

STAFİLOKOK KLİNİK İZOLATLARINDA MAKROLİD-LİNKOSAMİD-STREPTOGRAMİN B (MLS_B) VE TELİTROMİSİN DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF MACROLIDE-LINCOSAMIDE- STREPTOGRAMIN B (MLS_B) AND TELITHROMYCIN RESISTANCE IN CLINICAL STRAINS OF STAPHYLOCOCCI

Zeynep SARIBAŞ¹, Ferda TUNÇKANAT¹, Olcay ÖZÇAKIR¹, Serpil ERCİS¹

¹ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara. (ftuncan@hacettepe.edu.tr)

ÖZET

Bu çalışmada, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Erişkin Hastanesinde, klinik örneklerden izole edilen stafilocoklarda makrolid-linkozamid-streptogramin B (MLS_B) direnç prevalansının belirlenmesi ve bu izolatlarda telitromisin direncinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya 381 *Staphylococcus aureus* ve 94 koagülaz-negatif stafilokok (KNS) izolatı dahil edilmiş ve izolatlarda MLS_B ve telitromisin direncinin araştırılmasında disk yaklaştırma yöntemi kullanılmıştır. Bu izolatlarda ayrıca sefoksitin diski (30 µg) kullanılarak disk difüzyon yöntemi ile metisilin direnci de belirlenmiştir. Genotipik olarak direnç genlerinin varlığının araştırılması polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile yapılmıştır. Çalışılan *S.aureus* izolatlarının 112 (%29.4)'si ve KNS izolatlarının 58 (%61.7)'i eritromisine dirençli bulunmuştur. Eritromisine dirençli izolatlar içinde en yaygın direnç paterni olarak indüklebilir MLS_B (iMLS_B) direnci saptanmıştır. iMLS_B direnci eritromisine dirençli *S.aureus* izolatlarında %56.2, KNS izolatlarında ise %41.4 olarak belirlenmiştir. Yapısal (konstitüsyonel) MLS_B direnci (cMLS_B) ise *S.aureus* izolatlarında %40.2, KNS'lerde %34.5 oranlarında gözlenmiştir. Makrolid-streptogramin B (MS_B) direnç paterni yalnızca KNS'lerde %24.1 oranında saptanmıştır. Çalışmamızda, *S.aureus* izolatlarının 4 (%3.6)'ünde hem indüklebilir hem de yapısal direncin bir arada görülmesi (karışık fenotip) dikkat çekici bulunmuştur. Eritromisine duyarlı stafilokok izolatlarının tümü telitromisine de duyarlıdır. iMLS_B ve MS_B direnç paterni gözlenen tüm izolatlarda telitromisin diskinin çevresinde D-şeklinde inhibisyon zonu gözlenmesi, bu çalışmanın bir diğer dikkat çekici bulgusu olmuştur. Yapısal MLS_B direnç fenotipi gösteren izolatların hepsi telitromisine de dirençli bulunmuştur (disk etrafında inhibisyon zonu oluşmamıştır). Eritromisine dirençli toplam 170 stafilokok izolatı *erm* ve *msrA* gen varlığı açısından araştırıldığında; iMLS_B fenotipi gösteren *S.aureus* izolatlarında en sık *ermA* geni saptanmış (44/63), cMLS_B dirençli izolatlarda *ermA* ve *ermC* genlerinin bir arada bulunması (35/45) en sık rastlanan bulgu olmuştur. Karışık fenotip gösteren dört *S.aureus* izolatının hepsinin *ermA* geni taşıdığı izlenmiştir. KNS izolatlarında ise toplamda en sık olarak *ermC* geni saptanmış (37/58); iMLS_B ve cMLS_B dirençli KNS izolatlarında sıklıkla belirlenen genler sırasıyla *ermC* (11/24) ve *ermA* + *ermC* gen birlikteliği (10/20) olmuştur. MS_B fenotipi gösteren 14 KNS izolatının 11'inde *msrA* gen varlığı belirlenmiş; bunlardan da ikisine *ermA*, üçüne *ermC* genleri eşlik etmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, hastanemizdeki kli-

nik örneklerden izole edilen stafilokoklarda MLS_B direncinin daha ziyade indüklenebilir direnç şeklinde görüldüğünü ve bu izolatlarda, yeni ve özellikle indüklenebilir MLS_B dirençli bakteriyel enfeksiyonların tedavisi için önerilen bir antibiyotik olan telitromisinin, indüklenebilir dirence benzer direnç fenotipi gösterdiğini ortaya koymaktadır. Diğer merkezlerde de telitromisin direnç paternlerinin belirlenmesi ve bu bulgunun klinik öneminin araştırılması yararlı olacaktır.

Anahtar sözcükler: MLS_B, telitromisin, *erm*, *msrA*, *Staphylococcus*.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the prevalence of macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLS_B) resistance and also to search for telithromycin resistance in staphylococcus strains isolated at Hacettepe University Hospital, Ankara, Turkey. A total of 381 *Staphylococcus aureus* isolates and 94 coagulase-negative staphylococci (CNS) were tested by disc approximation method. Methicillin resistance of these isolates was searched by disc diffusion test using 30 µg cefoxitin discs. Distribution of *erm* genes was detected by PCR method. Of 381 isolates 112 (29.4%) *S.aureus* and 58 (61.7%) CNS were found to be resistant to erythromycin. Among these, the inducible MLS_B (iMLS_B) resistance was the most prevalent pattern, being 56.2% and 41.4% among *S.aureus* and CNS isolates, respectively. The frequency of constitutive MLS_B resistance (cMLS_B) was 40.2% for *S.aureus* and 34.5% for CNS. Macrolide-streptogramin B (MS_B) resistance pattern was detected only in CNS isolates (24.1%). In 4 (3.6%) of *S.aureus* isolates mixed pattern demonstrating both inducible and constitutive patterns was detected. None of the isolates susceptible to erythromycin showed resistance to telithromycin. As a remarkable finding of this study D-shaped inhibition zones around the telithromycin discs was observed in all of the isolates with iMLS_B and macrolide-streptogramin B (MS_B) resistance phenotypes. The isolates showing cMLS_B pattern were also resistant to telithromycin (no zone of inhibition around the telithromycin discs). A total of 170 erythromycin resistant staphylococcal isolates were tested for the presence of *erm* and *msrA* genes. Among the *S.aureus* isolates with iMLS_B and cMLS_B phenotypes, the most common findings were the detection of *ermA* (44/63) and *ermA* + *ermC* (35/45) genes, respectively. All of the four isolates with mixed phenotype harboured *ermA* gene. With respect to CNS isolates, the most frequently detected gene was *ermC* (37/58); whereas iMLS_B and cMLS_B resistant CNS isolates had *ermC* (11/24) and *ermA* + *ermC* (10/20) as the most prevalent resistance genes, respectively. *msrA* gene was detected in 11 of 14 CNS isolates with MS_B resistance. Two of these were also carrying *ermA* while 3 isolates harboured *ermC* along with *msrA* gene. The results of this study showed that inducible MLS_B resistance was the most prevalent phenotype among the clinical staphylococcal isolates in our hospital. All of these isolates also demonstrated inducible resistance pattern against telithromycin, a new antibiotic suggested particularly for the treatment of infections with iMLS_B resistant bacteria. The telithromycin resistance patterns need to be tested in other centers and the impact of this issue on the clinical use of telithromycin should be investigated.

Key words: MLS_B, telithromycin, *erm*, *msrA*, *Staphylococcus*.

GİRİŞ

Makrolid-linkozamid-streptogramin B (MLS_B) grubu antibiyotikler, stafilokoklar da dahil olmak üzere gram-pozitif bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu antibiyotikler farklı gruplara ait olmalarına karşın, antibakteriyel etkilerini bakterinin 23S rRNA ribozomal alt ünitesine bağlanarak protein sentezini inhibe etmek suretiyle gösterirler. Bağlanma bölgesinde meydana gelen mutasyonel bir değişiklik bu üç farklı antibiyotiğe birden direnç gelişmesi (MLS_B direnci) ile sonuçlanır^{1,2}.

Stafilokoklarda makrolid direnci, hedef bölgenin değişmesi, dışa atım pompaları (efluks mekanizması) ve ilacın inaktivasyonu mekanizmaları ile ortaya çıkmaktadır. En sık görülen mekanizma hedef bölge değişikliği olup (MLS_B direnci), *erm* genlerince kodlanan (stafilokoklarda başlıca *ermA*, *ermB* ve *ermC*) metilaz enzimleri aracılığı ile meydana gelir. MLS_B direncinin fenotipik ekspresyonu indüklenebilir (iMLS_B) veya yapısal-konstitütif-(cMLS_B) olabilir^{1,2}. Makrolid direnci, dışa atım mekanizmasına bağlı olarak da gelişebilmektedir. Bu şekilde gelişen dirence makrolid-streptogramin B (MS_B) direnci adı verilir ve bu tür direnç stafilokoklarda *msrA* geni tarafından kodlanır². Üçüncü mekanizma, antibiyotiklerin çeşitli enzimlerce inaktive edilmesidir ki, bu mekanizma stafilokoklarda nadir görülür³⁻⁵.

MLS_B grubu antibiyotiklere direnç gelişmesi nedeniyle bu ilaçların yeni türevleri geliştirilmiştir. Ketolidler, eritromisin yarı-sentetik türevleri olup, yeni geliştirilen bu antibiyotik grubunun ilk üyesi telitromisindir⁶⁻⁸. Ketolidler de makrolid grubu antibiyotikler gibi bakteriyel ribozomun 23S rRNA alt ünitesine bağlanırlar ve 50S alt ünite öncüllerinin birleşmesini inhibe ederler^{9,10}. Bu iki antibiyotik grubu arasındaki bazı yapısal farklar nedeniyle ketolidler, 23S rRNA'nın V. kangelinin yanı sıra II. kangeline de bağlanırlar. Bu özellik ketolidlerin, eritromisine dirençli gram-pozitif mikroorganizmalar da dahil olmak üzere pek çok patojene karşı daha etkili olmasını sağlamaktadır⁸⁻¹¹. Ancak son yıllarda yapılan çeşitli çalışmalarda, eritromisine dirençli stafilokok izolatlarında, telitromisin direnci bildirilmeye başlanmıştır¹²⁻¹⁴.

Bu çalışmanın amacı, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde klinik örneklerden izole edilen stafilokoklarda MLS_B ve telitromisin direncini araştırmak ve MLS_B ve MS_B direncinden sorumlu olan *ermA*, *ermB*, *ermC* ve *msrA* genlerinin dağılımını belirlemektir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, 2003-2004 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Erişkin Hastanesinde yatan hastalardan izole edilen toplam 475 stafilokok izolatı dahil edildi. Aynı hastadan alınan birden fazla örnekte üreyen izolatlar çalışma dışı bırakıldı. Toplam 475 izolatın 381'i *Staphylococcus aureus*, 94'ü ise koagülaz-negatif stafilokok (KNS) idi (53 *S.epidermidis*, 19 *S.hemolyticus*, 6 *S.hominis*, 6 *S.capitis*, 4 *S.lugdunensis*, 2 *S.saprophyticus*, 2 *S.warnerii*, 2 *S.caprea*). Antibiyotik duyarlılık testleri için kontrol suşu olarak *S.aureus* ATCC 25923 kullanıldı.

Antibiyotik duyarlılık testleri "Clinical and Laboratory Standards Institute" (CLSI) kılavuzuna uygun olarak yapıldı¹⁵. Bakteri süspansiyonları 0.5 McFarland bulanıklık standardına eşdeğer bulanıklığa getirildikten sonra iki ayrı Mueller-Hinton agar plağına ekildi. Plaklardan birisi MLS_B ve telitromisin direncini saptamak üzere "disk yaklaştırma" testi için kullanıldı. Bu amaçla plağın ortasına eritromisin diski (15 µg) ve bu diskten 20 mm uzakta olacak şekilde klindamisin (2 µg) ve telitromisin (15 µg) diskleri yerleştirildi^{2,15-18}. Diğer ekili besiyerine ise sefoksitin (30 µg) diski konularak metisilin direnci araştırıldı. Tüm plaklar 35°C'de 24 saat inkübe edildi. Klindamisin diskinin etrafında eritromisin diskiye yakın tarafta inhibisyon zonunda düzleşme (D-şeklinde zon) görülmesi iMLS_B olarak kabul edildi. Eritromisin ve klindamisin disklerinin etrafında inhibisyon zonunun oluşmaması yapısal (cMLS_B) direnç olarak değerlendirildi. Eritromisine dirençli, klindamisine

duyarlı izolatlar ise MS_B direnç fenotipi olarak kabul edilmeden önce test bir kez de plaklara streptogramin B diskleri yerleştirilerek tekrarlandı. Bu amaçla Princeton, New Jersey'de bulunan Squibb Tıbbi Araştırma Enstitüsünden sağlanan vernamisin B α (streptogramin B) antibiyotik tozu kullanılarak taze olarak hazırlanan ve 25 μ g antibiyotik içeren diskler kullanıldı. Bu testlerde klindamisine duyarlı, eritromisin ve vernamisin B α 'ya dirençli bulunan izolatlar MS_B direnç fenotipi olarak nitelendirildi¹⁹.

Eritromisine dirençli bulunan 170 izolatta *erm* ve *msrA* genlerinin varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi ile araştırıldı. DNA ekstraksiyonu, daha önce tanımlanmış olan kaynatma yöntemi ile yapıldı²⁰. Bunun için plak dolusu koloni alınarak TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8) tampona konuldu. Bu tampon içinde üç kere yıkandıktan sonra aynı tampon içinde 20 dakika kaynatıldı. Santrifüjle (12.000xg) DNA içeren süpernatant ayrıldı. Elde edilen DNA'lar PCR uygulanana kadar -20°C'de saklandı. Lina ve arkadaşlarının²¹ tanımladığı primerler ve PCR koşulları uygulanarak, sırasıyla *ermA*, *ermB*, *ermC* ve *msrA* genlerinin 421, 359, 572 ve 940 baz çiftlik (bç) kısımları çoğaltıldı. PCR ürünleri %1.5 w/v agaroz jelde elektroforez yapılarak ve UV altında incelenerek gözlemlendi. *S.aureus* ATCC 25923 suşu negatif kontrol olarak kullanıldı. Pozitif kontrol olarak, Dr. Seppala'dan (Antimicrobial Research Laboratory, National Public Health Institute, Turku, Finlandiya) sağlanan *Escherichia coli*'den elde edilmiş ve *ermA*, *ermB*, *ermC* için pozitif kalıp DNA'lar kullanıldı.

BULGULAR

Test edilen 381 *S.aureus* ve 94 KNS klinik izolatının sırasıyla 112 (%29.4) ve 58 (%61.7)'inde eritromisin direnci saptanmıştır. Eritromisine dirençli 112 *S.aureus* izolatının 87 (%77.7)'si ve 58 KNS izolatının 34 (%58.6)'ü metisiline dirençli bulunmuştur. *S.aureus* ve KNS izolatlarının MLS_B direnç fenotipleri sırasıyla Tablo I ve II'de gösterilmiştir.

Tablo I. Eritromisine Dirençli *Staphylococcus aureus* İzolatlarında Direnç Fenotipleri

<i>S.aureus</i> (sayı)	iMLS _B		cMLS _B		MS _B		iMLS _B + cMLS _B	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
MRSA (87)	40	35.7	43	38.4	-		4	3.6
MSSA (25)	23	20.5	2	1.8	-		-	
Toplam (112)	63	56.2	45	40.2	-		4	3.6

MRSA: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*, MSSA: Metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus*.

Tablo II. Eritromisine Dirençli KNS İzolatlarında Direnç Fenotipleri

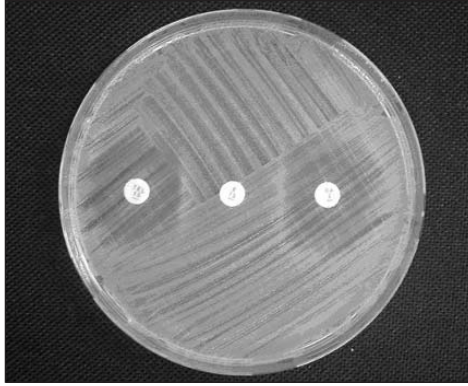
KNS (sayı)	iMLS _B		cMLS _B		MS _B		iMLS _B + cMLS _B	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
MRKNS (34)	13	22.4	17	29.3	4	6.9	-	
MSKNS (24)	11	19	3	5.2	10	17.2	-	
Toplam (58)	24	41.4	20	34.5	14	24.1	-	

MRKNS: Metisiline dirençli koagülaz-negatif stafilokok, MSKNS: Metisiline duyarlı koagülaz-negatif stafilokok.

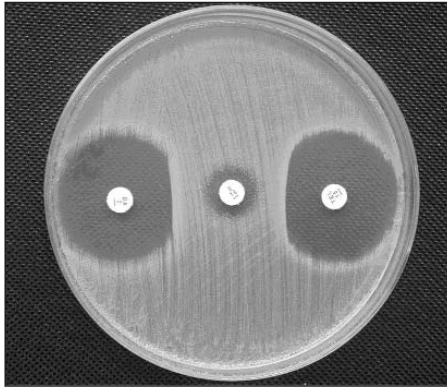
S.aureus izolatlarının 4 (%3.6)'ünde iMLS_B ve cMLS_B direnci birlikte (karışık patern) görülmüştür. Bu izolatlarda D-şeklinde inhibisyon zonu ve aynı zamanda zon içi yoğun üreme mevcuttur (Resim 1). Bu izolatların karışık kültür olasılığını ortadan kaldırmak için, saflaştırma amaçlı tek koloni ekimleri tekrarlanmış, tek kolonilerden elde edilen kültürler ikişer kez daha test edilmiş ve aynı sonuçlar elde edilmiştir.

Çalışmamızda, eritromisine duyarlı stafilokok izolatlarının tümünün telitromisine de duyarlılık gösterdiği belirlenmiştir. iMLS_B ve MS_B direnç paterni gözlenen tüm izolatlarda, telitromisin diskinin etrafında D-şeklinde inhibisyon zonu izlenmiştir (Resim 2). Yapısal MLS_B direnç fenotipi gösteren izolatların hepsi telitromisine de dirençlidir (disk etrafında inhibisyon zonu oluşmamıştır) (Resim 3).

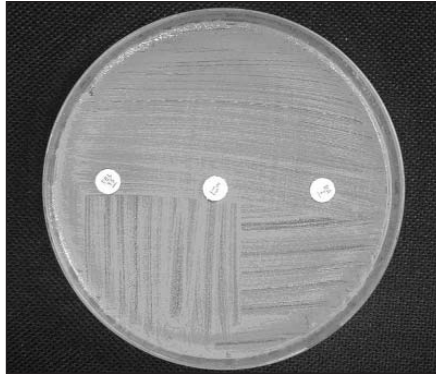
Eritromisine dirençli *S.aureus* izolatlarının 9'unda, KNS'lerin ise 6'sında çalışılan direnç genlerinden hiçbirisine rastlanmamıştır. *S.aureus* izolatlarında *ermA* ve *ermC* genlerinin bir arada görülmesi, en sık saptanan genotip olarak izlenmiştir (Tablo III). KNS izolatlarında ise en sık olarak *ermC* geni bulunmuştur. MS_B direnç fenotipi gösteren 14 izolatın 11'inde *msrA* geni saptanmıştır (Tablo IV).



Resim 1. Karışık MLS_B (iMLS_B + cMLS_B) ve telitromisin direnç fenotipi.



Resim 2. iMLS_B fenotipi ve telitromisin etrafında D-inhibisyon zonu oluşması.



Resim 3. cMLS_B fenotipi ve telitromisin direnci.

Tablo III. Makrolide Dirençli *Staphylococcus aureus* İzolatlarında *ermA*, *ermB*, *ermC* ve *msrA* Genlerinin Dağılımı

Gen	<i>S.aureus</i> (n)						Toplam
	iMLS _B (63)		cMLS _B (45)		iMLS _B + cMLS _B (4)		
	MRSA (40)	MSSA (23)	MRSA (43)	MSSA (2)	MRSA (4)	MSSA (0)	
<i>ermA</i>	29	4	3	-	4	-	40
<i>ermB</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>ermC</i>	1	11	3	2	-	-	17
<i>ermA</i> + <i>ermB</i>	1	-	-	-	-	-	1
<i>ermA</i> + <i>ermC</i>	4	6	35	-	-	-	45
<i>msrA</i>	-	-	-	-	-	-	-
Saptanamayan	5	2	2	-	-	-	9

MRSA: Metisiline dirençli *S.aureus*, MSSA: Metisiline duyarlı *S.aureus*.

Tablo IV. Eritromisine Dirençli KNS İzolatlarında *ermA*, *ermB*, *ermC* ve *msrA* Genlerinin Dağılımı

Gen	KNS (n)						Toplam
	iMLS _B (24)		cMLS _B (20)		MS _B (14)		
	MRKNS (13)	MSKNS (11)	MRKNS (17)	MSKNS (3)	MRKNS (4)	MSKNS (10)	
<i>ermA</i>	1	2	1	-	-	3	7
<i>ermB</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>ermC</i>	7	4	6	-	-	1	18
<i>ermA</i> + <i>ermB</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>ermA</i> + <i>ermC</i>	3	3	8	2	-	-	16
<i>msrA</i>	-	-	-	-	2	4	6
<i>ermA</i> + <i>msrA</i>	-	-	-	-	1	1	2
<i>ermC</i> + <i>msrA</i>	1	-	1	-	1	-	3
Saptanamayan	1	2	1	1	-	1	6

KNS: Koagülaz-negatif stafilokok, MRKNS: Metisiline dirençli koagülaz-negatif stafilokok, MSKNS: Metisiline duyarlı koagülaz-negatif stafilokok.

TARTIŞMA

Stafilokok klinik izolatlarında MLS_B ve telitromisine karşı direnç sıklığının araştırıldığı bu çalışmada, dirençli izolatlarda bu antibiyotiklere dirençten sorumlu *ermA*, *ermB*, *ermC* ve *msrA* genlerinin dağılımı da araştırılmıştır. Çalışılan *S.aureus* ve KNS suşlarında eritromisin direnci sırasıyla %29.4 ve %61.7 oranlarında bulunmuş; tüm klinik izolatlar göz önüne alındığında genel direnç oranı %35.7 olarak belirlenmiştir. Bu konuda yapmış olduğumuz daha önceki bir çalışmada, 1996-1998 yılları arasında izole edilen stafilokoklarda bu oran %26.4 olarak saptanmıştır²². Önceki çalışmamızdan bu yana geçen 6-7 yıllık bir süre içerisinde MLS_B direncinde bir artış görülmekteyse de, bu artış çok yüksek değildir. Zira bilindiği gibi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi gibi büyük hastanelerde antibiyotik direnç oranları oldukça yüksek seyredebilmektedir. Ancak MLS_B grubu antibiyotiklerin özellikle yatan hastalarda kullanımının sınırlı oluşu bu durumu açıklayabilir. Son yıllarda Çetin ve arkadaşlarının²³ yayınladığı bir çalışmada da, stafilokok klinik izolatlarında MLS_B direnç oranı %38.5 olarak bildirilmiştir.

Çalışmamızda, eritromisine dirençli *S.aureus* izolatlarında en sık görülen MLS_B direnç paterni %56.2 oranı ile indüklenebilir dirençtir. Bu izolatların %63.5'i metisiline dirençli olup, bunlarda en sık olarak *ermA* geni saptanmıştır. *S.aureus* izolatlarında yapısal MLS_B direnci ise %40.2 oranında bulunmuştur; bu izolatların %95.5'i metisiline dirençlidir. Söz konusu bu izolatlarda hem *ermA* hem de *ermC* genleri en sık saptanan direnç genleri olmuştur. Önceki çalışmamızda, bu çalışmadan farklı olarak, *S.aureus* klinik izolatlarının çoğunluğu MLS_B antibiyotiklere yapısal olarak dirençli bulunmuştur. Ancak *ermA* ve *ermC* genleri benzer şekilde en sık saptanan genler olmuştur^{22,24}. Önceki çalışmalarımızla karşılaştırıldığında, hastanemizde stafilokok izolatlarında MLS_B direnç oranının yıllar içinde arttığı, ancak en sık görülen MLS_B direnç paterninin cMLS_B'den iMLS_B'ye değiştiği görülmektedir. Bunun nedeni, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde, klindamisin kullanımının o yıllara göre azalmış olması olabilir. Önceki çalışma döneminde, indükleyici olmayan bir MLS_B antibiyotik olan klindamisin, indüklenebilir suşlar arasından yapısal dirençli mutantları seçmiş olabilir. Benzer şekilde, Otsuka ve arkadaşları²⁵, bu antibiyotiklerin az kullanılmasına bağlı olarak, diğer çalışmalara oranla daha yüksek iMLS_B insidansı bildirmişlerdir.

Bu çalışmada, MLS_B dirençli *S.aureus* klinik izolatlarının çoğunluğunda *ermA* ve *ermC* genleri bir arada gözlenmiştir. Melter ve arkadaşları²⁶ da çalışmalarında birden fazla geni bir arada saptamışlardır. MLS_B dirençli MRSA izolatlarında en sık olarak *ermA* ve *ermC* genleri birlikte bulunmuştur. Aktaş ve arkadaşları²⁷ eritromisine dirençli *S.aureus* klinik izolatlarında *ermA* ve *ermC* genlerinin birlikte görülme oranını %37.5 olarak bildirmektedirler. Diğer bazı çalışmalarda MRSA izolatlarında en sık olarak *ermA* geni bildirilmekte olup, bu gen varlığına çoğunlukla cMLS_B fenotipi eşlik etmektedir^{21,28}. Davis ve arkadaşları¹², 46 izolatın 26'sında klindamisin direnci saptamışlar ve bu izolatlarda *ermA* genini göstermişlerdir. Bu ve önceki çalışmamızda MS_B direnci yalnızca KNS izolatlarında sap-

tanmıştır²⁴. Bu direnç fenotipi, diğer bazı çalışmalarda *S.aureus* klinik izolatlarında düşük oranlarda bildirilmektedir^{13,27}.

S.aureus izolatlarının 4 (%3.6)'ünde iMLS_B ve cMLS_B direnç paternleri birlikte (karışık fenotip) gözlenmiştir. Bu izolatlarda, güç seçilen D-şeklinde inhibisyon zonu ve zon içi yoğun üreme mevcuttur. Karışık fenotipte olan bu dört izolatın hepsi metisiline dirençli olup *ermA* direnç genine sahiptir. Karışık fenotip daha önce az sayıda çalışmada gözlenmiştir. Jorgensen ve arkadaşlarının¹⁷ çalışmasında 8 izolat benzer direnç paterni göstermiş ve hepsinde *ermA* geni saptanmıştır. Yoon ve arkadaşları²⁹ ise, hem indüklenebilir hem de yapısal direnç paterni gösteren izolatlarını "foggy" fenotip olarak adlandırmışlar ve bu fenotipin moleküler mekanizmasını açıklamışlardır.

Çalışmamızda, eritromisine dirençli toplam 58 KNS izolatında iMLS_B, cMLS_B ve MS_B direnç paternleri sırasıyla 24 (%41.4), 20 (%34.5) ve 14 (%24.1) izolatta görülmüştür. iMLS_B fenotipi saptananların %54.2'si, cMLS_B fenotipi saptananların ise %85'i metisiline direnç göstermektedir. iMLS_B veya cMLS_B fenotipi gösteren izolatlarda en sık görülen direnç geni *ermC* olup, bu gen yalnız başına ya da *ermA* ile birlikte saptanmıştır. KNS'ler içerisinde MS_B fenotipi gösterenlerin çoğunluğu (%71.4) metisiline duyarlıdır. MS_B fenotipi gösteren 14 izolatın 11'inde *msrA* geni gösterilmiş olup, bu sonuçlar daha önceki çalışmalarla uyumludur^{16,21,28,30}.

Bu çalışmada *ermB* geni sadece bir MRSA izolatında *ermA* geni ile birlikte saptanmıştır. Benzeri diğer çalışmalarda da, *ermB* geni stafilokok izolatlarında nadir olarak bildirilmektedir^{21,25,28}.

Sonuç olarak; Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde yatan hastalardan izole edilen stafilokoklarda MLS_B direncinde son yıllarda %9.3 oranında bir artış olmuş ve en sık görülen direnç fenotipi yapısal dirençten indüklenebilir dirence değişmiştir. Ancak bu izolatlarda saptanan direnç genleri bir önceki çalışmamızdakine benzer bir dağılım göstermiştir. Telitromisin, MLS_B dirençli mikroorganizmalara bağlı enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek bir antibiyotiktir. Ancak bu çalışmada ilginç bir bulgu olarak tüm iMLS_B ve MS_B dirençli stafilokok izolatlarında, telitromisin diskinin etrafında D-şeklinde inhibisyon zonu gözlenmiştir. Davis ve arkadaşlarının¹² çalışmalarında da gösterildiği gibi bu bulgu telitromisin direncinin indüklenebilir olduğunu düşündürülebilir de bu fenotipik sonucun, bilgimiz dahilinde henüz tam olarak mekanizması açıklanmamıştır. Bu bulgunun gerçekten indüklenebilir bir direnci gösterip göstermediğinin anlaşılabilmesi için bu konuda yapılacak ileri çalışmalara gereksinim vardır. Öte yandan bu çalışmanın sonuçları diğer merkezlerde de makrolid direnci gösteren stafilokoklarda telitromisine karşı direnç durumunun belirlenerek, tedavide kullanımının direnç durumuna göre planlanması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Eritromisine dirençli stafilokoklarda MLS_B direnci araştırılırken, "disk yaklaştırma yöntemi"ne telitromisin diskinin de dahil edilmesi ve ayrıca dilüsyon testleri ile telitromisin için OlMK değerlerinin saptanarak duyarlılık belirlenmesi gerektiğini söylemek de yanlış olmayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Nakajima Y. Mechanisms of bacterial resistance to macrolide antibiotics. J Infect Chemother 1999; 5: 61-74.
2. Roberts MC, Sutcliffe J, Courvalin P, Jensen LB, Rood J, Seppala H. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 2823-30.
3. Leclercq R, Courvalin P. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35: 1267-72.
4. Prunier AL, Malbrun Y, Tande D, Picard B, Leclercq R. Clinical isolates of *Staphylococcus aureus* with ribosomal mutations conferring resistance to macrolides. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 3054-6.
5. Wondrack L, Massa M, Yang BV, Sutcliffe J. Clinical strain of *Staphylococcus aureus* inactivates and causes efflux of macrolides. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 992-8.
6. Boswell FJ, Andrews JM, Ashby JP, Fogarty C, Brenwald NP, Wise R. The in-vitro activity of HMR 3647, a new ketolide antimicrobial agent. J Antimicrob Chemother 1998; 42: 703-9.
7. Leclercq R. Overcoming antimicrobial resistance: profile of a new ketolide antibacterial, telithromycin. J Antimicrob Chemother 2001; 48 (Suppl T1): 9-23.
8. Schülin T, Wennersten CB, Moellering RC Jr, Eliopoulos GM. In-vitro activity of the new ketolide antibiotic HMR 3647 against gram-positive bacteria. J Antimicrob Chemother 1998; 42: 297-301.
9. Douthwaite S, Hansen LH, Mauvais P. Macrolide-ketolide inhibition of MLS-resistant ribosomes is improved by alternative drug interaction with domain II of 23S rRNA. Mol Microbiol 2000; 36: 183-93.
10. Douthwaite S, Champney WS. Structures of ketolides and macrolides determine their mode of interaction with the ribosomal target site. J Antimicrob Chemother 2001; 48 (Suppl T1): 1-8.
11. Liu M, Douthwaite S. Activity of the ketolide telithromycin is refractory to *erm* monomethylation of bacterial rRNA. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 1629-33.
12. Davis KA, Crawford SA, Fiebelkorn KR, Jorgensen JH. Induction of telithromycin resistance by erythromycin in isolates of macrolide-resistant *Staphylococcus* spp. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 3059-61.
13. Hamilton-Miller JM, Shah S. Comparative in-vitro activity of ketolide HMR 3647 and four macrolides gram-positive cocci of known erythromycin susceptibility status. J Antimicrob Chemother 1998; 41: 649-53.
14. Hamilton-Miller JM, Shah S. Patterns of phenotypic resistance to the macrolide-lincosamide-ketolide-streptogramin group of antibiotics in staphylococci. J Antimicrob Chemother 2000; 46: 941-9.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eighteenth informational supplement, M100-S18, 2008. CLSI, Wayne, PA.
16. Fiebelkorn KR, Crawford SA, McElmeel ML, Jorgensen JH. Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol 2003; 41: 4740-4.
17. Jorgensen JH, Crawford SA, McElmeel ML, Fiebelkorn KR. Detection of inducible clindamycin resistance of staphylococci in conjunction with performance of automated broth susceptibility testing. J Clin Microbiol 2004; 42: 1800-2.
18. Steward CD, Raney PM, Morrell AK, et al. Testing for induction of clindamycin resistance in erythromycin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol 2005; 43: 1716-21.
19. Jensen WD, Thakker-Varia S, Dubin DT, Weinstein MP. Prevalence of macrolides-lincosamides-streptogramin B resistance and *erm* gene classes among clinical strains of staphylococci and streptococci. Antimicrob Agents Chemother 1987; 31: 883-8.
20. Sambrook J, Russell DW. Preparation of plasmid DNA by boiling lysis, pp: 1.43-1.50. In: Sambrook J, Russell DW (eds), Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2001, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
21. Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch F, Etienne J. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 1062-6.

22. Tunckanat F, Arikan S. Phenotypes of staphylococcal resistance to macrolides-lincosamides-streptogramin B (MLS) in a Turkish university hospital. *Zentralbl Bakteriol* 2000; 289: 827-33.
23. Cetin ES, Gunes H, Kaya S, Aridogan BC, Demirci M. Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotypes in clinical staphylococcal isolates. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31: 364-8.
24. Saribas Z, Tunckanat F, Pinar A. Prevalence of *erm* genes encoding macrolide-lincosamide-streptogramin (MLS) resistance among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in a Turkish university hospital. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12: 797-9.
25. Otsuka T, Zaraket H, Takano T, et al. Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotypes and genotypes among *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Japan. *Clin Microbiol Infect* 2007; 13: 325-7.
26. Melter O, Aires de Sousa M, Urbaskova P, Jakubu V, Zemlickova H, de Lencastre H. Update on the major clonal types of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Czech Republic. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4998-5005.
27. Aktas Z, Aridogan A, Kayacan CB, Aydin D. Resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in staphylococci isolated in Istanbul, Turkey. *J Microbiol* 2007; 45: 286-90.
28. Lim JA, Kwon AR, Kim SK, Chong Y, Lee K, Choi EC. Prevalence of resistance to macrolide, lincosamide, streptogramin antibiotics in gram-positive cocci isolated in a Korean hospital. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49: 489-95.
29. Yoon EJ, Kwon AR, Min YH, Choi EC. Foggy D-shaped zone of inhibition in *Staphylococcus aureus* owing to a dual character of both inducible and constitutive resistance to macrolide-lincosamide-streptogramin B. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61: 533-40.
30. Martineau F, Picard FJ, Lansac N, 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.