

NOZOKOMİYAL KÖKENLİ METİSİLİNE DİRENÇLİ *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* İZOLATLARINDA MUPIROSİN DİRENCİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI*

INVESTIGATION OF MUPIROCIN RESISTANCE IN NOSOCOMIAL METHICILLIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ISOLATES BY PHENOTYPIC AND GENOTYPIC METHODS

Tercan US¹, Mehmet KURAL¹, Buket YAYLA¹, Abdurrahman KİREMİTÇİ¹,
Esin ÇETİN¹, Yurdanur AKGÜN¹

¹ Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Eskişehir.
(tercanus@ogu.edu.tr)

ÖZET

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)'un hastane enfeksiyonlarının mortalite ve morbiditesi yüksek en sık rastlanan etkenlerinin başında yer alması, klinisyenleri MRSA kolonizasyonunu ortadan kaldırmaya yönelik topikal mupirosin kullanımına yönlendirmiştir. Ancak son zamanlarda MRSA izolatları arasında mupirosin direnci bildirilmeye başlanmıştır. Bu çalışmada, nozokomiyal kökenli 595 MRSA izolatında fenotipik ve genotipik yöntemlerle mupirosin direncinin araştırılması amaçlanmıştır. İzolatların 35 (%5.9)'ünde disk difüzyon ve E-test yöntemlerinin her ikisi ile de mupirosin direnci gösterilmiştir. E-test yöntemiyle mupirosine dirençli suşların %65.8 (23/35)'inde yüksek düzeyde, %34.2 (12/35)'inde ise düşük düzeyde direnç saptanmıştır. Fenotipik olarak mupirosin direnci saptanan 35 MRSA izolatının genotipik olarak doğrulanmasında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılmış ve tümünde *mecA* ve *mupA* gen varlığı gösterilmiştir. Mupirosine dirençli MRSA suşları ile yapılan plazmid analizi sonucunda, E-test ile yüksek düzeyde mupirosin direnci saptanan 23 izolatın hepsinde 38 kilobazlık plazmid saptanırken, düşük düzeyde dirençli olan 12 izolatın hiçbirisinde bu plazmid gözlenmemiştir. Mupirosine dirençli 35 MRSA izolatının 32'si "pulsed field gel electrophoresis (PFGE)" yöntemi ile genotiplendirilmiş ve Tenover kriterlerine göre, PFGE uygulanan izolatların 24'ünün identik (genotip A), 8'inin ise yakın ilişkili (genotip A1) olduğu görülmüştür. Bu sonuçlara göre, hastanemizde izole edilen mupirosine dirençli MRSA suşlarının aynı genotip ya da bu genotip ile yakın ilişkili kökenler olduğu düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Mupirosin direnci, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, plazmid profil analizi, pulsed field gel electrophoresis, genotiplendirme.

* Bu çalışma, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Araştırma Projeleri Komisyon Başkanlığına 200211051 ve 200511006 numaralı iki proje ile desteklenmiştir.

ABSTRACT

Since methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has become one of the most prevalent nosocomial pathogens and a frequent cause of mortality and morbidity, there is an increasing tendency to use topical mupirocin for eradication of MRSA carriage. However, there have been recent reports of resistance against mupirocin among MRSA isolates. This study was conducted to investigate the presence of mupirocin resistance in a population of 595 nosocomial MRSA isolates by phenotypic and genotypic methods. In 35 (5.9%) of 595 isolates, mupirocin resistance was detected by disc diffusion and E-test methods. High-level mupirocin resistance was detected in 23 (65.8%) isolates and low-level mupirocin resistance in 12 (34.2%) isolates by E-test method. The molecular analysis of 35 mupirocin resistant MRSA isolates showed the presence of both *mecA* and *mupA* genes by polymerase chain reaction. While in 23 high-level mupirocin resistant MRSA isolates a 38 kb plasmid was detected, none of the low-level mupirocin-resistant MRSA isolates revealed the presence of this plasmid. Thirty-two of 35 mupirocin resistant MRSA isolates were genotyped with pulsed-field gel electrophoresis and 24 isolates were typed as identical (genotype A) and 8 as genetically-related (genotype A1), according to Tenover criteria. These data revealed that mupirocin resistant MRSA isolates in our hospital were of the same genotype or closely related.

Key words: Mupirocin resistance, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, plasmid profile analysis, pulsed field gel electrophoresis, genotyping.

GİRİŞ

Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), hastane enfeksiyonlarının en önemli morbidite ve mortalite nedenleri arasında ilk sıralarda yer almaktadır¹. Çoklu ilaç dirençli olan MRSA izolatlarının neden olduğu enfeksiyonların tedavisinin zor ve maliyetinin yüksek olmasından dolayı MRSA yayılımının kontrolü, hastane enfeksiyon kontrol programlarının en önemli hedefleri arasında yer almaktadır.

Önemli bir nozokomiyal enfeksiyon etkeni olan MRSA'nın en sık rastlanan etkenler arasında yer alması, klinisyenleri MRSA kolonizasyonunu ortadan kaldırmaya yönelik topikal mupirosin kullanımına yönlendirmiştir². Bunu takiben son zamanlarda MRSA izolatları arasında, dünya genelinde %0.3-16.6 arasında değişen oranlarda mupirosin direnci bildirilmeye başlanmıştır^{1,3}. Yaygın mupirosin kullanımının bu direnç gelişiminde etkin rol oynadığı düşünülmektedir. *Pseudomonas fluorescens*'ten elde edilen bakteriyostatik etkili topikal bir antibiyotik olan mupirosine karşı stafilokoklarda şimdiye kadar iki farklı direnç mekanizması gösterilmiştir. Düşük seviyedeki mupirosin direncinden, isolö-sil transfer-RNA sentetaz (ItRs)'ı kodlayan *ileS-2* geninin mutasyonu sonucu oluşan kromozomal *mupA* geni, yüksek seviyedeki dirençten ise plazmid kaynaklı *mupA* geni sorumludur^{4,5}.

Mupirosin direncinin saptanmasında fenotipik (disk difüzyon testi, E-test, mikrodilüsyon testi) ve genotipik yöntemler [polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), plazmid profil analizi, "pulsed field gel electrophoresis (PFGE)"] kullanılmaktadır. Fenotipik tiplendirme sonuçlarının genotipik yöntemlerle desteklenmesi, farklı kaynaklardan izole edilen suşların yakınlığının belirlenmesine, olası bir salgının araştırılmasına ve nozokomiyal yayılımın değerlendirilmesine olanak sağlayan en önemli epidemiyolojik yaklaşımdır⁶⁻⁸.

Bu araştırmanın amacı, nozokomiyal kökenli MRSA izolatlarında fenotipik ve genotipik yöntemlerle mupirosin direncinin görülme oranının saptanması, direnç kaynağının belirlenmesi ve izolatların PFGE ile genotiplendirilmesidir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Haziran 2002-Şubat 2004 tarihleri arasında Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Eğitim Hastanesinin çeşitli kliniklerinde yatarak tedavi gören hastalardan nozokomiyal enfeksiyon etkeni olarak izole edilen 595 MRSA suşu dahil edildi. Klinik mikrobiyoloji anabilim dalı laboratuvarlarında yapılan bu çalışmada, suşların tanımlanması standart mikrobiyolojik yöntemlerle gerçekleştirildi.

Metisilin direnci disk difüzyon yöntemiyle saptandı ve sonuçlar PCR ile *mecA* direnç gen varlığı gösterilerek doğrulandı. Bu amaçla DNA ekstraksiyonu, 1/100 steril distile suyla hazırlanan bakteri süspansiyonlarının 95°C'de 10 dakika bekletilmesiyle yapıldı. *MecA* geninin 460 baz çift (bç)'lik kısmı MRS1 ve MRS2 primerleri kullanılarak PCR ile çoğaltıldı¹. PCR ürünü, etidyum bromürlü %2'lik agaroz jelde yürütülerek ultraviyole (UV) transillüminatörde görüntüldü.

MRSA suşlarında fenotipik mupirosin direnci, 5 mg'lık mupirosin diski (Oxoid) kullanılarak Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi ve E-test (AB Biodisk, İsveç) ile araştırıldı. "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" kriterlerine göre disk difüzyon testinin değerlendirilmesinde 14 mm ve üzerindeki zon çapı mupirosine duyarlı, bunun altındaki değerler ise dirençli olarak kabul edildi⁶. E-testle ise, mupirosin minimum inhibitör konsantrasyonu (MIK) değeri < 4 µg/ml değerler duyarlı, 8-256 µg/ml arasındaki değerler düşük düzeyde dirençli (MuL) ve ≥ 512 µg/ml olan değerler yüksek düzeyde dirençli (MuH) olarak kabul edildi².

Fenotipik olarak mupirosin direnci belirlenen suşlarda *mupA* direnç geni, Udo ve arkadaşlarının⁹ uyguladıkları PCR yöntemiyle araştırıldı. Bu amaçla 95°C'de 10 dakika bekletilerek yapılan DNA ekstraksiyonundan sonra, *mupA* ve *mupB* primerleri ile amplifikasyon yapıldı ve sonuçta elde edilen 456 bç'lik ürün 0.5 µg/ml etidyum bromürlü %2'lik agaroz jelde yürütülerek UV transillüminatörde görüntüldü. Fenotipik yöntemlerle mupirosine duyarlı bulunan izolatlarda suş sayısının fazla olması nedeniyle, *mupA* direnç geni araştırılmadı.

Plazmid profil analizi için, Udo ve arkadaşlarının⁹ tanımladıkları plazmid DNA izolasyon yöntemi uygulandı. Elde edilen tüm ürünler 0.5 µg/ml etidyum bromür içeren %0.7'lik agaroz jele yüklenerek 90 V'da 3 saatlik elektroforez işlemi sonrasında UV ışık altında transillüminatörde görüntüldü ve "Gel Doc" görüntüleme sistemi yardımıyla bilgisayar ortamına aktarıldı.

PFGE yöntemi için kromozomal DNA izolasyonu, Chung ve arkadaşlarının¹⁰ tanımladıkları yöntem modifiye edilerek uygulandı. Saklama sırasında 35 MRSA suşunun üçü teknik nedenlerden dolayı kontamine olduğu için çalışma dışı bırakıldı; dolayısıyla 32 MRSA suşuna PFGE işlemi uygulandı. Mueller-Hinton agarda saf kültür halinde üreyen suşlardan birkaç koloni triptik soy buyyon (TSB) besiyerine ekilerek, bir gece çalkalama-

İnkübatörde 200/dakika olacak şekilde 37°C'de inkübe edildi. TSB bakteri süspansiyonunun 1000 µl'si 7000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilerek elde edilen bakteri pelleti, bir kez 1000 µl PIV (10 Mm Tris HCL pH: 8.0, 1 M NaCl) solüsyonu ile yıkandıktan sonra 7000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Pellet 400 µl PIV solüsyonu ile süspansiyon edildi, süspansiyonun 10 µl'si içinde 2 ml PIV bulunan tek kullanımlık spektrofotometre küvetine konarak 620 nm dalga boyunda optik dansitesi ölçüldü ve tüm bakteri süspansiyonlarının optik dansiteleri eşitlendi. Standart bakteri süspansiyonlarının 300 µl'si 50°C'de tutularak dengelenen %1.5'lik "low melting point" agaroz ile eşit hacimde karıştırılarak süspansiyon edildi. Elde edilen süspansiyon kalıplara (10 x 5 x 1 mm) dökülerek "plug" adı verilen bloklar oluşturuldu. Kalıplar 20 dakika buzdolabında bekletilerek donması sağlandıktan sonra 1 ml EC-lizis solüsyonu (6 Mm Tris HCl pH: 8.0, 1 M NaCl, 100 Mm EDTA pH: 8.0, %0.2 sodyum deoksikolat, %0.5 sodyum lauril sarkozin, 100 µg/ml lizostafin, 100 µg/ml lizozim, 50 µg/ml ribonükleaz) içeren 1.5 ml'lik konik santrifüj tüplerine alınarak 5 saat 37°C'de inkübe edildi. Tüplerdeki EC-lizis solüsyonları çekilerek yerine 1 ml ESP solüsyonu (0.5 M EDTA pH: 9.0, %1 sodyum lauril sarkozin, 2 mg/ml proteinaz K) eklendi ve 50°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. "Plug"lar 1xTE (10Mm Tris, 1 mM EDTA pH: 7.5) tamponuyla 4 kez yıkandı. Bloklar, TE tamponu içerisine alınarak enzimle kesim işlemine kadar +4°C'de saklandı.

Restriksiyon enzim kesimi amacıyla, her bir DNA bloğu, 400 µl *SmaI* enzim tamponu içeren 1.5 ml'lik konik plastik santrifüj tüplerine konarak yarım saat oda ısısında bekletildi. Daha sonra bu tampon boşaltılarak yerine 30 IU *SmaI* enzimi ve 300 µl 1x ticari enzim tamponu konularak, bloklar 37°C'de bir gece inkübe edildi. Inkübasyon bitiminde 20 ml 1xTE tamponu ile bir kez yıkandı.

Restriksiyon enzim kesimi tamamlanan DNA blokları 0.5xTBE tamponuyla hazırlanmış %1'lik "pulsed field certified" agaroz jeldeki kuyucuklara yerleştirildi. İlk, orta ve son kuyucuklara "lambda leader" içeren PFGE ölçü birimi konuldu. Elektroforez işlemi CHEFDR III PFGE cihazıyla 0.5xTBE tamponu kullanılarak 14°C'de 6 V/cm, 20 saat süreyle, başlangıç değişim zamanı 5.3 saniye ve bitiş değişim zamanı 34.9 saniye olacak şekilde gerçekleştirildi. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel 0.5 µl/ml etidyum bromür içeren 250 ml 0.5xTBE tamponu içinde 30 dakika süreyle boyandı ve daha sonra 30 dakika süreyle distile su ile yıkandı. Band görüntüleri UV ışık altında değerlendirilerek, bilgisayar ortamına aktarıldı. "Quantity One" isimli yazılım ile görüntü analizi yapıldı. Yorumlama işlemi Tenover kriterlerine göre gerçekleştirildi¹¹.

BULGULAR

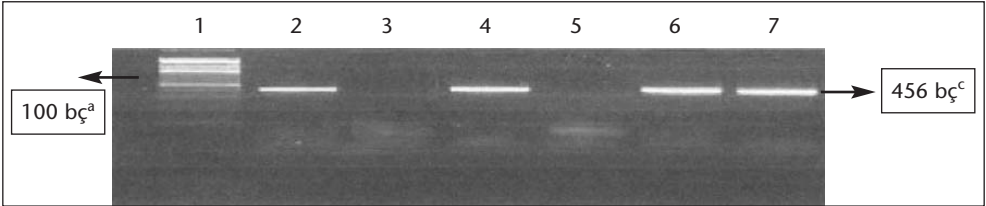
Çalışmada, disk difüzyon ve E-test yöntemleriyle test edilen 595 MRSA izolatının 35 (%5.9)'ünde her iki yöntemle de mupirosin direnci saptanmıştır. E-test ile mupirosine dirençli suşların %34.2 (12/35)'sinde düşük (MİK= 12-256 µg/ml), %65.8 (23/35)'inde ise yüksek (MİK > 1024 µg/ml) düzeyde direnç belirlenmiştir. E-test ile düşük ve yüksek mupirosin direnci saptanan izolatlarda, disk difüzyon yöntemiyle elde edilen zon çapları arasında fark görülmemiştir.

Mupirosin direnci saptanan MRSA suşlarının 23 (%65.7)'ü yara yerinden, 5 (%14.3)'i kandan, 3 (%8.6)'ü alt solunum yolundan (ASY), 2 (%5.7)'si kateterden ve 1 (%2.9)'i periton sıvısından izole edilmiştir.

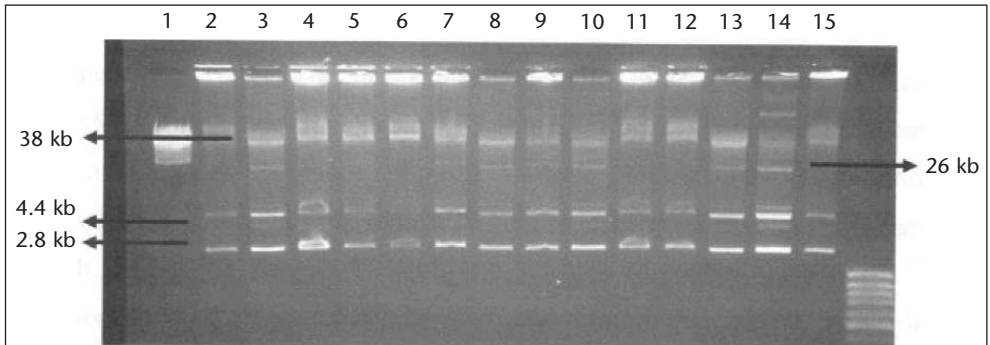
Mupirosine fenotipik olarak dirençli bulunan 35 MRSA suşunda *mecA* ve *mupA* direnç genleri PCR ile araştırılmış ve tüm izolatlarda *mecA* ve *mupA* geni saptanmıştır (Resim 1).

Plazmid profil analizi ile büyüklükleri 2.8 ile 38 kilobaz (kb) arasında değişen dört farklı plazmid (2.8, 4.4, 26, 38 kb) bulunmuş ve MuH saptanan 23 izolatın hepsinde 38 kb'lık plazmid saptanırken, MuL olan 12 izolatın hiçbirinde bu plazmidin olmadığı görülmüştür (Resim 2). Tüm izolatların E-test sonuçları ve içerdikleri plazmidler Tablo 1'de verilmiştir.

Mupirosine dirençli 32 MRSA izolatına uygulanan PFGE yöntemiyle izolatların tamamı tiplendirilmiştir. İzolatlarda en az 13 en fazla 16 bant oluştuğu görülmüş, buna göre izolatlar genotip A ve genotip A1 olmak üzere iki farklı pulsotipte yer almıştır. Genotip A olarak tanımlanan 1-15, 20-25, 30-32 no'lu izolatlar identik ya da tek bant farkı olan suşlardır. Genotip A1 olarak tanımlanan 16-19, 26-29 no'lu izolatlar ise, genotip A suşlarından 2 bant farklılık gösteren ve genotip A suşlarıyla yakın ilişkili olan suşlardır. Pulsotiplere ait PFGE görüntüsü Resim 3'te, dendrogram ise Şekil 1'de yer almaktadır.



Resim 1. MRSA suşlarında PCR yöntemiyle *mupA* geninin gösterilmesi [a: DNA belirteci, c: *mupA* (456 bç)].

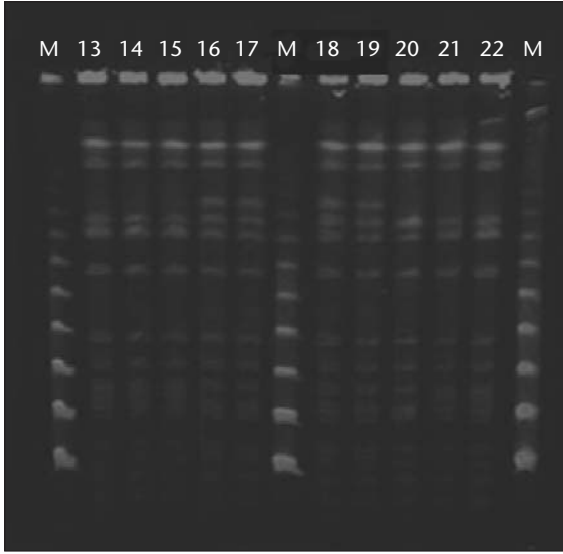


Resim 2. Mupirosine dirençli MRSA izolatlarının plazmid profil analizleri (3. sıra: *S.aureus* WBG4483 plazmid moleküler belirteci).

Tablo 1. Mupirosine Dirençli 35 MRSA İzolatı İçin Elde Edilen E-Test MİK Değerleri ve Plazmid Paternleri

Suş no	E-Test	MİK (µg/mL)	Saptanan plazmidler (kb)
1	MuL	192	2.8-4.4
2	MuL	128	4.4
3	MuL	256	2.8-4.4
4	MuL	256	2.8-4.4
5	MuL	128	2.8-4.4
6	MuH	> 1024	2.8-4.4-38
7	MuL	12	4.4
8	MuL	128	4.4
9	MuH	> 1024	2.8-4.4-38
10	MuL	16	2.8-4.4
11	MuH	> 1024	2.8-4.4-26-38
12	MuH	> 1024	2.8-4.4-38
13	MuH	> 1024	2.8-4.4-38
14	MuH	> 1024	2.8-4.4-38
15	MuH	> 1024	2.8-4.4-38
16	MuH	> 1024	2.8-4.4-26-38
17	MuH	> 1024	2.8-4.4-26-38
18	MuH	> 1024	2.8-4.4-26-38
19	MuL	128	2.8-4.4
20	MuL	48	2.8-4.4
21	MuL	64	2.8-4.4
22	MuL	12	2.8-4.4-26
23	MuH	> 1024	2.8-4.4-38
24	MuH	> 1024	2.8-4.4-38
25	MuH	> 1024	2.8-4.4-26-38
26	MuH	> 1024	2.8-4.4-26-38
27	MuH	> 1024	2.8-4.4-38
28	MuH	> 1024	2.8-4.4-38
29	MuH	> 1024	2.8-4.4-26-38
30	MuH	> 1024	2.8-4.4-26-38
31	MuH	> 1024	2.8-4.4-26-38
32	MuH	> 1024	2.8-4.4-26-38
33	MuH	> 1024	2.8-4.4-26-38
34	MuH	> 1024	2.8-4.4-38
35	MuH	> 1024	2.8-4.4-38

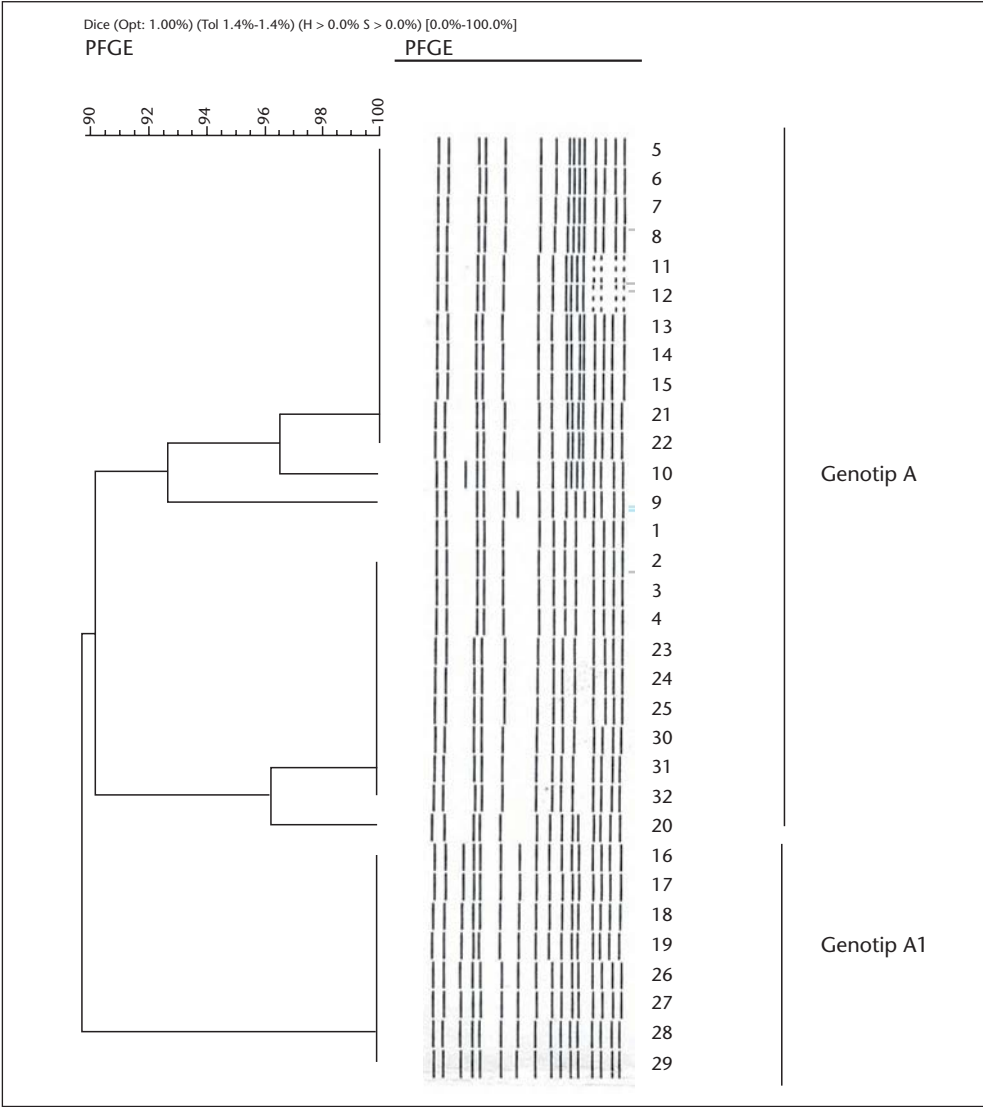
MRSA: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu, MuH: Yüksek düzeyde mupirosin direnci, MuL: Düşük düzeyde mupirosin direnci.



Resim 3. Mupirosine dirençli MRSA suşlarının PFGE bant profilleri (Kolon M: λ büyüklük belirteci 13-22 kolon: mupirosine dirençli MRSA suşları).

TARTIŞMA

MRSA, hastane kökenli enfeksiyonların başlıca etkenlerinden biri olması ve çoklu antibiyotik direnç gelişimi nedeniyle bugün çok ciddi bir problem haline gelmiştir. MRSA suşlarının diğer *S.aureus* suşlarından daha virülan oldukları gösterilmemekle beraber, bu suşların neden olduğu enfeksiyonların mortalitesi daha yüksektir. MRSA'nın bir hastaneye girişini takiben eradikasyonu oldukça güçtür. Başlıca kaynaklar, bu mikroorganizma ile kolonize veya enfekte hastalar ile kolonize sağlık personelidir^{1,2}. MRSA'nın en sık rastlanan nozokomiyal enfeksiyon etkenlerinden biri olması, klinisyenleri mupirosin kullanımına yönlendirmiştir. Mupirosinin topikal kullanımı, özellikle nazal taşıyıcılardan MRSA eradikasyonunda etkili olmaktadır. Ayrıca mupirosin, MRSA ile kolonize ya da enfekte olan yaraların, bacak ülserlerinin, travmatize dokuların ve yanıkların topikal tedavisinde de kullanılmaktadır. Ancak gerek profilaktik gerekse tedavi amacıyla kullanımının artmasıyla birlikte son yıllarda mupirosin direnci gösteren MRSA izolatları bildirilmeye başlanmıştır^{12,13}. MRSA'ların diğer birçok antibiyotiğe karşı duyarlılıklarının araştırıldığı çok sayıda çalışma olmasına karşın, mupirosin duyarlılığı ile ilgili çalışma sayısı sınırlıdır. Bu nedenle planlanan bu çalışmada, 595 nozokomiyal MRSA suşunda mupirosin direnci disk difüzyon ve E-test yöntemleriyle araştırılmış ve her iki yöntemle de %5.9 oranında direnç saptanmıştır. Dünya genelinde mupirosin direncinin %0.3-16.6 arasında değiştiği bildirilmektedir¹⁴⁻¹⁷. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde¹⁸ bu oran %1, İngiltere'de¹⁹ %0.3, Malezya'da¹⁷ %1.4, Yeni Zelanda'da²⁰ %3.7 iken, Orta Avrupa ülkelerinde¹³ %16.6, İspanya'da²¹ %13.8, Yunanistan'da²² %4.4'tür.



Şekil 1. İzolatların PFGE ile elde edilen restriksiyon paternlerinin dendrogramı (gruplar arası bağlantı yöntemi ve Dice katsayısı kullanılmıştır).

Hastanemizde mupirosin, çoğunlukla stafilokokal deri enfeksiyonlarının tedavisi ve kolonizasyon saptanan yoğun bakım ile diyaliz hastalarında kolonizasyonun eradikasyonu amacıyla kullanılmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda elde ettiğimiz mupirosin direnç oranı, bu ilacın kontrollü kullanıldığı bazı ülkelerden daha yüksek bulunmuş, komşumuz Yunanistan ile benzer olduğu görülmüştür. Ülkemizde bu konu ile ilgili araştırma sayısı sınırlı olup, MRSA suşlarında mupirosin direnç oranları %0-9 arasında bildirilmektedir²³⁻²⁶. Bu araştırmaların tümünde mupirosin direnci disk difüzyon yöntemiyle çalışılmıştır. Si-

vas'ta yapılan bir diğer araştırmada ise klinik örneklerden izole edilen MRSA suşlarında mupirosin direnci mikrodifüzyon yöntemiyle araştırılmış ve MuL %31.6, MuH ise %4.5 olarak bulunmuştur²⁷.

Bu çalışmada mupirosin direncinin saptanmasında disk difüzyon ve E-test ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Finley ve arkadaşları⁶ 177 stafilokok izolatıyla yaptıkları araştırmada, E-teste göre disk difüzyon testinin %3.8 oranında yalancı pozitif sonuç verdiğini saptamışlardır. Perez-Roth ve arkadaşlarının²¹ 1785 *S.aureus* izolatıyla yaptıkları çalışmada ise, disk difüzyon ve E-test sonuçları arasında fark bulunmamış ve E-testin sadece MuH ve MuL ayırımında kullanılması gerektiği vurgulanmıştır. Rutinde mupirosin direncinin gösterilmesinde disk difüzyon testinin yeterli olduğu, ucuz olması ve uygulama kolaylığının da bu bakımdan önemli bir avantaj oluşturduğu söylenebilir. Bununla birlikte çalışmamızda olduğu gibi E-test kullanımıyla MuH ve MuL izolatlarının ayırımının yapılması mümkün olabilmektedir.

MuH ilk MRSA suşu 1987 yılında İngiltere'den rapor edilmiştir. Dünya geneline bakıldığında, ABD, Avustralya, Yeni Zelanda, İspanya, Kanada, Polonya ve Japonya gibi ülkelerden daha ziyade MuL izolatlar bildirilmektedir^{28,29}. Kore ve Brezilya'da yapılan çalışmalar ile bu çalışmada elde edilen (%65.8) MuH izolat sayısı ise daha fazladır^{30,31}. Mupirosinin nazal sprey şeklini kullanan hastalarda düşük düzeyde mupirosin direnci bildirilirken, yüksek düzeyde mupirosin direncinin daha çok mupirosinin topikal pomad formunda kullanımı ile ilişkili olduğu bildirilmektedir²⁸. Çalışmamızda da MuH-MRSA izolatlarının daha fazla olmasının nedeni, ülkemizde mupirosinin nazal formunun olmaması nedeniyle sadece topikal kullanımından kaynaklanması olabilir. Hastanemizde mupirosine direnç oranı henüz ciddi anlamda yüksek olmamakla birlikte, ilacın yaygın ve uygunsuz kullanımı durumunda MRSA suşlarında duyarlılığın azalmasına yol açabilir. Bu nedenle ilacın kullanımının sınırlandırılması, olgu seçiminin iyi yapılması, suşlarda mupirosin aktivitesinin in vitro duyarlılık testleriyle takip edilmesi ve ülkemizde de nazal sprey kullanımına geçilmesi uygun olacaktır.

Yurt dışında yapılan araştırmalarda, mupirosine dirençli MRSA suşlarının çoğu yara yeri, deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarından izole edilmiştir¹³. Bu araştırmada da benzer şekilde hem MRSA hem de mupirosine dirençli MRSA suşlarının çoğu yara yeri (%65.7) ve kandan (%14.3) izole edilmiştir. Watanabe ve arkadaşlarının²⁸ yaptığı araştırmada, MRSA ve mupirosine dirençli MRSA'ların izole edildiği klinik örneklerin benzer olduğu bildirilmiştir. Ancak ülkemizde bu konuya yönelik bir veri bulunamamıştır.

Çalışmamızda metisilin direnci, altın standart olarak kabul edilen³² PCR yöntemiyle genotipik olarak doğrulanmış ve mupirosine dirençli bütün suşlarda *mecA* geni gösterilmiştir. MRSA izolatlarında mupirosin direncinin moleküler yöntemlerle gösterilmesi amacıyla da *mupA* gen varlığı PCR ile araştırılmaktadır. Bu araştırmada 35 MRSA suşunun tümünde PCR ile *mupA* direnç geni saptanmıştır. Böylece disk difüzyon ve E-test ile yapılan antibiyotik duyarlılık testleri ile tespit edilen mupirosin direnci, genotipik olarak da doğrulanmıştır. Yapılan diğer çalışmalarda da, fenotipik olarak tanımlanan mupirosine dirençli tüm MRSA suşlarında *mupA* gen varlığı PCR ile gösterilmiştir^{4,9,28}.

Stafilokoklarda mupirosin direncinden sorumlu olan *mupA* geni kromozomal ya da ekstrakromozomal kaynaklı olabilir. Kromozomal *mupA* gen varlığında oluşan direnç, düşük düzeyli (MuL; MİK= 8-256 µg/ml) olma özelliğindedir. Plazmidler tarafından taşınan *mupA* geninden kaynaklanan direnç ise yüksek düzeyli olma özelliği taşır (MuH; MİK ≥ 512 µg/ml). Fenotipik olarak yüksek ve düşük düzeyde mupirosin direnci saptanan suşlarda genotipik doğrulama plazmid profil analizi ile yapılmaktadır^{4,5,9}. Bu çalışmada, plazmid profil analizi sonucunda 35 MRSA izolatının 11'inin; 38, 26, 4.4, 2.8 kb'lık plazmidler, 12'sinin 38, 4.4, 2.8 kb'lık plazmidler, 8'inin 4.4 ve 2.8 kb'lık plazmidler içerdiği görülmüştür. Sadece 3 izolatta 4.4 ve 1 izolatta 26, 4.4 ve 2.8 kb'lık plazmidler saptanmıştır. Araştırmamızda daha önce bu konuda yapılan araştırmalarda^{4,5,9} gösterildiği gibi, 23 MuH izolatının hepsinde *mupA* genini taşıdığı bildirilen 38 kb'lık plazmid saptanırken, 12 MuL izolatının hiçbirinde bu plazmid saptanmamıştır. Bu plazmidi taşımayan 12 izolatta mupirosin direnç geninin kromozomal yerleşimli olduğu düşünülmüştür.

Son yıllarda PFGE yöntemi moleküler mikrobiyoloji alanında yaygın olarak kullanılmakta ve hastane enfeksiyonlarının epidemiyolojik değerlendirilmesi için altın standart olarak kabul edilmektedir^{4,9,32}. Çalışmamızda, mupirosine dirençli 32 MRSA izolatı PFGE ile genotiplendirilmiş; 24 suş identik, 8 suş ise bu 24 suş ile yakın ilişkili bulunmuştur. PFGE analizi hastanemizde, mupirosinin yara bakımında tedavi amacıyla sıkça kullanıldığı servislerde ve MRSA kolonizasyonunun eradikasyonu amacıyla uygulandığı yoğun bakım ünitelerinde ciddi bir sorun oluşturduğunu göstermektedir. Dış ortam koşullarına ve dezenfektanlara oldukça dirençli olan bu suşlar, muhtemelen bir hasta aracılığıyla ortama bulaştıktan sonra, bu özelliğinden dolayı canlı kalarak hastadan hastaya doğrudan geçiş veya dolaylı olarak kontamine eller, kontamine yüzeyler ya da tıbbi cihazlar yoluyla ekzojen yolla geçerek bulaşmış olabilir. Sonuç olarak hastanemizde, bu ilacın sık kullanıldığı bölümlerde oldukça yüksek oranda mupirosine dirençli MRSA varlığı görülmüş ve bu izolatların genetik olarak aynı veya yakın ilişkili olmaları da çok kolay ekzojen geçiş gösterdiğini ve uzun bir süre canlılığını koruduğunu ortaya koymuştur. Bu nedenle mupirosin kullanımında endikasyonun doğru koyulması, yara bakımından ziyade sadece nazal taşıyıcılığın eradikasyonunda tercih edilmesi ve doz ayarlamasının zor olduğu pomat formu yerine nazal sprey şeklinde uygulanmasının daha akılcı bir yaklaşım olacağı sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Harbarth S, Liassino N, Dharan S, Bemliut P, Auckenthaler R, Pittet D. Risk factors for persistent carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis 2000; 13: 1380-5.
2. Harbarth S, Pittet D. Control of nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Where shall we send our hospital director next time? Infect Control Hosp Epidemiol 2003; 24: 314-6.
3. Anthony RM, Connor AM, Power KGM, 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: 30-4.
4. Udo E, Al-Sweih N, Noronha RC. A chromosomal location of *mupA* gene in *Staphylococcus aureus* expressing high-level mupirocin resistance. J Antimicrob Chemother 2003; 51: 1283-6.
5. Morton TM, Johnston JL, Patterson J, Archer GL. Characterization of a conjugative staphylococcal mupirocin resistance plasmid. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 1272-80.

6. Finlay JE, Miller AL, Poupard JA. Interpretive criteria for testing susceptibility of staphylococci to mupirocin. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1137-9.
7. Sasaki R, Fujino T, Katsutoshi S, et al. Molecular epidemiology surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Hiroshima Community hospital in 2002. *Jpn J Infect Dis* 2002; 55: 107-10.
8. Fujino T, Sekiguchi J, Kawana A, et al. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *S.aureus* in a Tokyo hospital in 2003. *Jpn J Infect Dis* 2003; 59: 21-8.
9. Udo EE, Jacob LE, Mathew B. Genetic analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing high-level and low-level mupirocin resistance. *J Med Microbiol* 2001; 50: 909-15.
10. Chung M, De Lencastre H, Matthews P, et al. Molecular typing of methicillin-resistant *S.aureus* by pulsed-field gel electrophoresis: comparison of results obtained in a multilaboratory effort using identical protocols and MRSA strains. *Microbiol Drug Resist* 2000; 6: 189-98.
11. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233-9.
12. Lamb YJ. Overview of the role of mupirocin. *J Hosp Infect* 1991; 19 (Suppl B): 27-30.
13. Kresken M, Hafner D, Schmitz FJ, Wichelhaus TA, Paul-Ehrlich Society for Chemotherapy. Prevalence of mupirocin resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: results of the Antimicrobial Resistance Surveillance Study of the Paul-Ehrlich-Society for Chemotherapy, 2001. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 23: 577-81.
14. Boyce JM, Jackson MM, Pugliese G, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a briefing for acute care hospitals and nursing facilities. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1994; 15: 105-15.
15. European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARRS). Annual Report 2001. National Institute of Public Health and the Environment, 2001. The Netherlands. ISBN 90-6960-098-6 2002.
16. EPINE Working group. Prevalence of hospital infections in Spain. *J Hosp Infect* 1992; 20: 1-13.
17. Norazah A, Koh YT, Ghani Kamel A, Alias R, Lim VK. Mupirocin resistance among Malaysian isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 17: 411-4.
18. Bradley SF, Ramsey MA, Morton TM, et al. Mupirocin resistance: clinical and molecular epidemiology. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995; 16: 354-8.
19. Cookson BD. The emergence of mupirocin resistance: a challenge to infection control and antibiotic prescribing practice. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41: 11-8.
20. Hefferman H, Davies H, Brett M. MRSA increasing in New Zealand. *New Zealand Public Health Rep* 1995; 2: 97-9.
21. Pérez-Roth E, Claverie-Martín F, Batista N, Moreno A, Méndez-Alvarez S. Mupirocin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in a Spanish hospital: Co-application of multiplex PCR assay and conventional microbiology methods. *Diag Microbiol Infect Dis* 2002; 43: 123-8.
22. Moniatis N, Agel A, Legakis NJ, Tzouveleki LS. Mupirocin resistance in *Staphylococcus aureus* from Greek hospitals. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 18: 407-8.
23. Fidan I, Akyar I, Türet S, Rota S. Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında metisilin direncinin üç ayrı yöntemle saptanması ve metisilin dirençli suşların in-vitro mupirosin duyarlılığının araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 1997; 31: 345-50.
24. Willke A, Arman D, Tural D. Burun sürüntüsünde izole edilen *S.aureus* suşlarının topical uygulanabilen bazı antibiyotiklere in vitro duyarlılıkları. *Doktor* 1995; 1: 61-2.
25. Sancak B, Günalp A. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* izolatlarının mupirosin ve diğer antibiyotiklere olan duyarlılıkları. *Mikrobiyol Bul* 2000; 34: 209-13.
26. Akçay-Şenbayrak S, Oğuzoğlu N, Şengöz A, Küçükercan M, Çobanoğlu F. Deri ve yumuşak doku infeksiyonlarından izole edilen metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının fusidik asid ve mupirosin duyarlılığı. *Klinik Derg* 2005; 18: 117-20.
27. Vardar-Ünlü G, Ünlü M, Yağmuroğlu A. Klinik örneklerden soyutlanan *Staphylococcus aureus* ve koagülaz negatif stafillokok izolatlarında mupirosin direnci. *Ankem Derg* 2006; 20: 222-5.
28. Watanabe H, Masaki H, Asoh N, et al. Emergence and spread of low-level mupirocin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Hosp Infect* 2001; 47: 294-300.

29. Needham C, Rahman M, Dyke KG, Noble MC. An investigation of plasmids from *Staphylococcus aureus* that mediate resistance to mupirocin and tetracycline. *Microbiology* 1994; 140: 2577-83.
30. Yun HJ, Lee SW, Yoon GM, et al. Prevalence and mechanisms of low and high level mupirocin resistance in staphylococci isolated from a Korean hospital. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 619-23.
31. Bastos MC, Mondino PJ, Azevedo ML, Santos KR, Giambiagi-deMarval M. Molecular characterization and transfer among *Staphylococcus* strains of a plasmid conferring high-level resistance to mupirocin. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999; 18: 393-8.
32. Persing D. Genotyping identification and detection of MRSA, pp: 183-235. In: Persing D, Tenover FC, Versalovic J, et al (eds), *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*. 2004. ASM Press, Washington DC.
33. Montesinos I, Salido E, Delgado J, Lecvona M, Sierra A. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* at a university hospital in the Canary Islands. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2003; 24: 667-72.