rpoB* and *fusA* cause resistance to rifampicin and fusidic acid in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from a tertiary hospital in Malaysia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2014;108(2):112-18.
- Chen HJ, Hung WC, Tseng SP, Tsai JC, Hsueh PR, and Teng LJ. Fusidic Acid Resistance Determinants in *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54(12):4985-91.
- McLaws FB, Larsen AR., Skov RL, Chopra I, and O'Neill AJ. Distribution of Fusidic Acid Resistance Determinants in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(3):1173-76.
- Chen CM, Huang M, Chen HF, Ke SC, Li CR, Wang JH et al. Wu LT. Fusidic acid resistance among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Taiwanese hospital. *BMC microbiol* 2011;11:98.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. Clinical and laboratory standards Institute (CLSI) 2015;35(3):M100-S25.
- Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, and Witte W. Multiplex PCR Assay for Simultaneous Detection of Nine Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 2003;41(9):4089-94.
- O'Neill AJ, Bostock JM, Moita AM, Chopra I. Antimicrobial activity and mechanisms of resistance to cephalosporin P1, an antibiotic related to fusidic acid. *J Antimicrob Chemother* 2002;50(6):839-48.
- O'Neill AJ, Larsen AR, Henriksen AS, and Chopra I. A Fusidic Acid-Resistant Epidemic Strain of *Staphylococcus aureus* Carries the *fusB* Determinant, whereas *fusA* Mutations Are Prevalent in Other Resistant Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(9):3594-97.
- Castanheira M, Watters AA, Mendes RE, Farrell DJ, and Jones RN. Occurrence and molecular characterization of fusidic acid resistance mechanisms among *Staphylococcus* spp. from European countries (2008). *J Antimicrob Chemother* 2010;65(7):1353-58.
- Nunes EL, Dos Santos, KR, Mondino PJ, Bastos Mdo C, Giambiagi-de Marval M. Detection of *ileS-2* gene encoding mupirocin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by multiplex PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;34(2):77-81.
- Sajith Khan AK, Shetty PJ, Sarayu Y L, Chidambaram A, Ranganathan R. Detection of *mecA* genes of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Polymerase Chain Reaction. *Int J Health Rehabil Sci* 2012;1(2):64-68.
- Demir T, Coplu N, Esen B. Comparative analysis of phenotypic and genotypic detection of methicillin resistance among *Staphylococcus aureus*. *Indian J Pathol Microbiol* 2016;59(3):314-17.
- Pe'Rez-Roth E, Claverie-Martin F, Villar J, and Me'Ndez-A 'Lvarez S. Multiplex PCR for Simultaneous Identification and Detection of Methicillin and Mupirocin Resistance. *J Clin Microbiol* 2001;39(11):4037-41.
- Salisbury SM, Sabatini LM, and Spiegel CA. Identification of methicillin-resistant staphylococci by multiplex polymerase chain reaction assay. *Am J Clin Pathol* 1996;107(3):368-73.
- Anthony RM, Connor AM, Power EGM, and French GL. Use of the polymerase chain reaction for rapid detection of high-level Mupirocin resistance in staphylococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18(1):30-34.
- Schmitz FJ, Mackenzie CR, Hofmann B, Verhoef J, Finken-Eigen M, Heinz HP, et al. Specific information concerning taxonomy, pathogenicity and methicillin resistance of staphylococci obtained by multiplex PCR. *J Med Microbiol* 1997;46(9):773-78.
- Gomaa NIM, and Younes S. Multiplex PCR Assay for the Simultaneous Species Identification and Detection of Antibiotic Resistance Genes in *Staphylococci* Isolates. *Egypt J Med Microbiol* 2006;15(4):763-72.
- Kumurya AS, Gwarzo MY, Uba A. One Step PCR for Detection of *Staphylococcus aureus* Specific Sequence Gene and *mecA* Gene. *International Journal of Advanced Materials Research* 2015;1(3):73-79.
- Pournajaf A, Ardebili A, Ghaemi EA, Omid S, Borhani K, Khodabandeh M, et al. Identification of Clinical Methicillin and Mupirocin-resistant *Staphylococcus aureus* by Multiplex-PCR. *J Med Bacteriol* 2014;3(1, 2):52-59.
- Dardi KD. Mupirocin resistance in clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a tertiary care rural hospital. *Int J Adv Med Health Res* 2014;1(2):52-56.
- Upton A, Lang S, Hefferman H. Mupirocin and *Staphylococcus aureus*: A recent paradigm of emerging antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:613-617.
- Orrett FA. The emergence of mupirocin resistance among clinical isolates of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Trinidad: A first report. *Jpn J Infect Dis* 2008;61:107-10.
- Anthony RM, Connor AM, Power EGM, French GL. Use of the polymerase chain reaction for rapid detection of high-level mupirocin resistance in staphylococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999;18(1):30-34.
- Lannergård J, Norstrom T, and Hughes D. Genetic determinants of resistance to fusidic acid among clinical bacteremia isolates of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(5):2059-65.
- Besier S, Ludwig A, Brade V, Wichelhaus TA. Molecular analysis of fusidic acid resistance in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 2003;47(2):463-9.
- Liu Y, Geng W, Yang Y, Wang C, Zheng, Y, Shang Y, et al. Susceptibility to and resistance determinants of fusidic acid in *Staphylococcus aureus* isolated from Chinese children with skin and soft tissue infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012;64(2):212-8.

