

Koagülaz-Negatif Stafilokoklarda Makrolid-Linkozamid-Streptogramin B Grubu Antibiyotiklere Karşı Nadir Direnç Genlerinin Araştırılması*

Investigation of the Rare Genes Related to Resistance to Macrolide-Lincosamide and Streptogramin B Group Antibiotics Among Coagulase-Negative Staphylococci

Havva ŞAKAR¹, İpek MUMCUOĞLU¹, Neriman AKSU¹, Zeynep Ceren KARAHAN², Şenol KURŞUN¹, Semra KUŞTİMUR³

¹ Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, Ankara.

¹ Ankara Numune Training and Research Hospital, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

² Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

² Ankara University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

³ Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

³ Gazi University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

* Bu çalışma tıpta uzmanlık tezi çalışması olarak yapılmış ve 34. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (07-11 Kasım 2010 Girne, KKTC)'nde poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 24.05.2011 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 28.11.2011

ÖZET

Stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde makrolid, linkozamid ve streptogramin B (MLS_B) grubu antibiyotikler ilk seçenek olarak önerilmektedir. Bu gruptaki antibiyotiklerin hepsi bakteri ribozomunun 50S alt ünitesine bağlandıkları için çapraz direnç gelişimi önemli bir sorundur. Dirençten sorumlu mekanizmalar arasında; (a) *erm* genlerinin kodladığı metilazlar yoluyla ribozomal hedefin modifikasyonu, (b) *msrA*, *msrB*, *vga*, *vgb* genlerinin sorumlu olduğu ilacın hücre dışına atılması ve (c) *linA*, *vat*, *vatB* genlerinin sorumlu olduğu ilacın enzimatik inaktivasyonu yer almaktadır. En sık görülen direnç genleri *erm* ve *msr* iken, çeşitli çalışmalarda *linA*, *vga*, *vgb*, *vat* ve *vatB* genlerinin varlığından da söz edilmektedir. Bu çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen 454 koagülaz-negatif stafilokok (KNS) suşunda nadir bildirilen MLS_B direnç genleri incelenmiş ve *erm*, *msr* genleriyle birlikte bulunma sıklıkları araştırılmıştır. KNS izolatlarının %46.5 (n= 211)'i *Staphylococcus hominis*, %30.8 (n= 140)'i *Staphylococcus epidermidis*,

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. İpek Mumcuoğlu, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, Talatpaşa Bulvarı No: 5 Altındağ, Ankara, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 312 508 4000, **E-posta (E-mail):** ipeknumcuoglu@hotmail.com

%12.1 (n= 55)'i *Staphylococcus haemolyticus*, %3.5 (n= 16)'i *Staphylococcus warnerii* ve %7 (n= 32)'si diğer türlerden oluşmaktadır. Suşların direnç fenotipleri, "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" önerilerine göre D-test yöntemi uygulanarak belirlenmiştir. D-test ile suşların 107 (%23.6)'si M (eritromisine dirençli ve D-test ile indüklenebilir klindamisin direnci tespit edilmeyen fenotip), 92 (%20.3)'si iMLS_B (D-test ile indüklenebilir klindamisin direnci tespit edilen fenotip) ve 110 (%24.2)'u cMLS_B (yapısal olarak eritromisin ve klindamisin direncinin görüldüğü fenotip) fenotipi olarak saptanmıştır. iMLS_B (n= 92) ve cMLS_B (n= 110) fenotipi gösteren suşların tamamı ile M fenotipi gösteren 107 suş arasından rastgele seçilen 46 suş, *linA*, *vga*, *vgb*, *vat*, *vatB*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA* ve *msrB* genlerinin varlığı açısından polimeraz zincir reaksiyonu yöntemiyle incelenmiştir. Tek başına veya *erm* ve/veya *msr* genleriyle kombine olarak 91 (%20) suşta *linA*, 19 (%4.2) suşta *vga* gen varlığı saptanmıştır. *linA* geni; iMLS_B, cMLS_B ve M fenotipi gösteren suşların sırasıyla %52, %26 ve %13'ünde tespit edilirken, *vga* geni sırasıyla %5.4, %12 ve %0.9 suşta gösterilmiştir. iMLS_B ve cMLS_B fenotipi gösteren suşlarda en sık görülen direnç geni *ermC* iken (sırasıyla; %32.6 ve %42.7), bunu *ermC* + *linA* gen kombinasyonu (sırasıyla; %31.5 ve %14.5) izlemiştir. M fenotipi gösteren suşlarda en sık görülen direnç *msrA* ve *msrB* gen kombinasyonu (%34.8) olmuş, ikinci sırayı *msrA* + *msrB* + *linA* (%19.1) kombinasyonu almıştır. Çalışmaya alınan hiçbir izolatta *vgb*, *vat* ve *vatB* genleri belirlenmemiştir. Ülkemizde daha önce yapılmış MLS_B grubu antibiyotiklere karşı nadir görülen direnç genleriyle ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma *linA*, *vga*, *vgb*, *vat* ve *vatB* genlerinin sıklığına ait ilk rapordur. Sonuç olarak, *linA* ve *vga* genlerinin yüksek sıklıkta görülmesi epidemiyolojik gen çalışmalarında bu genlerin de araştırılmaları gerektiğini göstermektedir.

Anahtar sözcükler: Koagülaz-negatif stafilokok; MLS_B; D-test; direnç geni; *erm*; *msr*; *linA*; *vga*; *vgb*; *vat*; *vatB*.

ABSTRACT

Macrolide-lincosamide-streptogramin B (MLS_B) group antibiotics are recommended as first choice in the treatment of staphylococcal infections. All of those drugs bind to the 50S subunit of bacterial ribosomes, thus cross-resistance is a major concern in this group of drugs. The mechanisms associated to resistance are (a) ribosomal methylation due to the methylases encoded by *erm* genes, (b) active drug efflux due to *msrA*, *msrB*, *vga*, *vgb* gene activity, (c) enzymatic inactivation of the drug due to the activity of *linA*, *vat*, *vatB* genes. While the most common resistance genes are *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA* and *msrB* genes; *linA*, *vga*, *vgb*, *vat* and *vatB* genes have also been found in some studies. In this study it was aimed to investigate the presence of the rare MLS_B resistance genes and their coexistence with *erm* and *msr* genes in 454 clinical isolates of coagulase-negative staphylococci (CNS). Of them 46.5% (n= 211) were *S.hominis*, 30.8% (n= 140) were *S.epidermidis*, 12.1% (n= 55) were *S.haemolyticus*, 3.5% (n= 16) were *S.warnerii* and 7% (n= 32) were the other coagulase-negative staphylococcal species. Resistance phenotypes were determined by using D-test method according to the recommendation of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). With the D-test 107 (23.6%) strains were determined as M phenotype (resistant to erythromycin and inducible clindamycin resistance was not detected), 92 (20.3%) were iMLS_B phenotype (inducible clindamycin resistance was detected by the D-test) and 110 (24.2%) were cMLS_B phenotype (constitutive erythromycin and clindamycin resistance was detected). *linA*, *vga*, *vgb*, *vat*, *vatB*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA*, *msrB* genes were investigated by polymerase chain reaction in all strains showing iMLS_B (n= 92) and cMLS_B (n= 110) phenotypes and 46 randomly selected strains among 107 strains exhibiting the M phenotype. *linA* gene was found in 91 (20%) strains as single gene or in combination with *erm* or *msr* genes, and *vga* gene was found in 19 (4.2%) strains. *linA* gene was found in 52% of iMLS_B phenotype, in 26% of cMLS_B phenotype and 13% of M phenotype while *vga* gene was found in 5.4% of iMLS_B phenotype, in 12% of cMLS_B phenotype and in 0.9% of M phenotype. The most common resistance gene among iMLS_B and cMLS_B phenotypes was *ermC* (32.6% and 42.7%, respectively), followed by *ermC* + *linA* gene combination (31.5% and 14.5%, respectively). The most frequent gene combination was *msrA* and *msrB* in M phenotype (34.8%) and it was followed by a combination of *msrA* + *msrB* + *linA* genes (19.1%). None of the strains revealed presence of *vgb*, *vat* and

vatB genes. There were no previous reports about the rarely detected resistance genes against MLS_B antibiotics in our country. This was the first study which reported the frequency of *linA*, *vga*, *vgb*, *vat* and *vatB* genes in MLS_B resistant CNS. In conclusion, since *linA* and *vga* genes were detected in high frequency in MLS_B resistant CNS in this study, it was thought that the investigation of these genes should be included in the further related epidemiologic gene research.

Key words: *Coagulase-negative staphylococci*, MLS_B; *D-test*; *resistance gene*; *erm*; *msr*; *linA*; *vga*; *vgb*; *vat*; *vatB*.

GİRİŞ

Deri ve mukozaların normal florasında bulunan ve geçmişte sıklıkla kontaminant bakteri olarak değerlendirilen koagülaz-negatif stafilokok (KNS) suşları, günümüzde invazif uygulamaların artmasıyla birlikte en sık izole edilen mikroorganizmalar arasında yer almıştır¹⁻³. KNS'lerin özellikle nozokomiyal bakteriyemi etkeni olarak önem kazanmaları bu bakterilerdeki antimikrobiyal direnç sorununu gündeme getirmiştir. Stafilokoklar günümüzde glikopeptid antibiyotikler de dahil olmak üzere birçok antibiyotiğe direnç geliştirmiştir⁴⁻⁵.

Makrolid, linkozamid ve streptogramin B (MLS_B) grubu antibiyotikler, stafilokok enfeksiyonlarının tedavisinde ilk seçenek olarak önerilmektedir. Ancak, MLS_B grubu antibiyotiklerin bakteri ribozomundaki bağlanma bölgeleri örtüştüğü için çapraz direnç gelişimi önemli bir sorundur. Dirençten üç farklı mekanizma sorumlu olup en sık görüleni eritromisin ribozomal metilaz (*erm*) genlerinin kodladığı metilazlar yoluyla oluşan ribozomal hedefin modifikasyonudur⁶. Tespit edilen diğer direnç mekanizmaları; *msrA*, *msrB*, *vga*, *vgb* genlerinin sorumlu olduğu ilacın hücre dışına atılması (efluks) ve *linA*, *vat*, *vatB* genlerinin sorumlu olduğu ilacın enzimatik inaktivasyonudur⁶⁻⁸. Makrolid direnci yapısal ya da indüklenebilir olabilir⁹. Yapısal direnç disk difüzyon testiyle rahatlıkla gözlemlenirken, indüklenebilir direncin ortaya konulması için "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" önerilerine göre D-test yönteminin uygulanması gerekir. Yapısal dirençte tüm 16 üyeli makrolidlere direnç gelişirken, indüklenebilir MLS_B (iMLS_B) direnci taşıyan suşlar 14 ve 15 üyeli makrolidlere dirençli, 16 üyeli makrolidlere duyarlıdır^{6,10}. Böylece yapısal MLS_B dirençli (cMLS_B) suşlar bu gruptaki antibiyotiklerin tümüne dirençli iken, indüklenebilir dirençli (iMLS_B) suşlar linkozamid ve streptogramin B'ye duyarlı, ancak makrolidlere dirençli görülmektedir⁷. Direnç nedeniyle oluşan tedavi başarısızlığını en aza indirmek ve gereksiz antibiyotik kullanımını önlemek için direnç mekanizmalarının iyi bilinmesi ve tespit edilmesi önemlidir.

MLS_B direncinin sıklığı ülkeden ülkeye hatta aynı ülkede merkezler, hasta grupları ve bakteri türleri arasında değişkenlik göstermektedir⁷. Bölgesel MLS_B direnç fenotiplerinin, bu direncin moleküler temelini ortaya koyacak gen analizleriyle doğrulanarak belirlenmesi, klinisyene ampirik tedavinin seçiminde yardım edeceği gibi, laboratuvarın doğru ve güvenilir sonuç vermesini de sağlayacaktır. Ülkemizde MLS_B direnci ile ilgili fenotipik çalışmalar olmasına rağmen genotipik çalışmalar azdır. Ayrıca, dirence neden olan nadir genlerin belirlenmesi konusunda bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışmada çeşitli kli-

nik örneklerden izole edilen KNS suşlarında nadir bildirilen MLS_B direnç genleri incelenmiş ve *erm*, *msr* genleriyle birlikte bulunma sıklıkları araştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 454 adet KNS suşu dahil edildi. KNS'lerin tür düzeyinde tanımlanması GP kartları ve antibiyotik duyarlılığı AST-P535 kartları kullanılarak VITEK sistemi (bioMerieux, Fransa) ile yapıldı. Tanımlanan ve antibiyotik duyarlılıkları belirlenen tüm suşlara CLSI önerilerine uygun olarak D-test yöntemi uygulandı¹¹. Bu amaçla, eritromisin (15 µg, BD BBL) ve klindamisin (2 µg, BD BBL) diski 15-26 mm mesafeye yerleştirildi. Kontrol suşu olarak *S.aureus* 25923 (makrolid ve klindamisine duyarlı; direnç genlerini içermeyen suş) kullanıldı. Klindamisin zonunun eritromisine bakan tarafında düzleşme olmuşsa indüklenebilir klindamisin direnci (D-test pozitif, iMLS_B direnç fenotipi); eritromisine dirençli, klindamisine duyarlı ve düzleşme olmaksızın dairesel bir inhibisyon alanı oluşmuşsa indüklenebilir klindamisin direnci negatif (D-test negatif, M direnç fenotipi) olarak değerlendirildi. Eritromisin ve klindamisinin her ikisine de dirençli ise yapısal direnç fenotipi (cMLS_B) olarak kabul edildi⁶.

iMLS_B, cMLS_B fenotipi gösteren tüm suşlarda ve rastgele seçilen 46 M tipi suшта direnç genlerinin varlığı, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırıldı. Bu amaçla kanlı agar da üretilen suşlardan DNA ekstraksiyonu, fenol-kloroform yöntemiyle gerçekleştirildi¹². *linA*, *vga*, *vgb*, *vat*, *vatB*, *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA* ve *msrB* genleri sırasıyla *linA* F (5' GGT GGC TGG GGG GTA GAT GTA TTA ACT GG 3') ve *linA* R (5' GCT TCT TTT GAA ATA CAT GGT ATT TTT CGA TC 3'); *vga* F (5' CCA GAA CTG CTA TTA GCA GAT GAA 3') ve *vga* R (5' AAG TTC GTT TCT CTT TTC GAC G 3'); *vgb* F (5' ACT AAC CAA GAT ACA GGA CC 3') ve *vgb* R (5' TTA TTG CTT GTC AGC CTT CC 3'); *vat* F (5' CAA TGA CCA TGG ACC TGA TC 3') ve *vat* R (5' CTT CAG CAT TTC GAT ATC TCC 3'); *vatB* F (5' CCC TGA TCC AAA TAG CAT ATA TCC 3') ve *vatB* R (5' CTA AAT CAG AGC TAC AAA GTG 3'); *ermA* F (5' GTT CAA GAA CAA TCA ATA CAG AG3') ve *ermA* R (5' GGA TCA GGA AAA GGA CAT TTT AC 3'); *ermB* F (5' CCG TTT ACG AAA TTG GAA CAG GTA AAG GGC 3') ve *ermB* R (5' GAA TCG AGA CTT GAG TGT GC 3'); *ermC* F (5' GCT AAT ATT GTT TAA ATC GTC AAT TCC 3') ve *ermC* R (5' GGA TCA GGA AAA GGA CAT TTT AC 3'); *msrA* F (5' GGC ACA ATA AGA GTG TTT AAA GG3') ve *msrA* R (5' AAG TTA TAT CAT GAA TAG ATT GTC CTG TT3'); *msrB* F (5' TAT GAT ATC CAT AAT AAT TAT CCA ATC 3') ve *msrB* R (5' AAT TTA TAT CAT GAA TAG ATT GTC CTG TT 3') primerleri kullanılarak PCR protokolü ile yapıldı¹³. Elde edilen PCR örnekleri 0.5X TBE tamponu içinde %2'lik (wt/vol) agaroz jele yüklenerek 100 voltta bir saat yürütüldü. Daha sonra etidyum bromür ile boyanarak ultraviyole transilüminatör (TFX 20M, Vilber Lourmat, Fransa) altında görüntülendi. Elde edilen bant paternleri, moleküler büyüklük belirteci (50 bç O'Range Ruler, Fermentas, Litvanya) standart alınarak değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan KNS izolatlarının %46.5 (211/454)'i *S.hominis*, %30.8 (140/454)'i *S.epidermidis*, %12.1 (55/454)'i *S.haemolyticus* ve %10.6 (48/454)'sı diğer türler olarak

tanımlanmıştır (Tablo I). D-test yöntemiyle suşların 107 (%23.6)'si M, 92 (%20.3)'si iMLS_B ve 110 (%24.2)'u cMLS_B fenotipi olarak belirlenmiştir (Tablo I). VITEK sistemi ile AST-P535 kartı kullanılarak yapılan değerlendirilmede tüm suşlar kinupristin-dalfopristine duyarlı bulunmuştur.

iMLS_B, cMLS_B ve M fenotipi gösteren suşlarda tespit edilen tüm direnç genleri ve gen kombinasyonları Tablo II'de görülmektedir. Çalışılan hiçbir izolatta *vgb*, *vat*, *vatB* genleri belirlenmemiştir. *linA* geni; iMLS_B, cMLS_B ve M fenotipi gösteren suşların sırasıyla 48 (%52), 29 (%26) ve 14 (%13)'ünde tespit edilirken, *vga* geni sırasıyla 5 (%5.4), 13 (%12) ve 1 (%0.9) suшта gösterilmiştir. *linA* geninden başka direnç geninin tespit edilmediği iMLS_B, cMLS_B ve M fenotipi suşlarının sayısı sırasıyla 5 (%5.4), 3 (%0.3), 1 (%0.9) olarak bulunurken, bu suşlardan sekizinin *S.hominis*, birinin cMLS_B fenotipinde *S.epidermidis* suşu olduğu izlenmiştir. Tek başına *vga* geni, cMLS_B fenotipli 3 (%0.3) suшта belirlenmiş ve bunlardan ikisinin *S.hominis*, birinin *S.warnerii* olduğu görülmüştür. Tek başına veya diğer genlerle kombine olarak *linA* ve *vga* geni taşıdığı tespit edilen KNS suşları Tablo III'te verilmiştir.

iMLS_B fenotipinde en fazla *ermC* (%32.6) geninin bulunduğu, *ermC* + *linA* gen kombinasyonunun ise ikinci sıklıkta (%31.5) olduğu görülmüştür. Bir suшта hiçbir direnç genine rastlanmamıştır. cMLS_B fenotipi gösteren suşlar arasında *ermC* (%42.7) en sık görülen gen olup, bunu *ermC* + *linA* gen kombinasyonu (%14.5) izlemiştir. Dokuz suшта araştırılan hiçbir direnç geni bulunamamıştır. M fenotipi gösteren suşlar arasında ise en faz-

Tablo I. İzole Edilen KNS Türleri ve Direnç Fenotiplerinin Dağılımı

KNS türü (sayı)	Direnç fenotipleri					
	M		iMLS _B		cMLS _B	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
<i>S.hominis</i> (211)	43	20.4	62	29.4	53	25.1
<i>S.epidermidis</i> (140)	20	14.3	20	14.3	44	31.4
<i>S.haemolyticus</i> (55)	32	58.2	9	16.4	10	18.2
<i>S.warnerii</i> (16)	7	43.8	1	6.3	1	6.3
<i>S.capitis</i> (6)	0	0	0	0	0	0
<i>S.sciuri</i> (5)	2	40	0	0	2	40
<i>S.simulans</i> (3)	0	0	0	0	0	0
<i>S.chromogenes</i> (3)	0	0	0	0	0	0
<i>S.cohnii</i> (1)	1	100	0	0	0	0
<i>S.lugdunensis</i> (1)	0	0	0	0	0	0
Diğer (13)	2	15.4	0	0	0	0
Toplam (454)	107	23.6	92	20.3	110	24.2

KNS: Koagülaz-negatif stafilokok; M: Eritromisine dirençli ve D-test ile indüklenebilir klindamisin direnci tespit edilmeyen fenotip; iMLS_B: D-test ile indüklenebilir klindamisin direnci tespit edilen fenotip; cMLS_B: Yapısal olarak eritromisin ve klindamisin direncinin görüldüğü fenotip.

Tablo II. Çalışmaya Alınan Suşlarda Bulunan Direnç Gen ve Gen Kombinasyonları

Direnç gen(ler)i	iMLS _B (n= 92)	cMLS _B (n= 110)	M (n= 46)
<i>linA</i>	5	3	1
<i>ermA</i> + <i>linA</i>	1	4	0
<i>ermC</i> + <i>linA</i>	29	16	1
<i>ermA</i> + <i>ermC</i> + <i>linA</i>	1	0	0
<i>msrB</i> + <i>linA</i>	1	0	1
<i>msrA</i> + <i>msrB</i> + <i>linA</i>	2	1	9
<i>ermC</i> + <i>msrA</i> + <i>msrB</i> + <i>linA</i>	6	3	2
<i>vga</i>	0	3	0
<i>linA</i> + <i>vga</i>	1	0	0
<i>ermA</i> + <i>vga</i>	1	1	0
<i>ermC</i> + <i>msrA</i> + <i>msrB</i> + <i>vga</i>	1	2	0
<i>ermC</i> + <i>linA</i> + <i>vga</i>	1	1	0
<i>msrA</i> + <i>msrB</i> + <i>linA</i> + <i>vga</i>	1	0	0
<i>ermC</i> + <i>vga</i>	0	3	0
<i>ermA</i> + <i>linA</i> + <i>vga</i>	0	1	0
<i>ermA</i> + <i>msrA</i> + <i>msrB</i> + <i>vga</i>	0	2	0
<i>msrA</i> + <i>msrB</i> + <i>vga</i>	0	0	1
<i>ermC</i>	30	47	1
<i>ermA</i>	2	4	4
<i>msrA</i>	0	1	0
<i>msrB</i>	1	0	1
<i>ermA</i> + <i>ermC</i>	2	3	1
<i>msrA</i> + <i>msrB</i>	2	2	16
<i>ermA</i> + <i>ermC</i> + <i>msrA</i> + <i>msrB</i>	3	0	0
<i>ermA</i> + <i>msrA</i> + <i>msrB</i>	1	4	1
<i>ermC</i> + <i>msrA</i> + <i>msrB</i>	0	0	3
Gen yok	1	9	4

M: Eritromisine dirençli ve D-test ile indüklebilir klindamisin direnci tespit edilmeyen fenotip; iMLS_B: D-test ile indüklebilir klindamisin direnci tespit edilen fenotip; cMLS_B: Yapısal olarak eritromisin ve klindamisin direncinin görüldüğü fenotip.

la (%34.8) *msrA* ve *msrB* gen kombinasyonu görülürken, ikinci sırayı *msrA* + *msrB* + *linA* gen kombinasyonu (%19.1) almıştır. Dört suшта hiçbir direnç geni bulunamamıştır. Direnç genleri için elektroforez görüntüleri Resim 1’de verilmiştir.

TARTIŞMA

Stafilokoklarda MLS_B direncinden sorumlu mekanizmalar ile ilgili olarak, ülkemizde yapılan çalışmalarda sadece *erm* ve *msr* genleri araştırılmış, diğer direnç genleriyle ilgili

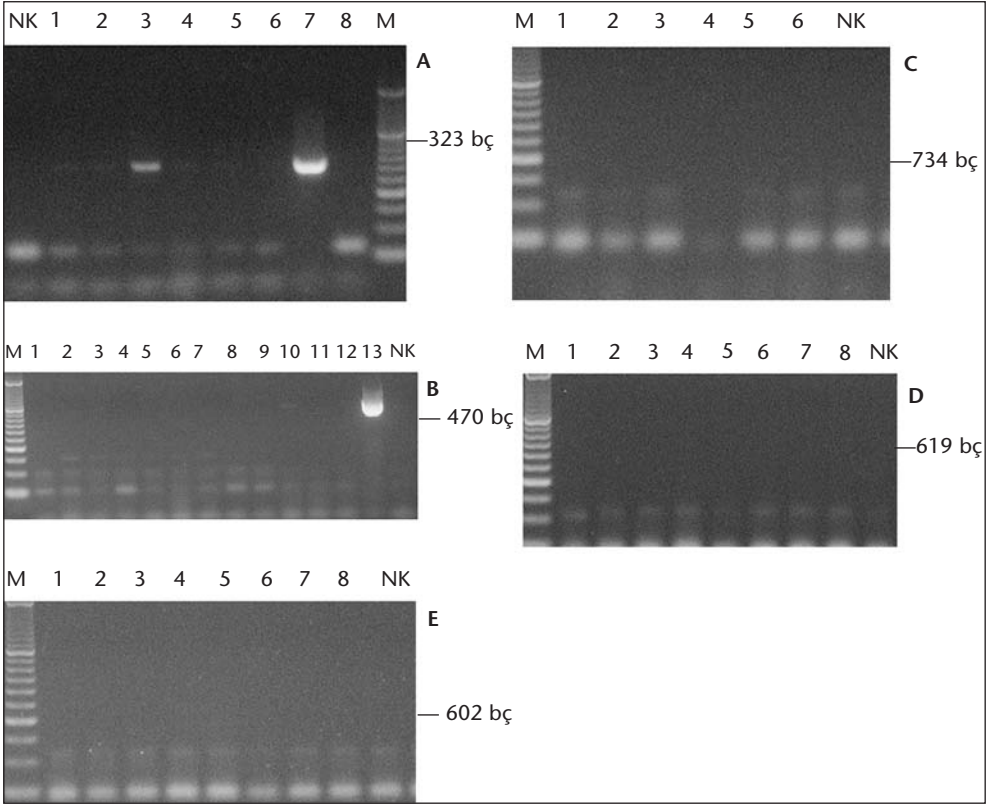
Tablo III. Tek Başına veya Diğer Genlerle Kombine Olarak *linA* ve *vga* Geni Taşıdığı Tespit Edilen KNS Suşlarının Dağılımı

		<i>linA</i>	<i>vga</i>
<i>S.hominis</i>	cMLS _B	13	5
	iMLS _B	36	2
	MS	5	0
<i>S.epidermidis</i>	cMLS _B	15	6
	iMLS _B	7	2
	M	7	1
<i>S.haemolyticus</i>	cMLS _B	1	1
	iMLS _B	3	1
	M	1	0
<i>S.warnerii</i>	cMLS _B	0	1
	iMLS _B	1	0
	M	2	0
Toplam		91	19

KNS: Koagülaz-negatif stafilokok; M: Eritromisine dirençli ve D-test ile indüklenbilir klindamisin direnci tespit edilmeyen fenotip; iMLS_B: D-test ile indüklenbilir klindamisin direnci tespit edilen fenotip; cMLS_B: Yapısal olarak eritromisin ve klindamisin direncinin görüldüğü fenotip.

bir çalışmaya rastlanmamıştır¹⁴⁻¹⁸. Bu çalışma, ülkemizde MLS_B direncinden sorumlu diğer direnç genlerinin araştırıldığı ilk çalışma özelliğini taşımaktadır. Konu ile ilgili ilk yurt dışı çalışmada, Allignet ve arkadaşları¹⁹ streptogramin A'ya dirençli 20 KNS suşunda *vga*, *vgb*, *vat* ve *vatB* genlerini PCR yöntemiyle araştırmışlar; 12 *S.epidermidis* suşunun *vga*, birer suşun ise *vatB* ve *vga* + *vatB* gen kombinasyonu taşıdığını belirlemişlerdir. Bu araştırmacılar, dört *S.haemolyticus* suşunun üçünde tek başına *vga* geni, birinde ise *vga* + *vat* + *vgb* gen kombinasyonu saptarken, bir *S.simulans* ve bir *S.cohnii* subsp. *urealyticum* suşunda da *vga* + *vat* + *vgb* gen kombinasyonunu göstermişlerdir¹⁹. Lina ve arkadaşları¹³ yaptıkları çalışmada makrolid, linkozamid ve/veya streptogramine dirençli 150 KNS ve 144 *S.aureus* izolatında *erm*, *msr*, *vga*, *vgb*, *vat*, *vatB* ve *linA/linA* genlerini incelemişler; bu genlerin hepsinin KNS'lerde *S.aureus* suşlarına göre daha fazla görüldüğünü bildirmişlerdir. Bu araştırmacılar, bizim çalışmamıza benzer olarak nadir genleri dirençten tek başına sorumlu olarak değil, *erm* ve *msr* genleriyle kombine olarak bulmuşlar; ayrıca yedi suşun bu direnç genlerinden hiçbirini taşımadığını göstermişlerdir¹³. Bizim çalışmamızda da 14 suşta hiçbir direnç geninin bulunmaması, tespit edilmemiş başka direnç genleri olduğunu düşündürmektedir. Bemer ve arkadaşları²⁰ ise diğer çalışmalardan farklı olarak, *S.epidermidis* suşlarında *erm* ve *msr* genlerine rastlanmamışlardır. İncelenen 12 *S.epidermidis* suşundan dokuzunun yalnız *vga*, birinin yalnız *vga* ve birinin de *vga* + *vgb* kombinasyonu taşıdığını göstermişlerdir²⁰.

Bizim çalışmamızda iMLS_B fenotipi gösteren 92 suş değerlendirilmiş ve en sık (29 suş, %31.5) *ermC* + *linA* gen kombinasyonu görülmüştür. Lina ve arkadaşlarının¹³ yaptığı ça-



Resim 1. A: *linA* PCR sonuçları (3,7 pozitif izolatlar); B: *vga* PCR sonuçları (13 pozitif izolat); C: *vgb* PCR sonuçları (1-6 negatif izolatlar); D: *vat* PCR sonuçları (1-8 negatif izolatlar); E: *vatB* PCR sonuçları (1-8 negatif izolatlar) [M: 50 bp moleküler büyüklük belirteci (O'Range Ruler, Fermentas, Litvanya); NK: Negatif kontrol].

İşimada yalnız bir *S.epidermidis* suşunda *linA* + *ermC* gen kombinasyonu bulunmuştur. Bemer ve arkadaşlarının²⁰ çalışmasında ise sadece *S.aureus* suşlarında bu gen kombinasyonları belirlenmiş, KNS'lerde bulunmamıştır. Lecrecq ve arkadaşları²¹ 15 KNS suşunda sadece *linA* geni bulurken, Lina ve arkadaşları¹³ iki *S.epidermidis* suşunda sadece *linA* geni belirlemişlerdir. Çalışmamızda ise beş suşun yalnız *linA* geni taşıdığı bulunmuştur. Sadece *vga* geni varlığı da, Allignet ve arkadaşlarının¹⁹ çalışmasında 15 KNS suşunda, Lina ve arkadaşlarının¹³ çalışmasında üç KNS suşunda, Bemer ve arkadaşlarının²⁰ çalışmasında ise 10 *S.epidermidis* suşunda tespit edilmiştir. Çalışmamızda, tüm bu çalışmalardan farklı olarak iMLS_B fenotipi olup yalnız *vga* geni taşıyan hiçbir suş belirlenmemiştir. Ayrıca çalışmamızda iMLS_B fenotipi gösteren altı KNS suşunda *ermC* + *msrA* + *msrB* + *linA* gen kombinasyonu bulunmuştur. Tüm bu çalışmaların sonuçlarındaki farklılıklar, direnç paternlerinin bölgelere göre değişebileceğinin ve her bölgenin kendi epidemiyolojik çalışmalarını yapması gerektiğinin göstergesidir.

Araştırmamızda cMLS_B fenotipi gösteren suşlar değerlendirildiğinde; en sık (%14.5) saptanan gen kombinasyonu *ermC* + *linA* olmuş, altı suşa yalnız *vga* geni bulunmuş-

tur. Lina ve arkadaşlarının¹³ çalışmasında *vga* + *erm* genleri kombinasyonu yedi suşta saptanmıştır. Bu sonuçlar, bölgesel farklılıklar için iyi bir örnek oluşturmaktadır. Ayrıca, çalışmamızda cMLS_B fenotipi gösteren dokuz suşta araştırılan hiçbir direnç geninin bulunmaması, bu fenotipte tespit edilmemiş başka direnç genleri olduğunu düşündürmektedir.

MS fenotipi gösteren suşlardan çalışmaya alınan 46 izolatta en sık (16 suş) *msrA* + *msrB* gen kombinasyonu görülmüş, bunu dokuz suşla *msrA* + *msrB* + *linA* kombinasyonu izlemiştir. Bir suşta *vga* geni bulunmuş, dört suşta ise hiçbir direnç geni belirlenmemiştir. M fenotipi gösteren suşlarda, diğer fenotiplerden farklı olarak dirençten sıklıkla efluks pompalarının sorumlu olduğu düşünülmüştür. Yapılan diğer çalışmalardan farklı olarak, çalışmamızda iMLS_B ve cMLS_B fenotipi gösteren suşlarda *erm* ve/veya *msr* genleriyle birlikte *linA* ve/veya *vga* gen kombinasyonları daha sık belirlenmiştir. Çalışmamızda bir diğer dikkat çekici nokta ise; diğer araştırmalardan^{13,19-21} farklı olarak hiçbir suşta *vgb*, *vat* ve *vatB* genini belirlememiş olmamızdır.

Ülkemizde bugüne kadar yapılan çalışmalarda sadece *erm* ve *msr* genleri çalışılmıştır. Aktaş ve arkadaşları¹⁴ tarafından yapılan çalışmada, KNS suşları arasında cMLS_B (%57.8), iMLS_B (%20.6) ve M (%21.6) oranları bizim çalışmamızdan daha yüksek bulunmuş; dirençten en sık sorumlu olan genin *ermC* (%78.2) olduğu bildirilmiştir. Benzer olarak Çetin ve arkadaşlarının¹⁵ çalışmasında 301 stafilokok suşu araştırılmış; yüksek cMLS_B (%63.5) ve iMLS_B (% 36.5) oranları tespit edilmiş ve yine en sık *ermC* (%30) genine rastlanmıştır. Her iki çalışmada da *S.aureus* suşları ile karşılaştırıldığında KNS'lerde MLS_B direncinin daha yüksek olduğu belirlenmiştir^{14,15}. Gül ve arkadaşları¹⁷, çalışmalarında farklı olarak en sık *ermA* (%37.7) genine rastlamışlardır; ancak çalışmaya sadece *S.aureus* suşlarının alınmış olması bu farklılığı yaratmış olabilir.

Sonuç olarak, ülkemizde olduğu gibi hastanemizde de MLS_B direncinden çoğunlukla *erm* ve *msr* genleri sorumludur. Ancak, çalışmamızda *linA* ve *vga* genlerinin tek başına veya *erm* ve *msr* genleriyle kombine olarak sıklıkla bulunması, dirençte azımsanamayacak bir rol oynadıklarını ve epidemiyolojik çalışmalarda bu genlerin de araştırılması gerektiğini düşündürmektedir. Bölgesel MLS_B direncinin fenotipik ve genotipik olarak belirlenmesi, laboratuvarların doğru ve güvenilir sonuç vermesini sağlayacak ve klinisyene ampirik tedaviyi seçmesinde yardımcı olacaktır.

KAYNAKLAR

1. von Eiff C, Peters G, Heilmann C. Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. Lancet Infect Dis 2002; 2(11): 677-85.
2. Kloos WE, Bannerman TL. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. Clin Microbiol Rev 1994; 7(1): 117-40.
3. Thylefors JD, Harbarth S, Pittet D. Increasing bacteremia due to coagulase-negative staphylococci: fiction or reality? Infect Control Hosp Epidemiol 1998; 19(8): 581-9.
4. Livermore DM. Antibiotic resistance in staphylococci. Int J Antimicrob Agent 2000; 16(Suppl 1): S3-10.

5. Gür D. Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç, s: 182-92. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (ed), Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Cilt 1. 2002. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
6. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. J Clin Infect Dis 2002; 34(4): 482-92.
7. 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(10): 4740-4.
8. Delialioğlu N, Aslan G, Ozturk C, Baki V, Sen S, Emekdas G. Inducible clindamycin resistance in staphylococci isolated from clinical samples. Jpn J Infect Dis 2005; 58(2): 104-6.
9. Leblebicioğlu H. Makrolidler. İnfeksiyon Dergisi 2001; 15(2): 189-92.
10. Weisblum B. Macrolide resistance. Drug Resist Updat 1998; 1(1): 29-41.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M100-S19, 2009. CLSI, Wayne, Pa.
12. Ida T, Okamoto R, Shimauchi C, Okubo T, Kuga A, Inoue M. Identification of aminoglycoside-modifying enzymes by susceptibility testing: epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Japan. J Clin Microbiol 2001; 39(9): 3115-21.
13. 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(5): 1062-6.
14. 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(4): 286-90.
15. Cetin ES, Gunes H, Kaya S, Aridogan BC, Demirci M. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides and streptogramins among clinical staphylococcus isolates in a Turkish university hospital. J Microbiol Immunol Infect 2010; 43(6): 524-9.
16. Saribas Z, Tunçkanat F, Özcakir O, Ercis S. Investigation of macrolide-lincosamide-streptogramin B [MLS(B)] and telithromycin resistance in clinical strains of staphylococci. Mikrobiyol Bul 2010; 44(2): 177-86.
17. Gul HC, Kilic A, Guclu AU, Bedir O, Orhon M, Basustaoglu AC. Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistant phenotypes and genotypes for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Turkey, from 2003 to 2006. Pol J Microbiol 2008; 57(4): 307-12.
18. Yilmaz G, Aydin K, Iskender S, Caylan R, Koksall I. Detection and prevalence of inducible clindamycin resistance in staphylococci. J Med Microbiol 2007; 56(Pt3): 342-5.
19. Allignet J, Aubert S, Morvan A, el Solh N. Distribution of genes encoding resistance to streptogramin A and related compounds among staphylococci resistant to these antibiotics. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40(11): 2523-8.
20. Bemer P, Juvin ME, Corvec S, Ros A, Drugeon H. Correlation of agar dilution and VITEK2 system for detection of resistance to macrolides, lincosamides and pristinamycin among *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*: association with genotypes. Europ. Society of Clin Microbiol and Infect Dis 2005; 11(8): 656-61.
21. Leclercq R, Noel AB, Duval J, Courvalin P. Phenotypic expression and genetic heterogeneity of lincosamide inactivation in *Staphylococcus* spp. Antimicrob Agents Chemother 1987; 31(12): 1887-91.