flora

KLİNİK ÇALIŞMA/RESEARCH ARTICLE

FLORA 2017;22(3):102-109 • doi: 10.5578/flora.64045

Klinik *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Bazı Antibiyotiklere Dirençlerinin Fenotipik ve Genotipik Olarak Belirlenmesi

Phenotypic and Genotypic Determination of Antibiotic Resistances of Some Clinical *Staphylococcus aureus* Isolates

Zerife ORHAN[1], Arzu KAYIŞ[1], İsmail AKYOL[2], Esra KAYA[3], Murat ARAL[3]

[1] Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Sağlık Bakım Hizmetleri Bölümü, Kahramanmaraş, Türkiye

[2] Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Kahramanmaraş, Türkiye

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

ÖZET

Giriş: *Staphylococcus aureus, ciddi hastalıklara yol açabilen tehlikeli bir patojendir. Antibiyotik direncinin ortaya çıkması büyük oranda etkili tedaviler bulma sorununa neden olmuştur. Bu çalışma, hastaların çeşitli klinik örneklerinden elde edilen S. aureus izolatlarında bazı antibiyotiklerin antibiyotik duyarlılık paternleri ile antibiyotik direnç genleri arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacıyla yapılmıştır.*

Materyal ve Metod: *Toplam 100 S. aureus klinik izolatı, antimikrobik duyarlılık testine tabi tutulmuştur. Oksasilin (mecA), trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SMZ) (dfrA), eritromisin, klindamisin (ermA, ermB, ermC ve msrA), kinupristin-dalfopristin (vatA, vatB, vatC) ve siprofloksasin (gyrA, gyrB) direnci ile ilişkili genler konvansiyonel polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile amplifiye edilmiştir.*

Bulgular: *Yüz S. aureus izolatı arasındaki metisiline direnç oranı %19 idi ve bu izolatların hepsi de mecA genini taşıyordu. Fenotipik olarak izolatların %1'i TMP-SMZ'ye dirençli iken, yine aynı izolat dfrA genini de taşıyordu. Fenotipik olarak eritromisin direnci %26 olarak tespit edilirken, izolatların %6'sının hem ermA, hem de ermC genini birlikte taşıdığı, %22'sinin ise sadece ermC genini taşımakta olduğu tespit edilmiştir. İzolatların hiçbiri de ermB ve msrA genlerini taşımıyordu. İzolatların hiçbiri fenotipik olarak kinupristin-dalfopristine dirençli değildi ve vatA, vatB, vatC direnç genlerini taşımıyordu. Fenotipik olarak izolatların %6'sı siprofloksasine dirençli iken, genotipik olarak 100 izolatın hepsi de gyrA ve gyrB direnç genlerini taşıyordu.*

Sonuç: *Elde ettiğimiz bulgulara göre, fenotipik antibiyotik duyarlılık testi sonuçları moleküler sonuçlara kısmen benzerlik göstermektedir. Antibiyotik duyarlılığını belirlemede hızlı ve güvenilir yöntemler uygun tedavi kararlarını belirlemek için önemlidir. Bu yüzden klasik yöntemler ve PCR gibi moleküler yaklaşımlar birlikte kullanıldığında daha doğru ve güvenilir bilgiler sağlayabilir.*

Anahtar Kelimeler: *Antibiyotik direnç genleri; Polimeraz zincir reaksiyonu; Phoenix; Staphylococcus aureus*

Geliş Tarihi/Received: 10/11/2017 - Kabul Ediliş Tarihi/Accepted: 03/12/2017

SUMMARY

Phenotypic and Genotypic Determination of Antibiotic Resistances of Some Clinical *Staphylococcus aureus* Isolates

Zerife ORHAN[1], Arzu KAYIŞ[1], İsmail AKYOL[2], Esra KAYA[3], Murat ARAL[3]

[1] Division of Health Care and Care Services, Vocational School of Health Services, University of Kahramanmaras Sutcu Imam, Kahramanmaras, Turkey
[2] Division of Agricultural Biotechnology, Faculty of Agriculture, University of Kahramanmaras Sutcu Imam, Kahramanmaras, Turkey
[3] Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, University of Kahramanmaras Sutcu Imam, Kahramanmaras, Turkey

Introduction: *Staphylococcus aureus is a dangerous pathogen causing serious illnesses. The acquisitions of antibiotic resistance genes has largely led to the problem of finding effective treatments. This study was carried out to evaluate the relationship between the antibiotic susceptibility patterns of some antibiotics and antibiotic resistance genes in S. aureus isolates obtained from various clinical samples of patients.*

Materials and Methods: *A total of 100 clinical S. aureus isolates were subjected to the antimicrobial susceptibility test. The genes associated with resistance to oxacilline (mecA), trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMX) (dfrA), erythromycin, clindamycin (ermA, ermB, ermC and msrA), quinupristin-dalfopristin (vatA, vatB, vatC) and ciprofloxacin (gyrA, gyrB) were investigated by PCR amplification.*

Results: *Methicillin resistance ratio of one hundred S. aureus isolates was found 19%, and all of these isolates were carrying the mecA gene. Only 1% of the isolates were phenotypically resistant to TMP-SMX and carrying the dfrA gene. Erythromycin resistance ratio was found 26% phenotypically and 6% of the isolates were carrying both the ermA and the ermC genes, and 22% of them were carrying only the ermC gene. None of the isolates carried the ermB and msrA genes. None of the isolates was phenotypically resistant to quinupristin-dalfopristin and carried vatA, vatB, vatC resistance genes. All isolates were carrying the gyrA and gyrB resistance genes, but 6% of the isolates were phenotypically resistant to ciprofloxacin.*

Conclusion: *According to the acquired results, phenotypic antibiotic susceptibility test results were partially similar to molecular observation. In pathogenic organisms, the use of rapid and reliable methods for determining antibiotic susceptibility is important in determining appropriate treatment outcomes. When biochemical methods and molecular approaches were combined, more accurate and reliable results were observed in a short time.*

Key Words: *Antibiotic resistance genes; Polymerase chain reaction; Phoenix; Staphylococcus aureus*

GİRİŞ

Staphylococcus aureus nispeten önemsiz yüzeysel deri infeksiyonlarından derin doku infeksiyonu ve bakteremi arasında değişen, çeşitli insan infeksiyonları arasında tıbbi önemi olan bir patojendir. *S. aureus*'un özellikle antibiyotiğe dirençli izolatları, ağırlıklı olarak ağır sepsis ve septik şok ile sonuçlanan hastane infeksiyonlarında tedavi güçlüğüne yol açarak yüksek morbidite ve mortaliteye neden olmaktadır. Bu durum da dünya çapında sağlık üzerinde önemli bir yük oluşturmaktadır[1]. Stafilokoklarda metisilin direnci, *mecA* geni tarafından kodlanan ve penisilin bağlayan protein 2a (PBP2a) olarak adlandırılan bir proteinin üretimi sonucu ortaya çıkar. Bu modifiye olmuş proteinin beta-laktam grubu antibiyotiklere afinitesi düşük olduğu için tüm beta-laktam ve beta-laktam türevi antibiyotiklere dirence neden olmaktadır[2].

Stafilokoklarda trimetoprime iki farklı direnç mekanizması tanımlanmıştır: biri kromozomal *dfrA* geninde nokta mutasyonlar, diğeri ise dihidrofolat redüktaz (DHFR)'ın ilaca dirençli varyantlarını kodlayan tipik olarak plazmid kaynaklı direnç belirleyicilerinin yatay olarak edinimidir. *S. aureus*'daki endojen DHFR mutasyonu, düşük-orta seviyede direnç kazandırırken, yatay olarak edinilmiş DHFR'nin ekspresyonu yüksek seviyeli dirence yol açar[3].

S. aureus'da makrolidler, linkozamidler ve streptogramin B (MLS_B) antibiyotiklerine karşı çapraz direnç, eritromisin ribozom metilasyon (*erm*) genleri tarafından kodlanır. Bu tip direnç konstitütif veya indüklenebilir olabilir. MLS_B indüklenebilir fenotipi eritromisine dirençli *S. aureus*'da klindamisin direncine neden olabilir. Böylece klindamisin tedavisinin klinik başarısızlığına yol açar[4].

Streptogramin antibiyotik direnci iki bileşenden oluşur; streptogramin A ve B; enzim inaktivasyonu veya aktif dışa atılım ile direnç oluşturulur. Streptogramin A asetiltransferaz *vatA* veya *vatB* tarafından üretilir, streptogramin B *vgb* tarafından üretilen hidrolaz ile inaktive edilir. Bu genler birlikte, plazmidler üzerinde ve kromozom üzerinde bulunabilir[5]. Florokinolonlar ilk olarak 1980'li yıllarda, gram-negatif bakteriyel infeksiyonların tedavisi amacıyla üretilmiş fakat pnömokok ve stafilokokların neden olduğu infeksiyonların tedavisinde de kullanılmıştır. Kinolon direnci, başta metisiline dirençli suşlarda olmak üzere, *S. aureus* suşları arasında hızla meydana gelmiştir. Bu yüzden de antistafilokokal ajan olarak florokinolonların kullanımı önemli ölçüde azalmıştır[6]. Florokinolon direncinde iki temel mekanizma bildirilmiştir. Sırasıyla ilki topoizomeraz IV ve DNA girazın alt birimlerini kodlayan *grlA/grlB* ve *gyrA/gyrB* genlerinin nokta mutasyonlarını içerir. İkinci mekanizma membranla ilişkili protein *norA* çoklu ilaca dirençli efluks pompasının indüksiyonudur. *S. aureus*'da, bu pompanın artan ekspresyonu, düşük seviyeli kinolon direnci ile sonuçlanabilir[7].

Stafilokok infeksiyonlarının tedavisinde antibiyotik direnç genlerinin hızlı tanınması ve antibiyotik direncinin saptanması; etkili bir tedavi sağlanması, infeksiyonun yayılmasının önlenmesi ve mortalite riskinin azaltılması için çok önemlidir. Bu yüzden polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) esaslı moleküler yöntemler antibiyotik direnç genlerinin belirlenmesinde sıklıkla tercih edilmektedir[8]. Bu çalışmada, Kahramanmaraş'ta Sağlık Uygulama ve Araştırma Hastanesine gelen hastaların çeşitli klinik örneklerinden elde edilen *S. aureus* izolatlarında antibiyotik duyarlılık paternleri ile antibiyotik direnç genleri (*mecA, dfrA, ermA, ermB, ermC, msrA, gyrA, gyrB vatA, vatB* ve *vatC*) arasındaki ilişkinin moleküler olarak araştırılması amaçlanmıştır.

MATERYAL ve METOD

Çalışma Ocak 2015-Eylül 2015 tarihleri arasında Tıbbi Mikrobiyoloji ve Üniversite-Sanayi-Kamu İşbirliği Geliştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi Mikrobiyal Genetik Laboratuvarlarında yürütülmüştür. Stafilokok izolatları yara (%53), kan (%20), burun (%9), balgam (%7), idrar (%7), boğaz (%3) ve beyin omurilik sıvısı (%1)'ndan izole edilmiştir.

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 izolatlara yapılan DNase testleriyle ve BD Phoenix tam otomotize sistem ile yapılmıştır. *S. aureus* olduğu saptanan tüm izolatlar çalışma yapılıncaya 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 mm 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 dH_2O, 1'er µL ileri ve geri primerlerden, 3 µL buffer (10X), 1 µL dNTP, 0.5 µL Taq DNA polimeraz (5 U/mL) karıştırılarak hazırlanmıştır. Önceki çalışmalara dayanarak belirlediğimiz primerlerin özellikleri Tablo 1'de verilmiştir. Kalıp DNA olarak 10 µL ddH_2O'da çözdürülen koloniden 1 µL kullanılmıştır. PCR işlemi tek döngü 94°C'de 5 dakika ön denatürasyon ile başlatılmış daha sonra 30 döngü olmak üzere 94°C'de 30 saniye denatürasyon, primerler için uygun yapışma sıcaklığı (*mecA* 50°C, *dfrA* 52°C, *ermA* 53°C, *ermB* 55°C, *ermC* 57°C, *vatA* 53°C, *vatB* 55°C, *vatC* 53°C, *gyrA* 57°C ve *gyrB* 57°C) 30 saniye ve 72°C'de 45 saniye uzama, son uzama ise 72°C'de 10 dakika olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. PCR ile çoğal-

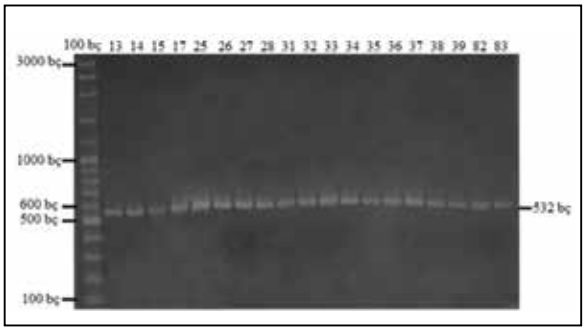
Tablo 1. Çalışmada kullanılan primerlerin özellikleri

Gen	Primer	Oligonükleotid (5′ → 3′)	Amplifikasyon (bç)	Kaynak
mecA	*mecA*F	AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC	532	[10]
	*mecA*R	AGTTCTGCAGTACCGGATTTG C		
dfrA	*dfrA*F	TTCCCTTTTCTACGCACTA	420	[11]
	*dfrA*R	AATTACCTTGGCACTTACC		
ermA	*ermA*F	AAGCGGTAAACCCCTCTGA	190	[10]
	*ermA*R	TTCGCAAATCCCTTCTCAAC		
ermB	*ermB*F	CTATCTGATTGTTGAAGAAGGATT	142	[12]
	*ermB*R	GTTTACTCTTGGTTTAGGATGAAA		
ermC	*ermC*F	AATCGTCAATTCCTGCATGT	299	[10]
	*ermC*R	TAATCGTGGAATACGGGTTTG		
msrA	*msrA*F	TCCAATCATTGCACAAAATC	163	[12]
	*msrA*R	AATTCCCTCTATTTGGTGGT		
vatA	*vatA*F	TGGTCCCGGAACAACATTTAT	268	[10]
	*vatA*R	TCCACCGACAATAGAATAGGG		
vatB	*vatB*F	GCTGCGAATTCAGTTGTTACA	136	[10]
	*vatB*R	CTGACCAATCCCACCATTTTA		
vatC	*vatC*F	AAGGCCCCAATCCAGAAGAA	467	[10]
	*vatC*R	TCAACGTTCTTTGTCACAACC		
gyrA	*gyrA*F	AATGAACAAGGTATGACACC	223	[13]
	*gyrA*R	TACGCGCTTCAGTATAACGC		
gyrB	*gyrB*F	CAGCGTTAGATGTAGCAAGC	249	[13]
	*gyrB*R	CCGATTCCTGTACCAAATGC		

tılan örnekler %1'lik jel hazırlanarak elektroforeze yüklenmiş, etidyum bromid (0.5 µg/mL TAE) ile boyanmış DNA amplikonları ultraviyole ışığında görüntülenmiştir. Tüm çalışmada pozitif ve negatif kontroller kullanılmıştır.

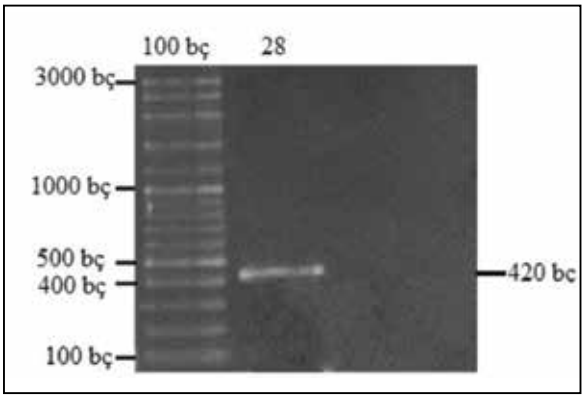
BULGULAR

Yüz *S. aureus* izolatı arasındaki metisiline direnç oranı hem disk difüzyon hem de Phoenix otomatize sistem ile %19 idi ve bu izolatların hepsi de 532 bç uzunluğundaki *mecA* genini taşıyordu (Şekil 1). Trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SMZ) (*dfrA*) direnci her iki yöntemde de izolatların %1'inde bulunmuştur (Şekil 2). Fenotipik olarak eritromisin direnci %26 olarak tespit edilirken, izolatların %6'sının hem 190 bç uzunluğundaki *ermA* hem de 299 bç uzunluğundaki *ermC* genini birlikte taşıdığı, %22'sinin ise sadece *ermC* genini taşımakta olduğu tespit edilmiştir (Şekil 3,4). Ayrıca

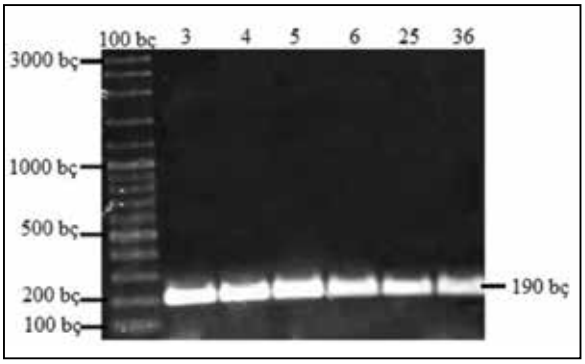


Şekil 1. 13-15, 17, 25-28, 31-39, 82, 83 nolu izolatların PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen *mecA* geni agaroz jel görüntüsü. M: 100 bç DNA standardı.

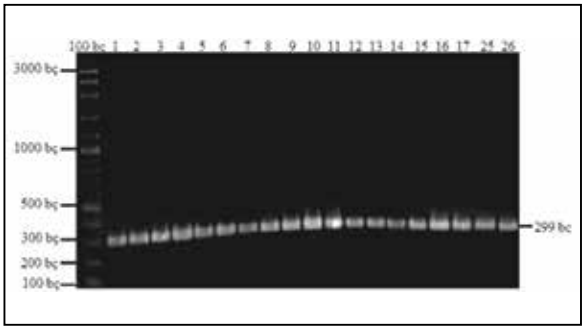
fenotipik yöntemle tespit edilemeyen bir izolatta PCR ile *ermC* geni olduğu bulunmuştur. Fenotipik yöntemle tespit edilen bir izolat ise PCR ile tespit edilememiştir. Hiçbir izolatta *ermB* ve *msrA* genleri tespit edilememiştir. Kinupristin-dalfopristin



Şekil 2. 28 nolu izolatın PCR amplifikasyonu ile elde edilen *dfrA* geni agaroz jel görüntüsü. M: 100 bç DNA standardı.

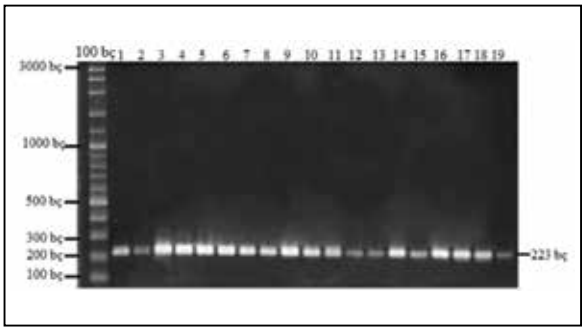


Şekil 3. 3-6, 25, 36 nolu izolatların PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen *ermA* geni agaroz jel görüntüsü. M: 100 bç DNA standardı.

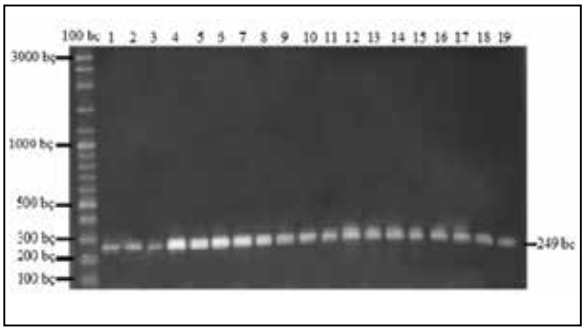


Şekil 4. 1-17. ve 25, 26. izolatların PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen *ermC* geni agaroz jel görüntüsü. M: 100 bç DNA standardı

(*vatA*, *vatB*, *vatC*) her iki yöntemde de tespit edilememiştir. Siprofloksasin direnci fenotipik olarak izolatların %6'sında tespit edilirken genotipik olarak hem 223 bç uzunluğundaki *gyrA* hem de 249 bç uzunluğundaki *gyrB* izolatların %100'ünde tespit edilmiştir (Şekil 5,6).



Şekil 5. 1-19. izolatların PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen *gyrA* geni agaroz jel görüntüsü. M: 100 bç DNA standardı.



Şekil 6. 1-19. izolatların PCR ile çoğaltılması sonucu elde edilen *gyrB* geni agaroz jel görüntüsü. M: 100 bç DNA standardı.

TARTIŞMA

Çalışmamızda *S. aureus* izolatlarında Phoenix otomatize yöntem ile elde edilen antibiyotik duyarlılığının sonuçları gen analiz sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır.

S. aureus antimikrobiyal duyarlılık testi metisilin için disk difüzyonu, metisilin dahil tüm izolatlar için ise Phoenix otomatize sistem ile gerçekleştirilmiştir. Antibiyotik duyarlılık testi sonuçları, yaygın olarak kullanılan antimikrobik maddelerin çoğuna stafilokokal izolatlar arasında çeşitli oranlarda direnç olduğunu göstermiştir.

Stafilokoklarda metisilin direncinin, PBP2a varlığı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu PBP2a ise *mecA* geni tarafından kodlanır. *mecA* geni heterojen olarak eksprese edilebildiği için tüm metisiline dirençli stafilokok suşları fenotipik yöntemlerle saptanmayabilmektedir. Bu yüzden *mecA* geninin saptanması için kullanılan PCR tekniği konvansiyonel yöntemlerle karşılaştırıldığında hem daha hızlı hem de güvenilir olan bir altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir[14].

Çalışmamızda metisilin disk difüzyon ve Phoenix yöntemleriyle test edildiğinde metisiline direnç %19 idi ve bu izolatların hepsi de *mecA* genine sahipti. Çalışmamızda konvansiyonel yöntemle PCR testinin karşılaştırılması iyi bir uyum göstermiştir. Aynı şekilde çalışmalarında fenotipik ve genotipik yöntem arasında iyi bir uyum bulan çalışmalar bulunmaktadır[15]. Fakat fenotipik ve genotipik yöntem arasında farklılıklar olan çalışmalar da bulunmaktadır[16,17]. Araştırmacılar bu farklılıklara geleneksel testlerin inokülum miktarının, kuluçka süresinin, ortamın pH ve tuz konsantrasyonu gibi durumların neden olabileceğini belirtmişlerdir[16].

S. aureus izolatlarında TMP-SMZ direnç geni olan *dfrA*'nın varlığı, konvansiyonel PCR ile analiz edildiğinde sadece bir izolatta *dfrA* geni tespit edilmiştir. Hem fenotipik hem de genotipik yöntemle yapılan çalışmamızın sonuçları uyum göstermiştir.

Çalışmaların sonucunda genellikle *dfrA* geni düşük düzeylerde tespit edilmiştir[18,19]. Yapılan bir çalışmada iki yeni *dfrA* direnç geni mutasyonu belirlenmiştir. Bu durumun da trimetoprim duyarlılığında azalmaya neden olduğu fakat trimetoprim direnç mutasyon frekanslarının nispeten düşük olduğu bildirilmiştir[3].

Stafilokoktaki eritromisin direnci *erm* genleri tarafından kodlanır[4]. Çalışmamızda fenotipik yöntemlerle eritromisine dirençli olduğu tespit edilen 26 izolatın hepsi en az bir eritromisin direnç geni içeriyordu. Yani eritromisine dirençli izolatların %6'sı hem *ermA* hem de *ermC* genini birlikte taşırken, %22'sinin sadece *ermC* genini taşımakta olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca fenotipik yöntemle tespit edilemeyen bir izolatta PCR ile *ermC* geni olduğu tespit edilmiştir. Fenotipik yöntemle tespit edilen bir izolat ise PCR ile tespit edilememiştir. Hiçbir izolatta *ermB* ve *msrA* genleri tespit edilememiştir.

Benzer şekilde yapılan bir çalışmada eritromisine dirençli fakat PCR sonucuna göre *ermA*, *ermB*, *ermC* ve *msrA* negatif olan iki izolat tespit edilmiştir. Bu direncin, henüz stafilokoklarda karakterize edilmeyen yeni bir mekanizma ile ilişkili olduğu varsayımıştır[12]. Başka bir çalışmada eritromisine dirençli, fakat PCR ile tespit edilen bir eritromisin direnç genine sahip olmayan izolat belirlenmiştir. Araştırmacılar bu duruma zaman zaman kaybolan küçük plazmidlerdeki genlerin konumunun neden olduğunu belirtmişlerdir[20]. Fenotipik eritromisin duyarlılığı ve *erm* genleri arasında uyumsuzluk bulan bir çalışmada bu uyumsuzluğun, genlerin kodlama veya promotor bölgesindeki bir mutasyona bağlı olabileceği ifade edilmiştir[21].

Çalışmamızda kullandığımız izolatların çoğu *ermC* geni taşımaktadır. Bizim çalışmamızın aksine birçok çalışma raporunda en sık genetik belirleyici olarak *ermA* geni tespit edilmiştir[4,10,12-22]. Fakat çalışmamız, en fazla *ermC* geni olduğunu gösteren diğer çalışmalarla uyumluluk göstermektedir[23,24].

Kinupristin-dalfopristin, her iki bileşen de ribozomların 50S alt birimlerine geri dönüşümsüz olarak bağlanıp bakteriyel protein sentezini inhibe ederek etki gösterir. Streptogramin A antibiyotiklerinin direnç mekanizması antibiyotiği inaktive eden asetiltransferazları kodlayan *vatA*, *vatB* ve *vatC* genlerini içerir. Kinupristin-dalfopristin dirençli hayvan stafilokok izolatlarında yaygındır[24].

Yaptığımız bu çalışmada izolatların hiçbirinde fenotipik olarak kinupristin-dalfopristin direncine, genotipik olarak ise *vatA*, *vatB* ve *vatC* genlerine rastlanılmamıştır. Yapılan çeşitli çalışmalarda da bu antibiyotiğe karşı yüksek oranda direnç genlerine rastlanılmamıştır[24,25].

Florokinolonlar geniş spektrumlu, yaygın olarak kullanılan güçlü antimikrobiyal ajanlardır. Bu ajanların kapsamlı klinik kullanımı, dirençli organizmaların artışına yol açmıştır. Çeşitli çalışmalarda metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) izolatlarında florokinolon direncinin yüksek olduğu bildirilmiştir[26,27]. *S. aureus*'da florokinolon direnci 1983 yılında %0, 1986 yılında %0.5, 1989 yılında %6.6, 1990 yılında ise %6.8 olarak bildirilmiştir. On iki Avrupa ülkesinden 78 laboratuvarla işbirliği içinde yürütülen bir çalışma, florokinolonlara direnç prevalansında büyük farklılıklar ortaya çıkarmıştır ve en yüksek direnç oranları %70.6 olarak MRSA'larda kaydedilmiştir[28]. Klinik örneklerden Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile florokinolon direncini araştıran bir çalışmada MRSA izolatlarında siprofloksasin direnci %92.5 olarak bildirilmiştir[29].

Aminoasidin kimyasal özelliğinin değişimine neden olan *gyrA* mutasyonlarının, çoğunlukla MRSA klinik izolatlarında üst düzey direnç kazanılmasına katkıda bulunduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır[30]. Çalıştıkları MRSA izolatlarında *grlA* ve *gyrA* genlerindeki mutasyon oranını %96 olarak gösteren bir çalışma da bulunmaktadır[31].

Biz çalışmamızda DNA giraz ürünü olan *gyrA* ve *gyrB* genlerini moleküler olarak çalıştık. Fenotipik olarak yaptığımız çalışma sonucunda florokinolon direnci %6 olmasına rağmen, moleküler olarak yaptığımız çalışma sonucunda ise izolatların tamamının 223 bç'lik *gyrA* ve 249 bç'lik *gyrB* genlerini taşıdığını tespit ettik. Bu antibiyotiğe tüm izolatların direnç göstermesi, literatürde de belirtildiği gibi *gyrA* ve *gyrB* genlerindeki mutasyonlardan kaynaklanmış olabilir. Aynı zamanda fenotipik olarak direnç ifadesinin olmama nedeni kromozom üzerinde direnç geni bulunduğu için PCR amplifikasyonları çalışmaktadır. Ancak gen olduğu halde mRNA sentezlemiyorsa protein sentezlenmeyecek ve direnç oluşmayacaktır.

Bu çalışma, *S. aureus* infeksiyonları ile ilişkili antibiyotik direnç genlerinin belirlenmesi için PCR yönteminin kullanılmasının faydalı olduğunu göstermiştir. PCR testi, antibiyotik direnç profillerinin hızlı, basit ve doğru bir şekilde tanımlanmasını sağlar ve epidemiyolojik araştırmalarda antibiyotik direnci belirleyicilerinin yayılmasının ve gözleminin yanı sıra klinik tanıda da kullanılabilir. Bu yüzden klasik yöntemler ve PCR gibi moleküler yaklaşımlar birlikte kullanıldığında daha etkili olabilir ve daha doğru ve güvenilir bilgiler sağlayabilir.

KAYNAKLAR

1. *Kong C, Neoh H, Nathan S. Targeting Staphylococcus aureus toxins: a potential form of anti-virulence therapy. Toxins (Basel) 2016;8:72.*
2. *Raeisi J, Saifi M, Pourshafie MR, Karam MRA, Mohajerani HR. Rapid detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates by turanose fermentation method. Jundishapur J Microbiol 2015;8:e21198.*
3. *Vickers AA, Potter NJ, Fishwick CWG, Chopra I, O'Neill, AJ. Analysis of mutational resistance to trimethoprim in Staphylococcus aureus by genetic and structural modelling techniques. J Antimicrob Chemother 2009;63:1112-7.*
4. *Otsuka T, Zaraket H, Takano T, Saito K, Dohmae S, Higuchi W, et al. Macrolide–lincosamide–streptogramin B resistance phenotypes and genotypes among Staphylococcus aureus clinical isolates in Japan. Clin Microbiol Infect 2007;13:325-7.*
5. *Jensen SO, Lyon BR. Genetics of antimicrobial resistance in Staphylococcus aureus. Future Microbiol 2009;4:565-82.*
6. *Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of Staphylococcus aureus. J Clin Invest 2003;111:1265-73.*
7. *Campion JJ, McNamara PJ, Evans ME. Evolution of ciprofloxacin-resistant Staphylococcus aureus in in vitro pharmacokinetic environments. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:4733-44.*
8. *Barski P, Piechowicz L, Galiski J, Kur J. Rapid assay for detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus using multiplex PCR. Mol Cell Probes 1996;10:471-5.*
9. *CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-fifth informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 2015;35:M100-S25.*
10. *Strommenger B, Kettlitz C, Werner G, Witte W. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in Staphylococcus aureus. J Clin Microbiol 2003;41:4089-94.*
11. *McDougal LK, Fosheim GE, Nicholson A, Bulens SN, Limbago BM, Shearer JE, et al. Emergence of resistance among USA300 methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates causing invasive disease in the United States. Antimicrob Agents Chemother 2010;54:3804-11.*
12. *Martineau F, Picard FJ, Lansac N, Ménard C, Roy PH, Ouellette M, et al. Correlation between the resistance genotype determined by multiplex PCR assays and the antibiotic susceptibility patterns of Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis. Antimicrob Agents Chemother 2000;44:231-8.*
13. *Schmitz FJ, Jones ME, Hofmann B, Hansen B, Scheuring S, Lückefahr M, et al. Characterization of grlA, grlB, gyrA, and gyrB mutations in 116 unrelated isolates of Staphylococcus aureus and effects of mutations on ciprofloxacin MIC. Antimicrob Agents Chemother 1998;42:1249-52.*
14. *Choi SM, Kim SH, Kim HJ, Lee DG, Choi JH, Yoo JH, et al. Multiplex PCR for the detection of genes encoding aminoglycoside modifying enzymes and methicillin resistance among Staphylococcus species. J Korean Med Sci 2003;18:631-6.*
15. *Ekrami A, Samarbafzadeh A, Alavi M, Kalantar E, Hamzeloi F. Prevalence of methicillin resistant Staphylococcus species isolated from burn patients in a burn center, Ahvaz, Iran. Undishapur J Microbiol 2010;3:84-91.*
16. *Pillai MM, Latha R, Sarkar G. Detection of methicillin resistance in Staphylococcus aureus by polymerase chain reaction and conventional methods: a comparative study. J Lab Physicians 2012;4:83-8.*
17. *Zmantar T, Bekir K, Elgarsadi SI, Hadad O, Bakhrouf A. Molecular investigation of antibiotic resistance genes in methicillin resistant Staphylococcus aureus isolated from nasal cavity in pediatric service. Afr J Microbiol Res 2013;7:4414-21.*
18. *Nurjadi D, Schäfer J, Friedrich-Jänicke B, Mueller A, Neumayr A, Calvo-Cano A, et al. Predominance of dfrG as determinant*

of trimethoprim resistance in imported Staphylococcus aureus. Clin Microbiol Infect 2015;21:1095.e5-9.

19. *Masoud-Landgraf L, Johler S, Badura A, Feierl G, Luxner J, Wagner-Eibel U. Genetic and phenotypic characteristics of Staphylococcus aureus isolates from cystic fibrosis patients in Austria. Respiration 2015;89:390-5.*
20. *Sun DD, Ma XX, Hu J, Tian Y, Pang L, Shang H, et al. Epidemiological and molecular characterization of community and hospital acquired Staphylococcus aureus strains prevailing in Shenyang, Northeastern China. Braz J Infect Dis 2013;17:682-90.*
21. *Sekiguchi J, Hama T, Fujino T, Araake M, Irie A, Saruta K. Detection of the antiseptic-and disinfectant-resistance genes qacA, qacB, and qacC in methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolated in a Tokyo hospital. Jpn J Infect Dis 2004;57:288-91.*
22. *Duran N, Ozer B, Duran GG, Onlen Y, Demir C. Antibiotic resistance genes&susceptibility patterns in staphylococci. Indian J Med Res 2012;135:389-96.*
23. *Spiliopoulou I, Petinaki E, Papandreou P, Dimitracopoulos G. erm(C) is the predominant genetic determinant for the expression of resistance to macrolides among methicillin-resistant Staphylococcus aureus clinical isolates in Greece. J Antimicrob Chemother 2004;53;814-7.*
24. *Adwan G, Adwan K, Jarrar N, Amleh A. Molecular detection of nine antibiotic resistance genes in methicillin resistant Staphylococcus aureus isolates. Roum Arch Microbiol Immunol 2014;73:9-18.*
25. *Momtaz H, Hafezi L. Meticillin-resistant Staphylococcus aureus isolated from Iranian hospitals: virulence factors and antibiotic resistance properties. Bosn J Basic Med Sci 2014;14:219-26.*
26. *Blumberg HM, Rimland D, Carroll DJ, Terry P, Wachsmuth IK. Rapid development of ciprofloxacin resistance in methicillin-susceptible and resistant Staphylococcus aureus. J Infect Dis 1991;163:1279-85.*
27. *Goldstein FW, Acar JF. Epidemiology of quinolone resistance: Europe and North and South America. Drugs 1995;49:36-42.*
28. *Kresken M, Hafner D, Mittermayer H, Verbist L, Bergogne-Bérézin E, Giamarellou H, et al. Prevalence of fluoroquinolone resistance in Europe. Study Group 'Bacterial Resistance' of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy e. V. Infection 1994;(Suppl 2):S90-8.*
29. *Gade ND, Qazi MS. Fluoroquinolone therapy in Staphylococcus aureus infections: Where do we stand? J Lab Physicians 2013;5:109-12.*
30. *Takahata, M, Yonezawa M, Kurose S, Futakuchi N, Matsubara N, Watanabe Y, et al. Mutations in the gyrA and grlA genes of quinolone-resistant clinical isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. J Antimicrob Chemother 1996;38:543-6.*

31 *Coskun-Ari FF, Bosgelmez-Tinaz G. grlA and gyrA mutations and antimicrobial susceptibility in clinical isolates of ciprofloxacin-methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Eur J Med Res 2008;13:366-70.*

Yazışma Adresi/Address for Correspondence

Dr. Zerife ORHAN

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi
Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu
Sağlık Bakım Hizmetleri Bölümü
Kahramanmaraş-Türkiye

E-posta: zarife70@hotmail.com