

Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* İzolatlarında Heterojen Makrolid Direnci: Direnç Mekanizmasının ve Klonalitenin Araştırılması

Heterogeneous Macrolide Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Investigation of Resistance Mechanisms and Clonality

Tuğrul HOŞBUL¹, Bülent BOZDOĞAN², Tunçer HAZNEDAROĞLU³, Mustafa ÖZYURT³

¹ Gölçük Asker Hastanesi, Tıbbi Tahlil Laboratuvarı, Gölçük, Kocaeli.

¹ Gölçük Military Hospital, Medical Diagnosis Laboratory, Gölçük, Kocaeli, Turkey.

² Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Aydın.

² Adnan Menderes University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Aydın, Turkey.

³ Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Servisi, İstanbul.

³ Gulhane Military Medical Academy, Haydarpaşa Education Hospital, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 23.08.2012 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 25.12.2012

ÖZET

Staphylococcus aureus, hastane enfeksiyonlarına neden olan önemli patojenlerden biridir ve kullanılan antibiyotiklere çoklu direnç kazanmanın yanı sıra klonal olarak yayılma özelliğine sahiptir. Bu çalışmanın amacı, bir üçüncü basamak eğitim hastanesinde 2006-2008 yılları arasında yatan hastalara ait klinik örneklerden izole edilen 41 metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşunda gözlenen heterojen makrolid direncinin mekanizmasının ve izolatlar arasındaki klonal ilişkinin araştırılmasıdır. Eritromisin, klaritromisin ve azitromisin antibiyotik disklerine ait inhibisyon zonu içerisinde üreme gözlenen izolatlar heterojen makrolid, linkozamid ve streptogramin-B (hMLS_B) direnç fenotipine sahip izolatlar olarak tanımlanmıştır. Aynı yıllarda izole edilmiş hMLS_B direnç fenotipi sergilemeyen makrolidlere dirençli 63 MRSA izolatı da kontrol grubu olarak çalışmaya dahil edilmiştir. İzolatlarda metisilin, eritromisin, azitromisin, klaritromisin, klindamisin, kinupristin-dalfopristin, penisilin, vankomisin, teikoplanin, linezolid, gentamisin, amikasin, siprofloksasin, trimetoprim-sülfametoksazol, kloramfenikol, rifampin, tetrasiklin ve telitromisin direnci CLSI kriterlerine uygun olarak disk difüzyon yöntemiyle araştırılmıştır. hMLS_B fenotipine sahip izolatlarda eritromisin, klindamisin ve kinupristin-dalfopristin duyarlılıkları ayrıca Vitek-2 otomatize sistemi (bioMérieux, Fransa) ile belirlenmiştir. İzolatlarda *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA/B* direnç genlerinin varlığı PCR ile araş-

İletişim (Correspondence): Uzm. Dr. Tuğrul Hoşbul, Gölçük Asker Hastanesi, Tıbbi Tahlil Laboratuvarı, 41950, Gölçük, Kocaeli, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 262 414 6601-7830, **E-posta (E-mail):** tugrulhosbul@myynet.com

tırılmıştır. Çalışmamızda *erm(A)*, hMLS_B direncinden sorumlu tek direnç geni olarak saptanmış ve izolat-
larda *erm(A)* geninin regülatör bölgesi DNA dizi analiziyle incelenmiştir. Regülatör bölgelerinin dizi ana-
lizleri sonucunda 34 izolatla 149. pozisyonadaki “guanin” baz delesyonu, 16 izolatla ise “C368G” ve
“T377C” olmak üzere iki nokta mutasyonu belirlenmiştir. Değişken alanlı jel elektroforezi (PFGE) analizi
sonucunda makrolidlere heterojen dirençli izolatlarda yaygın bir klon ve varyantları saptanmıştır. Ancak
bu klon kontrol grubu izolatları arasında da yaygın klon olarak bulunmuştur. İlginç olarak tüm heterojen
makrolid dirençli izolatlar otomatize sistem tarafından eritromisin, klindamisin ve kinupristin-dalfopristi-
ne duyarlı olarak rapor edilmiştir. Sonuçta, heterojen makrolid dirençli izolatlara özgül bir klon saptan-
mamıştır. Her ne kadar hMLS_B fenotipi gözlenen tüm izolatlarda *erm(A)* direnç geni saptansa da, bu izo-
latların regülatör bölgelerinde özgül ve yaygın bir genetik değişiklik belirlenmemiştir. Çalışmanın en
önemli bulgusu, otomatize sistemin hMLS_B fenotipini uygun olarak saptayamadığının gösterilmiş olma-
sıdır. Bunun yanı sıra disk difüzyon yönteminde inkübasyon süresinin uzatılmasının (en az 24 saat) hMLS_B
fenotipinin saptanmasına katkı sağlayabileceği düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: *Staphylococcus aureus*; makrolid; linkozamid; streptogamin; direnç; heterojen mak-
rolid direnci; klonalite.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is one of the most important pathogens leading to hospital infections and has
ability to gain multiple resistance to most of the antibiotics used as well as ability to spread clonally. In
this study we aimed to investigate the mechanism of heterogenous macrolide resistance and clonality of
41 methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) strains isolated from clinical samples of inpatients between 2006
and 2008 in a tertiary care training hospital. Heterogenous macrolide resistance is defined as the isola-
tes with colonies in the inhibition zone of erythromycin, azithromycin, claritromycin discs, and named as
hMLS_B (heterogeneous macrolides, lincosamides, streptogramin-B) phenotype. A total of 63 macrolide-
resistant MRSA strains isolated during the same period with non-hMLS_B phenotype were included in the
study as a control group. The susceptibilities of isolates to methicillin, erythromycin, azithromycin, clarit-
romycin, clindamycin, quinupristin-dalfopristin, penicillin, vancomycin, teicoplanin, linezolid, gentami-
cin, amikacin, ciprofloxacin, trimethoprim-sulphamethoxazole, chloramphenicol, rifampin, tetracycline
and telithromycin were determined by disc diffusion method according to the CLSI criteria. hMLS_B iso-
lates were also tested for erythromycin, clindamycin and quinupristin-dalfopristin susceptibility by Vitek-
2 automated system (bioMérieux, France). Presence of *erm(A)*, *erm(B)*, *erm(C)*, *msr(A/B)* resistance ge-
nes were investigated by PCR. The regulatory region of the *erm(A)* gene, which was found to be the only
molecular mechanism of hMLS_B, was sequenced. Sequence analysis of regulatory regions showed dele-
tion of “guanine” base at position 149 in 34 strains and two point mutations namely “C368G” and
“T377C” in 16 strains. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis indicated presence of a common
clone and its variants; however this clone was also common among control group strains. Interestingly
all heterogeneous macrolide resistant isolates were reported as susceptible to erythromycin, clindamy-
cin, quinupristin-dalfopristin by the automated system. As a result a clone specific to heterogenous mac-
rolide resistant strains was not detected. Although all hMLS_B strains had *erm(A)* gene, a specific and com-
mon genetic modification could not be found in regulatory region of the isolates. The most important
finding of this study is the detection of inability of the automated system to properly reflect the hMLS_B
phenotype. In addition it was suggested that longer incubation (at least 24 hours) of the antibiotic sus-
ceptibility test plates could help identification of hMLS_B phenotype in disc diffusion tests.

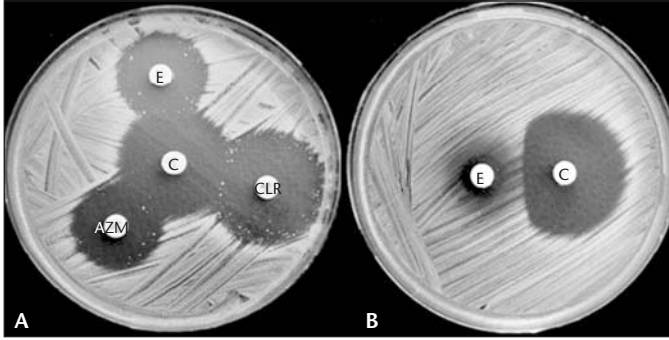
Key words: *Staphylococcus aureus*; macrolide; lincosamide; streptogramin; resistance; heterogeneous
macrolide resistance; clonality.

GİRİŞ

Staphylococcus aureus birçok ülkede ciddi hastane ve toplum kökenli enfeksiyonlara neden olan önemli patojenlerden birisidir. Özellikle metisiline dirençli *S.aureus* (MRSA) izolatlarında gittikçe artan oranda görülen çoklu antibiyotik direnci tedavide zorluklara ve maliyet artışına neden olmaktadır. Günümüzde MRSA enfeksiyonlarının tedavisi daha önemli hale gelmiştir^{1,2}. Bu amaçla kullanılan başlıca antibiyotikler glikopeptidler ve oksazolidinonlar olup, tetrasiklinler, aminoglikozidler, trimetoprim-sülfametoksazol, makrolid, linkozamid ve kinupristin-dalfopristin gibi antibiyotikler de tedavide kullanılan alternatif ajanlardır. Özellikle toplum kökenli stafilokok enfeksiyonlarında makrolid, linkozamid ve streptogramin (MLS) grubu antibiyotikler sıklıkla kullanılmaktadır^{3,4}.

MLS grubu antibiyotikler, kimyasal yapıları farklı ancak protein sentezinin inhibisyonu suretiyle benzer etki mekanizmasına sahiptir. Bu grup antibiyotiklere direnç, hedef bölge değişikliği, enzimatik inaktivasyon ve aktif olarak ilacın dışa atılması sonucu gelişebilmektedir. *S.aureus* izolatlarında MLS grubu antibiyotiklere direnç gelişiminden en sık sorumlu olan mekanizma hedef değişikliğidir⁵⁻⁷. Hedef bölge değişikliği, *erm* (eritromisin ribozom metilaz) geninin kodladığı enzimlerin etkisiyle, MLS grubu antibiyotiklerin hedef bölgesi olan 23S rRNA'daki adenin rezidülerine metil grubunun eklenmesi sonucu veya 23S rRNA V. kangalının merkez kısmında ya da L4 ve L22 gibi ribozomal proteinlerdeki mutasyonlar sonucunda olmaktadır. Birçok *erm* geni kromozomal yerleşimli olup transpozonlar aracılığıyla taşınırken, bir kısmı da plazmid kaynaklı olarak taşınmaktadır. *erm* geninin ekspresyonu yapısal veya indüklenebilir karakterdedir. Yapısal ekspresyon indükleyicilerin varlığı veya yokluğundan bağımsız olarak sıklıkla *erm* genlerinin regülatör bölgelerindeki nokta mutasyonları, delesyon veya duplikasyon gibi değişiklikler sonucunda görülür⁸⁻¹⁰. Yapısal direncin görüldüğü izolatlar tüm makrolidlere, linkozamidlere ve streptogramin B'ye karşı direnç gösterir. İndüklenebilir ekspresyonda izolatlar 14 ve 15 üyeli makrolidlere dirençli; 16 üyeli makrolidler, linkozamid ve streptograminlere ise duyarlıdır. Makrolidlerle birlikte, linkozamid ve streptograminlere de direncin gelişmesi nedeniyle bu direnç tipi makrolid, linkozamid ve streptogramin-B (MLS_B) direnci olarak adlandırılır. Dirence neden olan mekanizmayla ilişkili olarak MLS_B direnci, laboratuvar değerlendirmeleri sırasında yapısal (konstitütif, cMLS_B) veya indüklenebilir (iMLS_B) direnç fenotipinde gözlenebilir¹¹⁻¹³.

Hastanemiz MRSA izolatlarına ait disk difüzyon duyarlılık testlerinin değerlendirilmesi sırasında, bilinen makrolid direnç fenotipinin haricinde, makrolid antibiyotiklerinin inhibisyon zonu içerisinde küçük koloni üremelerinin gözlemlendiği bir direnç fenotipi saptanmıştır (Resim 1A). Ülkemizde ilk kez Karabiber ve arkadaşları¹⁴ tarafından tanımlanan ve heterojen MLS_B (hMLS_B) direnci olarak adlandırılan bu fenotipten sorumlu direncin mekanizmasına ilişkin ayrıntılı genetik analiz verilerine literatürde ulaşılamamıştır. Çalışmamız heterojen makrolid direncinin mekanizmasının ve suşlar arası klonal ilişkinin araştırılmasına yönelik olarak yürütülen ilk çalışma olması yönüyle önemlidir.



Resim 1. hMLS_B direnç fenotipi. A) Zon içi küçük koloni üremeleri görülmektedir [E: Eritromisin; CLR: Klaritromisin; AZM: Azitromisin ve C (ortada); Klindamisin], B) İnhibisyon zonu içinde üreyen kolonilerle yapılan D testi ile saptanan iMLS_B direnç fenotipi görülmektedir.

GEREÇ ve YÖNTEM

İzolatlar

Çalışmaya, Ocak 2006-Aralık 2008 tarihleri arasında hastanemizin Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında izole edilen, disk difüzyon testi değerlendirmelerinde 14 ve 15-üyel makrolidlere ait inhibisyon zonu içerisinde koloni üremeleri gözlenen 41 klinik MRSA izolatı dahil edildi. Aynı döneme ait 21'i iMLS_B, 42'si ise cMLS_B fenotipinde olmak üzere toplam 63 makrolide dirençli MRSA izolatı da kontrol grubu olarak kullanıldı. Tekrarlayan izolatlar çalışma dışında bırakıldı. Hastanemizin metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA) izolatlarında hMLS_B fenotipinin gözlenmemesi nedeniyle çalışmaya MSSA izolatları dahil edilmedi. İzolatlar, konvansiyonel yöntemlere ek olarak *S.aureus*'un ısıya dirençli nükleaz genini kodlayan *nuc(A)* geninin gösterilmesiyle tanımlandı.

Antibiyotik Duyarlılık Testleri

İzolatların antibiyotik duyarlılıkları "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" kriterlerine göre sefoksitin (30 µg), eritromisin (15 µg), klaritromisin (15 µg), azitromisin (15 µg), klindamisin (2 µg), kinupristin-dalfopristin (15 µg), penisilin (10U), vankomisin (30 µg), teikoplanin (30 µg), linezolid (30 µg), gentamisin (10 µg), amikasin (30 µg), siprofloksasin (5 µg), trimetoprim-sülfametoksazol (1.25/23.75 µg), kloramfenikol (30 µg), rifampin (5 µg), tetrasiklin (30 µg) ve telitromisin (15 µg) diskleri kullanılarak disk difüzyon yöntemiyle araştırıldı¹⁵. iMLS_B direnç fenotipinin tanımlanması eritromisin ve klindamisin disklerinin kullanıldığı "D test" ile gerçekleştirildi. Eritromisin, klaritromisin, azitromisin ve klindamisin diskleri hMLS_B direncini saptamak için kullanıldı. *S.aureus* ATCC 25923 ve daha önceden MLS direnç fenotipleri bilinen izolatlar kontrol izolatları olarak kullanıldı. İnhibisyon zonu içerisinde küçük koloni üremelerinin daha iyi görülmesi amacıyla inkübasyon süreleri 36 saate kadar uzatıldı. Heterojen makrolid dirençli (HMD) izolatların eritromisin, klindamisin ve kinupristin-dalfopristin duyarlılıkları ayrıca Vitek-2 otomatize sistemiyle (bioMérieux, Fransa) üreticilerin önerileri doğrultusunda belirlendi. HMD izolatların makrolid direncinin stabilitesi, bu özellikteki iki izolatın

tek koloni ekiminden elde edilmiş 10'ar izolatın 15 gün boyunca pasajları sonunda D-test yöntemiyle araştırıldı.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile Direnç Genlerinin Araştırılması

Bu amaçla *nucA*, *mecA*, *ermA*, *ermB*, *ermC* ve *msrA* genlerine özgül primerler kullanıldı (Tablo I). Çalışmada *nucA* geni izolatların tanımlanması, *mecA* geni metisilin direncinin, *ermA*, *ermB*, *ermC* ve *msrA* genleri ise makrolid direncinin saptanması amacıyla kullanıldı¹⁶⁻¹⁸. Kısaca, beyin kalp infüzyon sıvı besiyerine izolatların tek koloni ekimi yapıldı ve besiyeri 37°C'de 18 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda süspansiyon 5000xg'de 3 dakika santrifüj edildi. Çökeltiden ticari ekstraksiyon kiti (Invitrogen, ABD) kullanılarak DNA elde edildi. Amplifikasyon tepkimeleri; 3 µl Taq buffer (10 X; Fermentas, Litvanya), 2.4 µl MgCl (25 mM; iNtRON Biotechnology, Kore), 0.6 µl dNTP karışımı (10 mM; Gene Mark, Tayvan), her bir primerden 0.12 µl (100 pmol; Iontek, Türkiye), 0.18 µl Taq polimeraz (5 U/µl, iNtRON Biotechnology, Kore), 2 µl DNA eldesi ve 21.58 µl steril su olacak şekilde toplam 30 µl hacimde gerçekleştirildi. Tüm tepkimeler; 95°C'de 5 dakika başlangıç denatürasyonunu takiben, 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 54°C'de 30 saniye bağlanma, 72°C'de bir dakika uzama döngüsü içeren 35 döngü ve 72°C'de beş dakika son uzama olacak şekilde programlanarak gerçek zamanlı PCR (Icycler-BioRad, ABD) cihazında yürütüldü. Amplikonlar, yatay agaroz jel elektroforez işlemi ile analiz edildi. Bant büyüklüklerinin saptanması için DNA belirteci (Gel pilot 100 bç, Qiagen, ABD) eş zamanlı olarak jelle yüklendi. Ürünler %1.5'lik agaroz jelde 1X TAE tamponu içinde 100 V akım altında 45 dakika süreyle yürütüldü. Elektroforez sonrası agaroz jel 2 µg/ml etidyum bromür içeren 500 ml distile suda 15 dakika boyandı. DNA bantları, görüntüleme cihazında (Molecular Imager Gel DOC XR+, BioRad, ABD) görüntülendi ve değerlendirildi.

Tablo I. Çalışmada Kullanılan Primer Çiftleri

Primerler	Nükleotid dizilimi	Amplikon büyüklüğü (bç)	Kaynak no
<i>nucA</i>	5' GCGATTGATGGTGATACGGTT3' 5' AGCCAAGCCTTGACGAACAAAGC3'	270	16
<i>mecA</i>	5' AAA ATCGATGGTAAAGGTTGGC3' 5' AGTTCTGCAGTACCGGATTTC3'	533	17
<i>ermA</i>	5' ACGATATTACGGTTTACCACTTA3' 5' AACC AGAAAAACCTAAAGACACG 3'	610	18
<i>ermB</i>	5' TAACGACGAACTGGCTAAAAT3' 5' ATCTGTGGTATGGCGGGTAAG3'	415	18
<i>ermC</i>	5' AGTACAGAGGTGTAATTCG 3' 5' AATTCCTGCATGTTTAAGG 3'	520	18
<i>msrA/B</i>	5' GCAAATGGTGTAGGTAAGACAAC3' 5' ATCATGTGATGTAACAAAAT 3'	399	18
<i>ermA</i> regülatör bölge	5' CGTTGGGGATAAACTTC 3', 5' TTCGTGTGATTCAATATTC 3'	547	Bu çalışma

Değişken Alanlı Jel Elektroforezi (Pulsed Field Gel Electrophoresis; PFGE)

Heterojen makrolid direnci saptanan 41 izolat arasındaki klonal ilişki, daha önce Türk-
yılmaz ve arkadaşlarının¹⁹ tarif ettikleri şekilde PFGE yöntemiyle araştırıldı. PFGE, aynı dö-
nemde izole edilen kontrol grubundaki izolatlara da uygulandı. Bu yöntem, genomik
DNA'nın *Sma*I enzimiyle kesilmesi sonucu gerçekleştirildi ve PFGE jelinin etidyum bro-
mür ile boyanması sonrası görüntüleme cihazında değerlendirildi (Molecular Imager Gel
DOC XR+, BioRad, ABD). PFGE paternleri arasındaki ilişki Tenover kriterlerine göre yo-
rumlandı. Buna göre bant farkı izlenmeyen izolatlar aynı klon, 1-6 arasında bant farkı
gözlenen izolatlar varyant, ≥ 7 bant farkı saptanan izolatlar ise farklı izolatlar olarak de-
ğerlendirildi²⁰.

erm(A) Regülatör Bölgesinin DNA Dizi Analizi

Heterojen makrolid direncine sahip izolatlarda *erm(A)* direnç geninin regülatör bölge-
si lider peptidi de içerecek şekilde "Gen Bankası AJ276730" referans alınarak tasarlanan
özellik primerlerle (*erm*ALP1: 5' CGT TGG GGA TAA AAC TTC 3' ve *erm*ALP2: 5' TTC GTG
TGA TTC AAT ATT TC 3') analiz edildi (Şekil 1). PCR işlemi, makrolid direnç genlerinin
araştırıldığı PCR bileşen konsantrasyonları ve döngüleri protokolünün aynı olacak şekil-
de 4 µl örnek DNA'sı ve 46 µl PCR karışımı olmak üzere toplamda 50 µl hacim içeren 0.2
ml'lik mikrosantrifüj tüplerinde uygulandı. Elde edilen 527 baz çifti (bç) büyüklüğündeki
PCR ürünlerinin DNA dizi analizi özel bir laboratuvar (İntek, Türkiye) gerçekleştirildi.

İki yönlü dizilenmiş amplikonların dizilerinden "konsensus dizisi" belirlendi. Bu amaç-
la, ters primerle elde edilen dizinin "revers komplemanı" *BioEdit* programı kullanılarak el-

1	cggttggggat	aaaacttccc	tttagacaat	tttatccaaa	gacaatacaa	cagtgcact
61	ttattaaagt	cactgtcctt	tatcgagcc	tttacttttt	agtaaagaca	gtggcttctc
121	ttatcaagtt	tcaaacata	ttattttggg	agaaaacgtc	catctgaagt	gtcaagtgc
181	aaattacata	taaaggttta	ttctaaaatg	aaaagatgat	acaatcatat	tcagttacat
241	aaggagggtt	caattatgtg	caccagttatc	gcagtagtag	aaattacttt	atctcattca
301	taatgaaaa	aatggaaagg	agataaaagt	atgggtactt	tttctatatt	tggtattaat
361	aaagttcctt	atcaactaaa	tcaaaattaa	ttggttataa	tgaacgttta	atgtcagttc
421	attataacca	gtaaggagaa	ggttataatg	aaccagaaaa	accctaaaga	cacgcaaaat
481	tttattactt	ctaaaaagca	tgtaaaagaa	atattgaatc	acacgaa	

Şekil 1. *erm(A)* geni regülatör bölgesi [Bu bölgede komplementer dizilerin karşılıklı hidrojen bağlarıyla bağlan-
ması translasyonel atenuasyona yol açmaktadır. Regülatör bölgeyi çoğaltmak için kullanılan primerlerin dizi-
limi koyu tonda belirtilmiştir. *erm(A)* metilazın başlangıç kodonu "atg" daire içine alınmıştır. Lider peptid için
kodlayan dizi ise arkası gri fon olarak gösterilmiştir. Altı çizili olarak belirtilen bölgeler mRNA'da ikincil yapıla-
nın oluşumuna neden olan komplementer dizileri göstermektedir (GenBank AJ276730)].

de edildi. Konsensus diziler birbirleri ve *erm(A)* regülatör bölgesi ile *ClustalW* programı kullanılarak karşılaştırıldı. Regülatör bölgede mutasyonlara göre oluşabilecek sekonder yapıların belirlenmesi için “*mfold 3.2*” programı kullanıldı²¹.

BULGULAR

Heterojen Makrolid Dirençli (HMD) İzolatlar ve Özellikleri

Çalışmadaki tüm hMLS_B fenotipindeki izolatlar, eritromisin, klaritromisin ve azitromisin içeren disklerin inhibisyon zonu içerisinde küçük koloniler oluşturarak üremiştir (Resim 1A). İnhibisyon zonu içindeki kolonilerin eritromisin ve klindamisine duyarlılıkları disk difüzyon yöntemiyle araştırıldığında, ilginç olarak bu kolonilerin iMLS_B fenotipinde oldukları belirlenmiştir (Resim 1B). Heterojen direnç fenotipinin yıllara göre dağılımı değerlendirildiğinde; 2006, 2007 ve 2008 yılı izolatlarında sırasıyla %57.5 (23/40), %26.7 (8/30) ve %28.6 (10/35) oranında olduğu saptanmıştır.

Heterojen fenotipin inkübasyon süresiyle olan ilişkisi incelendiğinde, 18. saatte zon içindeki kolonilerin zayıf üreme gösterdikleri ve dikkatli bir değerlendirme ile saptanabildikleri gözlenmiştir. Inkübasyon süresinin 24. ve 36. saate uzatılması sonucunda yapılan değerlendirmelerde, uzamış inkübasyon süresiyle doğru orantılı olarak kolonilerin belirgin şekilde görülebilir hale geldiği izlenmiştir.

Heterojen dirençli izolatların makrolid direncinin stabilitesi, izolatların tek koloni ekiminden elde edilen kolonilerin 15 günlük seri pasajları sonunda D-test yöntemiyle değerlendirilmiştir. Bu sürenin sonunda izolatların hMLS_B fenotipini göstermeye devam ettikleri saptanmıştır. Aynı şekilde zon içindeki varyant koloniler test edildiğinde, bu kolonilerin de bu süre sonunda iMLS_B fenotipini korudukları belirlenmiştir.

Heterojen dirençli izolatların tümünde aynı antibiyotik duyarlılık profili saptanmıştır (Tablo II). Bu izolatların Vitek-2 otomatize sistemi ile eritromisin ve kinupristin-dalfopristin MİK değerleri ≤ 0.25 - 0.5 µg/ml aralığında, klindamisin MİK değerleri ise ≤ 0.25 µg/ml olarak bulunmuş; tüm izolatlar otomatize sistemle test edilen üç antibiyotiğe karşı duyarlı saptanmıştır.

HMD izolatlarda araştırılan direnç genlerinden sadece *erm(A)*’nın varlığı belirlenmiş; *erm(B)*, *erm(C)* veya *msr(A)* direnç geni saptanmamıştır. Buna göre *erm(A)*, heterojen makrolid direncinden sorumlu tek mekanizma olarak değerlendirilmiştir. Kontrol grubundaki izolatların %93.7 (59/63)’ünde *erm(A)*, %58.7 (37/63)’ünde *erm(A)* ve *erm(C)* birlikteliği, %6.3 (4/63)’ünde *erm(B)* direnç geni saptanırken, *msr(A)* direnç geni saptanmamıştır.

Tablo II. Heterojen Makrolid Dirençli İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları

ERY-AZM-CLR	CLI	QD	VAN	TEC	LZD	GEN	AMK	CIP	SXT	CHL	RIF	TET	TEL
R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	R	R	S

R: Dirençli; S: Duyarlı; ERY: Eritromisin; AZM: Azitromisin; CLR: Klaritromisin; CLI: Klindamisin; QD: Kinupristin-dalfopristin; VAN: Vankomisin; TEC: Teikoplanin; LZD: Linezolid; GEN: Gentamisin; AMK: Amikasin; CIP: Siprofloksasin; SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol; CHL: Kloramfenikol; RIF: Rifampin; TET: Tetrasiklin; TEL: Telitromisin.

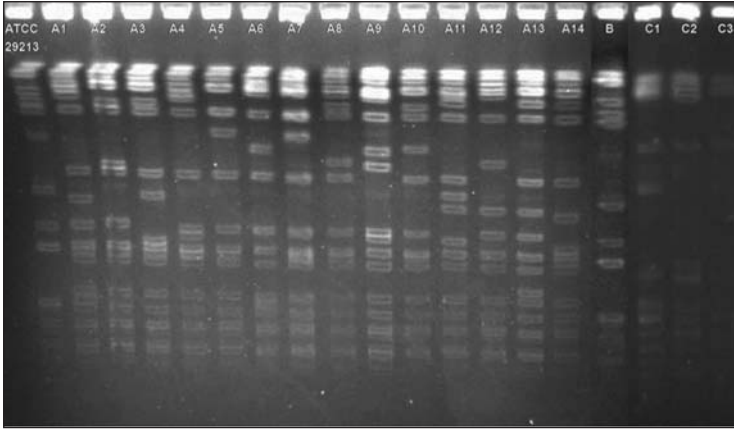
Klonalite

Toplam 104 izolatın (41 hMLS_B, 42 cMLS_B, 21 iMLS_B) klonal ilişkisi PFGE ile araştırılmış ve üç farklı klon saptanmıştır. Çalışmada saptanan klonlar ve varyantlarına ait PFGE görüntüsü Resim 2’de verilmiştir. Hem heterojen makrolid dirençli suşlarda hem de çalışmadaki diğer suşlarda egemen bir klonun (A) ve varyantlarının varlığı belirlenmiştir (Tablo III). Sonuçta heterojen makrolid dirençli izolatlara özgül bir klon varlığı bulunmamıştır. Bu durum hastanemizdeki saptadığımız heterojen makrolid direncinin klonal bir yayılım olmadığını göstermektedir.

erm(A) Regülatör Bölgesinin Dizi Analizinin Yorumlanması

HMD izolatların regülatör bölgelerinin dizi analizleri yapılarak, Gen Bankası AJ276730 no’lu *erm(A)* gen dizisinin regülatör bölgesiyle karşılaştırılmıştır. Buna göre izolatların 34’ünde *erm(A)* geninin 149. bazı olan “guanin”de delesyon belirlenmiş; 16 izolatta iki nokta mutasyonu (C368G ve T377C) saptanmış, 13 izolatta ise baz delesyonu ve iki nokta mutasyonu birlikteliği görülmüştür.

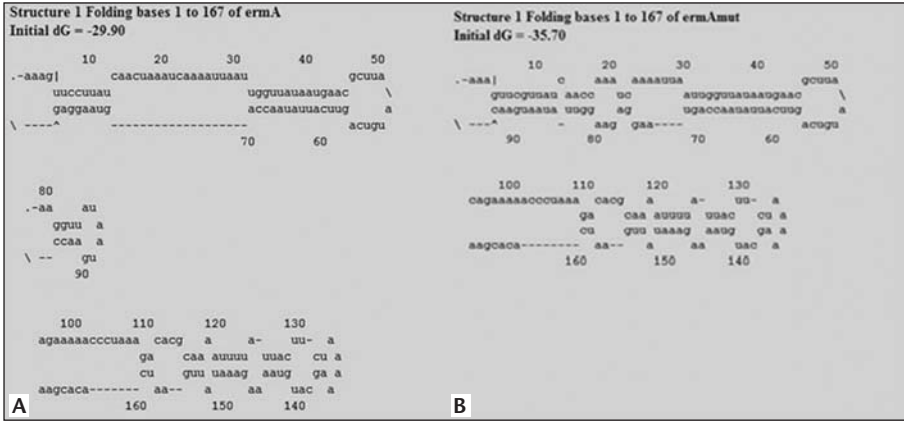
Saptanan mutasyonların, lider peptid (256-303) veya *erm(A)* için kodlayan bölgede veya bu genlerin ribozom bağlayan bölgelerinde (RBS) olmadığı belirlenmiştir. Mutas-



Resim 2. Çalışmada saptanan klonlar ve varyantlarına ait PFGE görüntüsü.

Tablo III. İzolatlar Arasındaki Klonal Dağılım

Tablo III. İzolatlar Arasındaki Klonal Dağılım																		
İzolatlar	Klonlar ve varyantları																	
	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	B	C1	C2	C3
hMLS _B (n= 41)	11	16	2	3	2	1	2	2	-	1	-	-	1	-	-	-	-	-
Kontrol grubu (n= 63)	24	9	-	-	1	3	1	6	1	-	8	2	3	1	1	1	1	1



Şekil 2. *erm(A)* regülatör bölgesinin 167 bazının ikincil yapısı ve ΔG düzeyi (ΔG mutasyon olmadığında -29.9 kcal/mol, mutasyon olduğunda ise -35.7 kcal/mol olarak hesaplanmıştır).

yonların mRNA sekonder yapısındaki enerji tutarı üzerinde etkisi olabilmektedir. Bu nedenle çalışmada mutasyonlu ve mutasyonsuz bölgelerdeki ayrılma enerjisi farklılıkları “RNA folding” programıyla ölçülmüş, toplam enerjide fark olmadığı bulunmuştur. Mutasyonsuz *erm(A)* regülatör bölgesinde -110.9 kcal/mol olan ayrılma enerjisi, mutasyonlu bölge için -112 kcal/mol olarak saptanmıştır. Bununla birlikte nokta mutasyonların saptandığı 361-527 bazlarının bulunduğu bölge RNA folding programıyla çalışıldığında ayrılma enerjisinde farklılık olduğu görülmüştür. Mutasyonsuz halde ayrılma enerjisi -29.9 iken mutasyonlu halde -35.7 olarak bulunmuştur (Şekil 2).

TARTIŞMA

MLS grubu antibiyotikler kimyasal yapıları farklı, ancak protein sentezinin inhibisyonu suretiyle benzer etki mekanizmasına sahiptir. Dirence neden olan mekanizmayla ilişkili olarak MLS direnci, laboratuvar değerlendirmeleri sırasında yapısal veya indüklenebilir direnç fenotipinde gözlenebilir. MLS grubu antibiyotiklere karşı bilinen direnç fenotiplerinin dışında farklı direnç fenotiplerinin varlığı da çeşitli çalışmalarda bildirilmektedir^{14,22,23}. Çalışmamıza benzer şekilde, Yoon ve arkadaşları²³ 2008 yılında, klindamisin veya josamisin eritromisine bakan kenarındaki zonda bir küntleşme (D zonu) ile zon içinde “foggy” (buğulu) olarak tanımladıkları, zayıf ama homojen bir üremeden bahsetmişler ve bu fenotipi “foggy D-shape” olarak isimlendirmişlerdir. Bu araştırmacılar, çalışmadaki izolatların tümünde, bizim çalışmamızda olduğu gibi yalnızca *erm(A)* direnç genini saptamışlar ve bu geni regülatör bölgeyi de içerecek şekilde dizilemişlerdir²³. DNA dizi analizi sonucu homojen ve heterojen nükleotid dizileri olmak üzere iki grubun varlığı ile 25 bç’lik mutasyonel değişiklikler belirlemişlerdir²³. İzolatlarda indüklenebilir ve yapısal fenotipin birlikteliğini göstermişler, bu durumun iki farklı *erm(A)* gen birlikteliği veya bir *erm(A)* geninin iki farklı karakterde ekspresyonu sonucunda ortaya çıkabileceği yorumunu getirmişlerdir.

Çalışmamızda izole edilen heterojen makrolid dirençli (HMD) klinik MRSA suşları, fenotipik olarak günümüzde tanımlanmış indüklenebilir ve yapısal direnç fenotiplerinden

farklı bulunmuştur. Bu fenotip daha önce Karabiber ve arkadaşları¹⁴ tarafından Yüksek İhtisas Hastanesi izolatları arasında tanımlanmış; ancak literatürde bu suşların direnç mekanizmasına yönelik ayrıntılı genetik analiz verilerine ulaşılamamıştır. Dolayısıyla hMLS_B fenotipinin direnç mekanizmasının ve suşların klonal yayılımının araştırılması ilk kez bu çalışmada gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda *erm(A)*, hMLS_B fenotipinden sorumlu direnç geni olarak belirlenmiş, ancak *erm(A)* geninin regülatör bölgesinin dizi analizinde bu fenotipi açıklayacak yaygın ve özgül bir genetik değişiklik saptanmamıştır. Her ne kadar bazı izolatlarda bir baz delesyonu ve/veya bazılarında iki nokta mutasyonu birlikteliği görülsede, saptanan delesyonun lider peptid veya RBS bölgesinde bulunmadığı ve ikincil yapıdaki enerji potansiyelini değiştirmediği için, bu mutasyonların *erm(A)* ekspresyonu üzerine etkisinin olmadığı düşünülmüştür. Regülatör bölgede saptanan iki nokta mutasyonu lider peptidten sonraki bölgede, *erm(A)* geninin başlangıç kodonundan öncesine karşılık gelmektedir. Bu mutasyonların yer aldığı bölge, sekonder yapı oluşumu açısından incelendiğinde, mutasyonların varlığında ayrılma için gerekli enerjinin arttığı görülmüştür. Bununla birlikte söz konusu değişikliğin de hMLS_B fenotipini açıklayıcı düzeyde olmadığı düşünülmektedir. hMLS_B fenotipinde mRNA sentezinin de regülasyona dahil olduğu ve antibiyotiksiz ortamda bu sentezin de ikincil bir regülasyon sistemiyle yapılmasının engellendiği düşünülmektedir.

Hastanemizde heterojen direnç fenotipinin yıllara göre dağılımı incelendiğinde, 2006, 2007 ve 2008 yılı izolatlarında sırasıyla %57.5, %26.7 ve %28.6 oranlarında olduğu görülmektedir. Bu direnç halen hastanemiz MRSA izolatlarında saptanmakta olup, en son 2011 yılında yapılan bir değerlendirmede, MRSA suşlarının %46.7 (14/30)'ünde heterojen direnç fenotipi belirlenmiştir (yayınlanmamış veri). Ancak ilginç olarak hastanemizde izole edilen MSSA izolatlarında hMLS_B fenotipine rastlanmamıştır. Hastanemiz MRSA izolatlarında gözlenen hMLS_B fenotipinin izolatlar arası klonal yayılımı araştırıldığında, izolatlar tek klonun varyantları olarak ilişkili bulunmuştur. Ancak bu klon hastanemizin diğer MRSA izolatları arasında egemen klon olarak saptanmıştır. Bu bulgu, hastanemizde saptanan heterojen makrolid direncinin klonal bir yayılım göstermediğini düşündürmektedir.

Heterojen makrolid direnç fenotipinin stabilitesi araştırıldığında, makrolid türü antibiyotiklerle temas etmeyen koloninin seri pasajları sonucunda hMLS_B fenotipini koruduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte, eritromisin inhibisyon zonu içinde üreyen kolonilerden seri pasaj yapıldığında heterojen fenotipe tekrar dönüşüm olmadığı ve bu izolatların da iMLS_B fenotipini korudukları görülmüştür. Bu durum, hMLS_B fenotipine sahip bakterilerde var olan genotipin korunduğunu, ancak ekspresyon düzeyini etkileyen ikincil faktörlerin de bulunabileceğini düşündürmektedir. HMD izolatların tümünde *erm(A)* direnç geninin saptanması ve makrolid inhibisyon zonu içinde üreyen kolonilerinin saf kültür pasajlarından gerçekleştirilen antibiyotik duyarlılık testlerinde iMLS_B fenotipinin bulunması dikkat çekicidir. Bu durum, heterojen makrolid direnci taşıyan MRSA enfeksiyonlarının tedavisinde, makrolidlerin veya klindamisin tercih edilmesi halinde tedavide başarısızlığa yol açabilecek bir faktör olması nedeniyle son derece önemlidir.

Sonuç olarak, çalışmamızda hMLS_B direncinin klonal olmadığı gibi *erm(A)* regülatör bölgesindeki genetik değişikliğe de bağlı olmadığı gösterilmiştir. Bulgularımız, direncin ekspresyona bağlı olduğunu, ekspresyon düzeyindeki farklılığın ise regülatör bölge dışında olabileceğini düşündürmektedir. Bu çalışmada hMLS_B fenotipinde transkripsiyon aşamasını etkileyecek genetik bir farklılık bulunamamış; ileri çalışmalarda regülasyonun farklı bir düzeyde olması ve transkripsiyon aşamasında mRNA sentezini engelleyen bir regülasyon olasılığının araştırılmasıyla konuya ışık tutulabileceği sonucuna varılmıştır. Bu çalışmada elde edilen bir diğer önemli sonuç, otomatize sistemlerin hMLS_B özelliği gösteren izolatların eritromisin ve klindamisin duyarlılıklarını değerlendirmede yetersiz kalabildiğini göstermesidir. Bunun yanı sıra, heterojen makrolid direncinin saptanmasında disk difüzyon yöntemi için CLSI'nın önerdiği 18 saatlik inkübasyon süresinin yeterli olamayabileceği, inkübasyon süresinin uzatılmasının (en az 24 saat) hMLS_B fenotipinin saptanmasına katkı sağlayabileceği düşünülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Durai R, Ng PC, Hoque H. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an update. AORN J 2010; 91(5): 599-606.
2. Klevens RM, Morrison MA, Nadle J. Invasive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in the United States. JAMA 2007; 298(15): 1763-71.
3. Pan A, Lorenzotti S, Zoncada A. Registered and investigational drugs for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. Recent Pat Antiinfect Drug Discov 2008; 3(1): 10-33.
4. Fiebelkorn KR, Crawford SA, McElmeel ML, et al. Practical disk diffusion method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. J Clin Microbiol 2003; 41(10): 4740-44.
5. 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(12): 2823-30.
6. Pechere JC. Macrolide resistance mechanisms in gram-positive cocci. Int J Antimicrob Agents 2001; 18(Suppl 1): S25-8.
7. Weisblum B. Erythromycin resistance by ribosome modification. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39(3): 577-85.
8. Vester B, Douthwaite S. Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(1): 1-12.
9. Jalava J, Marttila H. Application of molecular genetic methods in macrolide, lincosamide and streptogramin resistance diagnostics and in detection of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. APMIS 2004; 112(11-12): 838-55.
10. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. Clin Infect Dis 2002; 34(4): 482-92.
11. Fernandes CJ, O'Sullivan MV, Cai Y, et al. Agar dilution method for detection of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus* spp. J Clin Microbiol 2007; 45(12): 4018-20.
12. Janapatla RP, Yan JJ, Huang AH, et al. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates causing bacteremia at a university hospital in southern Taiwan. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 58(2): 203-9.
13. Forrest GN, Oldach DW. Macrolides and clindamycin, pp: 214-33. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR (eds), Infectious Diseases. 2004, 3rd ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
14. Karabiber N, Dinc BM. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen MRSA suşlarının antibiyotiplendirilmesi ve eritromisin zon içi üreme gösteren MRSA suşları. ANKEM 2007; 21(1): 50-8.

15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Nineteenth Informational Supplement M100-S19, 2009. CLSI, Wayne, PA.
16. Brakstad OG, Aasbakk K, Maeland JA. Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene. J Clin Microbiol 1992; 30(7): 1654-60.
17. Murakami K, Minamide W, Wada K. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 1991; 29(10): 2240-4.
18. Nawaz MS, Khan SA, Khan AA, Khambaty FM, Cerniglia CE. Comparative molecular analysis of erythromycin-resistance determinants in staphylococcal isolates of poultry and human origin. Mol Cell Probes 2000; 14(5): 311-9.
19. Türkyilmaz S, Tekbiyik S, Oryasin E, Bozdoğan B. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance mechanisms of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk. Zoonoses Public Health 2009; 57(3): 197-203.
20. 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(9): 2233-9.
21. Zuker M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic Acids Res 2003; 31(13): 3406-15.
22. 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(6): 941-9.
23. 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(3): 533-40.