

Klinik Örneklerden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarında Makrolid, Linkozamid ve Streptogramin B Direncinin Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Araştırılması*

Investigation of Macrolide, Lincosamide and Streptogramin B Resistance in *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Clinical Samples by Phenotypical and Genotypical Methods

Fatma AYDENİZ OZANSOY¹, Nural CEVAHİR², İlknur KALELİ²

¹ Halk Sağlığı Laboratuvarı, Kütahya.

¹ Public Health Laboratory, Kutahya, Turkey.

² Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Denizli.

² Pamukkale University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Denizli, Turkey.

* Bu çalışma, Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir
(Proje No: 2011TPF012).

Geliş Tarihi (Received): 21.07.2014 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 23.12.2014

ÖZ

Staphylococcus aureus, toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyon etkeni olarak en sık izole edilen mikroorganizmalardandır. Stafilokoklar geçmişten günümüze dek gelen süreçte önce penisilinlere ardından metisilin ve glikopeptidler olmak üzere çok sayıda antibiyotiğe direnç geliştirmelerinden ve epidemilere yol açabilmelerinden dolayı önemli bir sorun haline gelmiştir. Metisilin direnci, makrolidler gibi alternatif antibiyotiklerin kullanımına neden olmuş; ancak tüm dünyada gelişen makrolid direnci bu antibiyotiklerin kullanımını sınırlamıştır. Makrolid direnci, hedef bölge değişikliği (MLS_B fenotipi, *erm* genleri tarafından kodlanır), aktif atım pompası (MS fenotipi, *msrA/B* genleri tarafından kodlanır) veya hücre duvar geçirgenliğinin azalması şeklinde oluşabilir. Bu çalışmada, klinik *S.aureus* suşlarında MLS_B direncinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, ayakta (%6.7) ve yatan (%93.3) hastaların yara (%50), trakeal aspirat (%15) ve diğer (%35) örneklerinden izole edilen toplam 404 *S.aureus* suşu alınmıştır. Suşlarda MLS_B direncinin fenotipik olarak araştırılmasında çift disk sinerji testi (D-test), genotipik olarak araştırılmasında ise PCR yöntemi kullanılmıştır. *S.aureus* suşlarının 158 (%39.1)'i metisiline dirençli (MRSA), 246 (%60.9)'sı metisiline duyarlı (MSSA) olarak bulunmuştur.

İletişim (Correspondence): Dr. Nural Cevahir, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kınıklı, Denizli, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 258 296 2467, **E-posta (E-mail):** cevahir@pau.edu.tr

D-test ile 19 suşta yapısal (cMLS_B) klindamisin direnci, 111 suşta indüklenebilir (iMLS_B) klindamisin direnci, beş suşta MS fenotipi ve 268 suşta S fenotipi (eritromisin ve klindamisine duyarlı) saptanmıştır. Fenotipik olarak MLS_B direnci bulunan 136 suşun direnç genleri genotipik olarak araştırıldığında, iMLS_B fenotipi gösteren 111 suşun %81.9'unda (83 MRSA, 8 MSSA) *ermA*, %10.8'inde *ermC* (7 MRSA, 5 MSSA), %10.8'inde *msrA* (11 MRSA, 1 MSSA), %1.8'inde *msrB* (2 MRSA) ve %0.9'unda (1 MRSA) *ermB*; cMLS_B fenotipi gösteren 19 suşun %57.9'unda (10 MRSA, 1 MSSA) *ermA*, %36.8'inde (6 MRSA, 1 MSSA) *ermC* ve %15.8'inde (3 MRSA) *ermB*; MS fenotipi gösteren beş suşun %80'inde (2 MRSA, 2 MSSA) *ermA*, %75'inde *msrA* (3 MSSA), %50'sinde (2 MSSA) *msrB* ve %25'inde (1 MSSA) *ermC* geni saptanmıştır. *ermA* ve *ermC* genleri 14 izolatta; *ermA*, *ermC* ve *msrA* genleri bir izolatta; *ermA* ve *msrA* genleri 11 izolatta; *ermA*, *msrA* ve *msrB* genleri üç izolatta; *ermA* ve *ermB* genleri üç izolatta birlikte saptanmıştır. Bu çalışmada farklı olarak D-testi negatif olan MS fenotipindeki iki MRSA suşunda tek başına *ermA*, iki MSSA suşunda ise *msr* genlerine ilaveten *erm* genleri de saptanmıştır. Çalışmamızda klonal benzerliğin araştırılmasında RAPD-PCR yöntemi kullanılmış ve direnç genleri saptanan suşlar arasında bir veya birkaç klonal tipin hakimiyeti gözlenmemiştir. Sonuç olarak, *S.aureus* izolatlarında MLS_B direncinin araştırılmasının, bu bakteriyi gelişen enfeksiyonların tedavisinde antibiyotik seçimi yapılırken yönlendirici olacağı kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Staphylococcus aureus*; indüklenebilir klindamisin direnci; MLS_B direnci; fenotip; genotip.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is one of the most common cause of both community and healthcare-associated infections. As staphylococci have developed resistance to various antibiotics, initially to penicillins then to methicillin and glycopeptides and have the ability to cause epidemics, they continue to be a major problem from past to present. Methicillin resistance gave rise to the use of alternative antibiotics such as macrolides, however worldwide development of macrolide resistance limited the use of these antibiotics. Macrolide resistance occurs either through target site modification (MLS_B phenotype, encoded by *erm* genes), efflux pumps (MS phenotype, encoded by *msrA/B* genes) or decreased cell wall permeability. The aim of this study was to investigate the MLS_B resistance of clinical *S.aureus* strains with phenotypic and genotypic methods. A total of 404 *S.aureus* strains isolated from different clinical samples (50% wound, 15% tracheal aspirate and 35% other samples) of inpatients (93.3%) and outpatients (6.7%) were included in the study. Double disc synergy test (D-test) was used for the phenotypical research and PCR was used for the genotypical research of MLS_B resistance of isolates. One hundred fifty eight (39.1%) of the *S.aureus* isolates were methicillin-resistant (MRSA), and 246 (60.9%) were methicillin-susceptible (MSSA). By the use of D-test, constitutive (cMLS_B) and inducible (iMLS_B) clindamycin resistance were detected in 19 and 111 isolates, respectively, while five isolates were MS phenotype and 268 isolates were S phenotype (susceptible to erythromycin and clindamycin). The resistance genes of 136 isolates with MLS_B resistance phenotype were determined genotypically and among 111 isolates showing iMLS_B phenotype *ermA* gene was found in 81.9% (83 MRSA, 8 MSSA), *ermC* gene in 10.8% (7 MRSA, 5 MSSA), *msrA* gene in 10.8% (11 MRSA, 1 MSSA), *msrB* gene in 1.8% (2 MRSA) and *ermB* gene in 0.9% (1 MRSA). Among 19 strains with cMLS_B phenotype, *ermA* was found in 57.9% (10 MRSA, 1 MSSA), *ermC* in 36.8% (6 MRSA, 1 MSSA) and *ermB* in 15.8% (3 MRSA). Among five strains with MS phenotype, *ermA* was found in 80% (2 MRSA, 2 MSSA), *msrA* in 75% (3 MSSA), *msrB* in 50% (2 MSSA) and *ermC* in 25% (1 MSSA) of the isolates. *ErmA* and *ermC* genes were detected together in 14 isolates, *ermA*, *ermC* and *msrA* genes in one isolate, *ermA* and *msrA* genes in 11 isolates, *ermA*, *msrA* and *msrB* genes in three isolates and *ermA* and *ermB* genes in three isolates, respectively. In this study, two MRSA isolates with MS phenotype and negative D-test had only *ermA* gene and among two MSSA strains, *erm* genes were also determined in addition to *msr* genes. In our study RAPD-PCR method was used to investigate the clonal similarity, however no dominance of one or a number of clonal type was observed among the isolates in which the resistance genes were identified. In conclusion, the detection

of MLS_B resistance in *S.aureus* isolates is likely to influence the selection of antibiotics in the treatment of the infections caused by this bacteria.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; inducible clindamycin resistance; MLS_B resistance; phenotype; genotype.

GİRİŞ

Staphylococcus aureus, gerek toplum gerekse hastane kökenli enfeksiyonlardan en sık soyutlanan etkenlerden biridir^{1,2}. Günümüzde bu enfeksiyonların tedavisinde, mikroorganizmanın beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesi ve penisilin alerjisi olan hastalar nedeniyle, sıklıkla makrolid grubu antibiyotikler kullanılmaktadır. Makrolid grubu yeni antibiyotikler 1990'lı yılların başlarında, beta-laktam grubu antibiyotiklere alternatif olarak sunulmuş ve *S.aureus* enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın biçimde kullanılmaya başlanmıştır. Ancak bu antibiyotiklerin yaygın ve düzensiz kullanımlarına bağlı olarak hızla direnç gelişmektedir. *S.aureus* suşlarında makrolidlere karşı gelişen dirençte rol oynayan mekanizmalar arasında; hücre duvarı geçirgenliğinin azalması, aktif atım pompa sistemi (efluks) ve hedef bölge değişikliği (50S ribozomal alt ünitesindeki 23S ribozomal RNA'da adenin metilasyonu) sayılabilir. En sık görülen direnç mekanizması hedef bölge değişikliğidir³⁻⁵. Makrolid, linkozamid, streptogramin B antibiyotiklere (MLS_B) direnç olarak tanımlanan direnç profili, plazmid veya transpozonlarla aktarılır. MLS_B direnç fenotipi indüklenebilir (iMLS_B) veya yapısal (cMLS_B) özellik gösterir. Yapısal olarak dirençli suşlar, MLS_B grubundaki tüm antibiyotiklere dirençlidirler ve standart antibiyotik duyarlılık testleriyle kolayca saptanırlar. İndüklenebilir dirençte ise 14 ve 15 üyeli makrolidlerin metilaz sentezini kuvvetle indüklemeleri nedeniyle, sadece bu grupta yer alan makrolidlere karşı direnç gelişir; 16 üyeli makrolidler, linkozamid ve streptogramin B ise etkinliğini sürdürür. Bu dirençte *erm* geni (eritromisin ribozom metilaz) rol alır. Stafilokoklarda *erm*(A), *erm*(B), *erm*(C), *erm*(F), *erm*(G), *erm*(Q), *erm*(T), *erm*(Y), *erm*(32) ve *erm*(43) genleri tanımlanmış olup, MLS_B direncinde en sık *erm*(A) ve *erm*(C) genleri saptanır^{3,5,6}. Stafilokoklarda *msrA* ve *msrB* genleri tarafından kodlanan ATP'ye bağımlı aktif atım pompası, hücre içine giren makrolid ve streptogramin B'yi dışarı atarak dirence yol açarken, linkozamidlere karşı dirençte rol oynamaz⁷. Plazmidde kodlanan *msrA* geni bakteride 14,15 üyeli makrolidlere ve streptogramin B'ye indüklenebilir (MS fenotipli direnç) dirence yol açan protein pompasını kodlar^{5,7}. MLS_B grubu antibiyotikler, özellikle de klindamisin, stafilokok enfeksiyonlarında kemik ve dokuya penetrasyonunun iyi olması ve potansiyel antitoksin nedeniyle uzun süreli tedavi için iyi bir seçenektir; ancak indüklenebilir klindamisin direncinin gelişmesi bu etkinliği sınırlandırmıştır^{1,2}. Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen *S.aureus* suşlarında, MLS_B grubuna karşı gelişen direncin fenotipik karakterinin belirlenmesi ve dirençte rol alan genetik temelin saptanması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteri Kökenleri ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Çalışmaya, Ocak 2011-Ocak 2012 tarihleri arasında laboratuvarımızda çeşitli klinik örneklerden izole edilen 404 *S.aureus* suşu dahil edildi. Aynı hastadan alınan birden fazla örnekte üreyen izolatlar çalışma dışı bırakıldı.

Suşların eritromisin, telitromisin, klaritromisin, azitromisin, klindamisin, kinupristin-dalfopristin, oksasilin, penisilin G, sefoksitin, ampisilin-sulbaktam, linezolid, tetrasiklin, gentamisin, kloramfenikol, rifampisin, trimetoprim-sülfametoksazol (SXT), moksifloksasin ve siprofloksasine karşı duyarlılıkları, 2011 CLSI kriterlerine göre disk difüzyon yöntemi ile saptandı⁸. Tüm testlerde *S.aureus* ATCC 25923 kökeni kontrol olarak kullanıldı.

MLSB Direncinin D-test Yöntemi ile Araştırılması

Makrolid grubu antibiyotiklere direnç fenotipinin belirlenmesi için CLSI önerileri doğrultusunda çift disk sinerji testi (D-test) uygulandı⁸. Eritromisin ve klindamisine dirençli bulunan izolatlar yapısal MLS_B fenotipi (cMLS_B); klindamisin inhibisyon zonunun eritromisin diskine bakan tarafında küntleşme (D zonu) görülen izolatlar indüklenebilir MLS_B fenotipi (iMLS_B); eritromisine dirençli, klindamisine duyarlı olan izolatlar ise MS fenotipi olarak kabul edildi⁸. Eritromisin ve klindamisine duyarlı bulunan izolatlar duyarlı (S) fenotip olarak tanımlandı⁹.

Direnç Genotiplerinin Araştırılması

D-test ile dirençli bulunan *S.aureus* suşlarında *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA* ve *msrB* genlerinin varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırıldı. Bakteri DNA'sının elde edilmesinde ticari bir izolasyon kiti (G-Spin TM for Bacteria; Intron Biotechnology, Inc. Güney Kore) kullanıldı. PCR işlemi, termal döngü cihazında (BIO-RAD MyCycler, ABD), kullanılan primerlere (Invitrogen, ABD) uygun reaksiyon koşullarında gerçekleştirildi. Çalışmada Lina ve arkadaşlarının¹⁰ kullandığı primer dizileri ve döngüleri kullanıldı (Tablo I). PCR ürünleri 10x TBE tamponu içinde 2.5 µl etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde elektroforez cihazında (BIO-RAD, ABD) 150 voltta 25 dk yürütüldükten sonra DNA bantları Gel Logic 2200 Imaging System (Kodak, ABD) ile görüntüledi. Sonuçlar moleküler ağırlık standardı (100 bp; GeneOn, Almanya) ile karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) Analizi

Suşlar arasındaki klonal ilişkinin belirlenmesi amacıyla OLP6 (5'-GAGGGAAGAG-3'), OLP11 (5'-ACGATGAGCC-3') ve OLP13 (5'-ACCGCCTGCT-3') primerleri (Invitrogen, ABD) kullanılarak RAPD PCR uygulandı¹¹. PCR ürünleri 10x TBE tamponu içinde 2.5 µl etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde 150 voltta 25 dk yürütüldükten sonra Gel Logic 2200 Imaging System (Kodak, ABD) ile görüntüledi. Elde edilen bant paternleri, 100 bp'lik moleküler ağırlık standardı (GeneOn, Almanya) esas alınarak Syngene GeneDirectory Application-Ver. 2.01.02 (İngiltere) kullanılarak değerlendirildi.

İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizi SPSS Ver.16.0 kullanılarak yapıldı. Gruplar arası değişkenleri test etmek amacıyla ki-kare testi kullanıldı; p< 0.05 değeri anlamlı kabul edildi. Fenotipik ve genotipik sonuçlar arasındaki uyum, Measure of Agreement-Kappa testi ile belirlendi.

Tablo I. PCR Yönteminde Kullanılan Primerler ve Döngüler

Primer	Dizi (5'→3')	Ürün (bp)	PCR koşulları
ermA F	GTT CAA GAA CAA TCA ATA CAG AG	421	1x (94°C'de 10 d); 30x (94°C'de 30 s, 52°C'de 30 s, 72°C'de 1 d); 1x (72°C'de 10 d)
ermA R	GGA TCA GGA AAA GGA CAT TTT AC		
ermC F	GCT AAT ATT GTT TAA ATC GTC AAT TCC	572	1x (94°C'de 10 d); 35x (94°C'de 30 s, 52°C'de 1 d, 72°C'de 1 d); 1x (72°C'de 10 d)
ermC R	GGA TCA GGA AAA GGA CAT TTT AC		
ermB F	CCG TTT ACG AAA TTG GAA CAG GTA AAG GGC	359	1x (94°C'de 10 d); 30x (94°C'de 30 s, 55°C'de 30 s, 72°C'de 1 d); 1x (72°C'de 10 d)
ermB R	GAA TCG AGA CTT GAG TGT GC		
msrA F	GGC ACA ATA AGA GTG TTT AAA GG	940	1x (94°C'de 5 d); 35x (94°C'de 30 s, 60.6°C'de 40 s, 72°C'de 1 d); 1x (72°C'de 10 d)
msrA R	AAG TTA TAT CAT GAA TAG ATT GTC CTG TT		
msrB F	TAT GAT ATC CAT AAT AAT TAT CCA ATC	595	
msrB R	AAT TTA TAT CAT GAA TAG ATT GTC CTG TT		

F: Forward; R: Reverse; bp: Baz çifti; d: Dakika; s: Saniye.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 404 *S.aureus* suşunun %6.7'si poliklinik, %93.3'ü yatan hastalara ait yara (%50), trakeal aspirat (%15) ve diğer (%35) örneklerden izole edilmiştir. İzolatların %42'si cerrahi, %37'si dahili, %11'i pediatri ve %10'u yoğun bakım bölümlerinden gönderilen örneklerden elde edilmiştir. *S.aureus* suşlarının 158 (%39.1)'i metisiline dirençli (MRSA), 246 (%60.9)'sı metisiline duyarlı (MSSA) olarak bulunmuş; izolatların antibiyotiklere duyarlılıkları Tablo II'de gösterilmiştir.

Makrolid direnci D-test yöntemi ile araştırıldığında, suşlarının %66.3'ü S; %27.5'i iMLS_B; %4.7'si cMLS_B ve %1.2'si MS fenotipi olarak belirlenmiştir (Tablo III). Bir suş D-test ile sınıflandırılmayan direnç paterni göstermiştir. Bu suş eritromisine duyarlı, klindamisinine dirençli olduğu tespit edilen bir MRSA suşudur. iMLS_B direnci MRSA suşlarında, S fenotipi MSSA suşlarında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (p< 0.05).

D-test yöntemi ile dirençli saptanan, indüklenebilir klindamisin direnci pozitif 111 suş, klindamisin ve eritromisine dirençli 19 suş, eritromisine dirençli klindamisinine

Tablo II. *S.aureus* Suşlarının Antibiyotiklere Duyarlılıkları

	MRSA (n= 158)	MSSA (n= 246)	Toplam (n= 404)
Antibiyotikler	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)
Penisilin	0	52 (21.1)	52 (12.8)
Sefoksitin	0	246 (100)	246 (60.9)
Oksasilin	0	246 (100)	246 (60.9)
Azitromisin*	55 (34.8)	223 (90.6)	278 (68.8)
Klaritromisin*	56 (35.4)	219 (89)	275 (68)
Eritromisin*	55 (34.8)	219 (89)	274 (67.8)
Klindamisin	142 (89.9)	235 (95.5)	377 (93.3)
SXT	154 (97.5)	246 (100)	400 (99)
Linezolid	158 (100)	246 (100)	404 (100)
Telitromisin	147 (93)	240 (97.5)	387 (95.8)
Tetrasiklin*	26 (16.5)	233 (94.7)	259 (64.1)
Rifampisin*	28 (17.7)	244 (99.2)	272 (67.3)
Kloramfenikol	154 (97.5)	246 (100)	400 (99)
Siprofloksasin*	24 (15.1)	235 (95.5)	259 (64.1)
Moksifloksasin*	35 (22.1)	238 (96.7)	273 (67.6)
Gentamisin*	35 (22.1)	245 (99.6)	280 (69.3)
Kinupristin/Dalfopristin	157 (99.4)	245 (99.6)	402 (99.5)

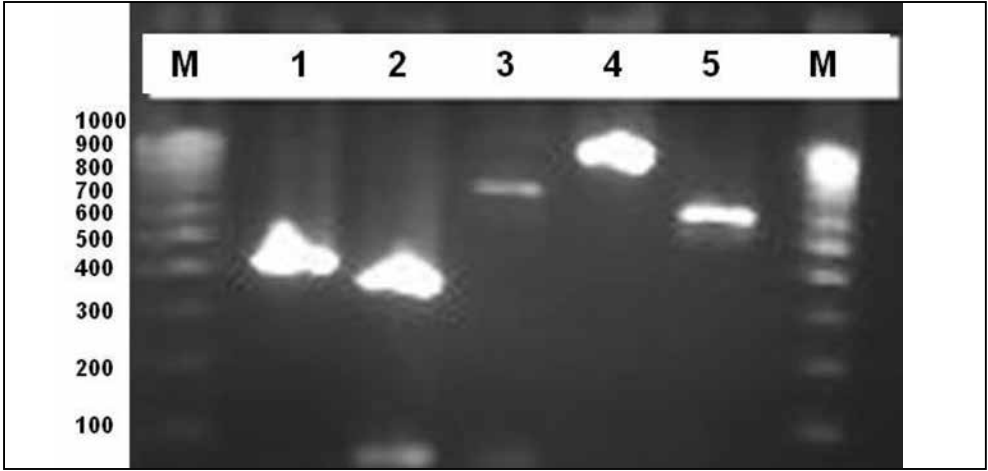
*p< 0.05
MRSA: Metisiline dirençli *S.aureus*; MSSA: Metisiline duyarlı *S.aureus*; SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol.

Tablo III. *S.aureus* Suşlarında D-test Yöntemi ile Belirlenen Direnç Fenotipleri

	MRSA (n= 158)	MSSA (n= 246)	Toplam (n= 404)
Direnç fenotipi	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)
S*	54 (34)	214 (87)	268 (66.3)
MS	2 (1.3)	3 (1.2)	5 (1.2)
iMLS _B	89 (56.3)	22 (8.9)	111 (27.5)
cMLS _B	12 (7.6)	7 (2.9)	19 (4.7)
Klindamisine dirençli, eritromisine duyarlı	1 (0.6)	0	1 (0.25)

* Eritromisin ve klindamisine duyarlı suşlar.

duyarlı 5 suş ve eritromisine duyarlı klindamisine dirençli (sınıflandırılmayan) 1 suş olmak üzere toplam 136 *S.aureus* suşunda *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA* ve *msrB* genlerinin varlığı PCR ile araştırılmıştır. Araştırılan gen bölgelerine ait bant görüntüleri Şekil 1’de sunulmuştur.



Şekil 1. *S.aureus* suşlarında direnç genlerine ait bant görüntüleri (M: 100 bç'lik moleküler ağırlık standardı; Hat 1: *ermA*; Hat 2: *ermB*; Hat 3: *ermC*; Hat 4: *msrA*; Hat 5: *msrB*).

iMLS_B fenotipi gösteren 83 MRSA ve 8 MSSA suşunda *ermA*, 1 MRSA suşunda *ermB*, 7 MRSA ve 5 MSSA suşunda *ermC*, 11 MRSA ve 1 MSSA suşunda *msrA*, 2 MRSA suşunda *msrB* direnç genleri saptanmıştır (Tablo IV). iMLS_B fenotipi gösteren MRSA suşlarının 66'sında ve MSSA suşlarının 10'unda direnç genlerinin tek başına; 18 MRSA ve 2 MSSA suşunda ise birlikte bulunduğu izlenmiştir (Tablo IV). iMLS_B fenotipi gösteren *S.aureus* suşlarında en sık *ermA* geni saptanmış ve bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.05$).

cMLS_B fenotipi gösteren 10 MRSA ve 1 MSSA suşunda *ermA*, 3 MRSA suşunda *ermB*, 6 MRSA ve 1 MSSA suşunda *ermC* genleri saptanmış; *msrA* ve *msrB* genlerine rastlanmamıştır (Tablo IV). Bu suşlarda izlenen gen birliktelikleri Tablo IV'te görülmektedir.

MS fenotipi gösteren 2 MRSA suşunda tek başına *ermA* genleri tespit edilmiş; 3 MSSA suşunda ise farklı gen birliktelikleri izlenmiştir (Tablo IV). MS fenotipi gösteren suşlarda *ermB* geni saptanmamıştır.

Suşlar arasındaki klonal ilişkinin belirlenmesi amacıyla RAPD-PCR uygulanmış (Şekil 2), OLP11 ve OLP13 primeri ile suşlar arasındaki benzerliğin daha iyi değerlendirildiği saptanmıştır. *ermA* pozitif 106 suş arasında OLP11 primeri ile yapılan RAPD analizinde 82 ve 86, 82 ve 83, 80 ve 87, 86 ve 83 no'lu suşlar arasında %99 oranında benzerlik olduğu saptanmıştır. 106 suş arasında 13 farklı RAPD tipinin olduğu belirlenmiştir (Şekil 3). Benzerlik oranının %98-99 olduğu suşların çoğu, kalp damar cerrahi, plastik cerrahi, beyin cerrahi ve göğüs cerrahi servislerinden gönderilen yara sürüntüsü ve trakeal aspirat örneklerinden izole edilen suşlardır. Kalp damar cerrahi servisinden gönderilen örneklerden izole edilen suşların kendi aralarındaki benzerlik oranları yüksek olarak saptanmış; bu suşların birbirine yakın 2 ay içinde izole edildikleri belirlenmiştir.

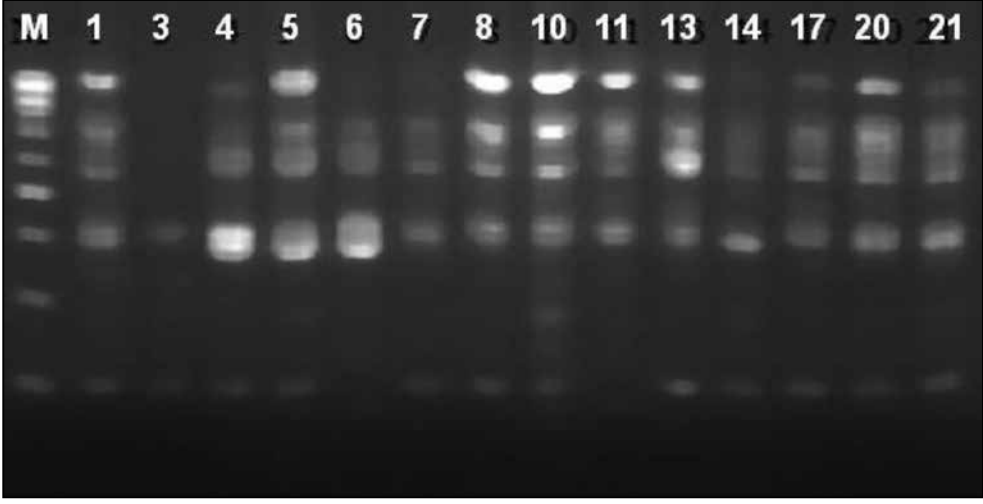
ermB pozitif 4 suştan 2'si arasında %95 oranında benzerlik olduğu, bir suş dışında diğer 3 suşın aynı ay içinde izole edildikleri görülmüştür. *ermC* pozitif 20 suştan

Tablo IV. iMLSB, cMLSB ve MS Fenotipi Gösteren Suşlarda Direnç Genleri ve Gen Grupları

iMLSB_B fenotipinde saptanan direnç genleri	MRSA (n= 89) n (%)	MSSA (n= 22) n (%)	Toplam (n= 111) n (%)
<i>ermA</i> α *	65 (73)	6 (27.2)	71 (63.9)
<i>ermB</i> α	0	0	0
<i>ermC</i> α	1 (1.1)	4 (18.1)	5 (4.5)
<i>msrA</i>	0	0	0
<i>msrB</i>	0	0	0
<i>ermA</i> + <i>ermB</i>	1 (1.1)	0	1 (0.9)
<i>ermA</i> + <i>ermC</i>	6 (6.7)	1 (4.5)	7 (6.3)
<i>ermA</i> + <i>msrA</i> + <i>msrB</i>	2 (2.2)	0	2 (1.8)
<i>ermA</i> + <i>msrA</i>	9 (10.1)	1 (4.5)	10 (9)
cMLSB_B fenotipinde saptanan direnç genleri	MRSA (n= 12) n (%)	MSSA (n= 7) n (%)	Toplam (n= 19) n (%)
<i>ermA</i> α	2 (16.6)	0	2 (10.5)
<i>ermB</i> α	1 (8.3)	0	1 (5.2)
<i>ermC</i>	0	0	0
<i>msrA</i>	0	0	0
<i>msrB</i>	0	0	0
<i>ermA</i> + <i>ermB</i>	2 (16.6)	0	2 (10.5)
<i>ermA</i> + <i>ermC</i>	6 (50)	1 (14.2)	7 (36.8)
MS fenotipinde saptanan direnç genleri	MRSA (n= 2) n (%)	MSSA (n= 3) n (%)	Toplam (n= 5) n (%)
<i>ermA</i> α	2 (100)	0	2 (40)
<i>ermB</i>	0	0	0
<i>ermC</i>	0	0	0
<i>msrA</i>	0	0	0
<i>msrB</i>	0	0	0
<i>msrA</i> + <i>msrB</i>	0	1 (33.3)	1 (20)
<i>msrA</i> + <i>msrB</i> + <i>ermA</i>	0	1 (33.3)	1 (20)
<i>msrA</i> + <i>ermC</i> + <i>ermA</i>	0	1 (33.3)	1 (20)

* p< 0.05; α: Tek başına gen pozitifliği.

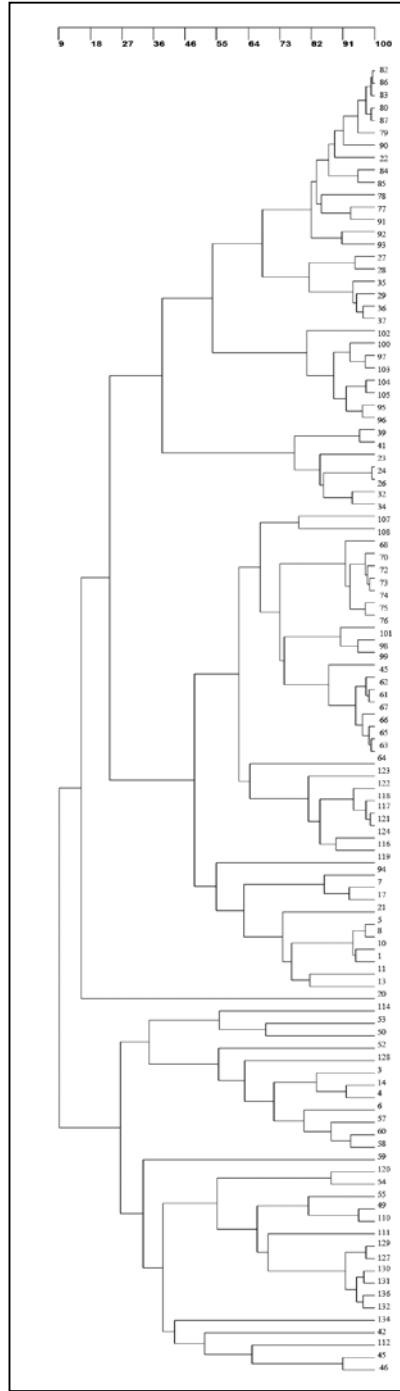
2'si arasında %97 oranında benzerlik olduğu saptanmıştır. *msrA* pozitif 15 suştan 8'i arasında %99 oranında benzerlik olduğu, benzerlik olan suşların aynı ay içinde izole edildikleri belirlenmiştir. *msrB* pozitif 4 suştan 2'si arasında %95 oranında benzerlik olduğu, bu suşların aynı ay içinde izole edildikleri saptanmıştır. RAPD analizi sonucunda, suşların dağılımı yönünden tek bir servis ve örnek tipi baskınlığı tespit edilmemiştir.



Şekil 2. *ermA* pozitif suşlar arasında OLP11 primeri ile yapılan RAPD analizinin PCR görüntüsü (M: 100 bç'lik moleküler ağırlık standardı; Hat 1, 3, 4-8, 10, 11, 13, 14, 17, 20, 21: *ermA* pozitif suşlar).

TARTIŞMA

Makrolidler, düşük yan etkiye sahip olmaları, geniş spektrumları, yüksek doku ve serum düzeyine ulaşmaları ile stafilocok enfeksiyonlarında alternatif tedavi seçeneği olarak kullanılan antibiyotiklerin başında yer almaktadır. MLS_B grubu antibiyotikler içinde yer alan klindamisin, tolere edilebilirliği, maliyeti, oral yoldan kullanım avantajı ve yüksek doku konsantrasyonu nedeniyle MRSA ve MSSA kaynaklı deri, yumuşak doku ve kemik enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra indüklenebilir klindamisin direnci ile ilişkili tedavi başarısızlıkları da bildirilmiştir¹². MLS_B direncinin sıklığı coğrafi olarak veya farklı hasta gruplarında ve farklı klinik örneklerden soyutlanan izolatlar arasında değişkenlik göstermektedir^{13,14}. Dünya genelinde indüklenebilir klindamisin direnç prevalansı %3.6 ile %94 arasında değişmekte ve farklı coğrafi bölgelerde, ülkeden ülkeye ve hatta aynı ülkede farklı bölgelerdeki hastane ve hasta gruplarında farklılıklar göstermektedir^{15,16}. Juyal ve arkadaşlarının⁹ yaptıkları çalışmada, MRSA izolatlarında cMLS_B, iMLS_B, MS ve duyarlı fenotipler sırasıyla %29, %19.4, %38.7 ve %12.9; MSSA izolatlarında ise sırasıyla %12.5, %6.3, %24.5 ve %56.7 oranında saptanmıştır. Bu araştırmacılar, MRSA suşlarında en sık MS fenotipinin görüldüğünü ve farklı coğrafi bölgelerde MLS_B direnç paterninin değişebileceğini belirtmişlerdir⁹. Seifi ve arkadaşlarının¹⁷ çalışmasında, MRSA izolatlarında en sık cMLS_B fenotipi (%52.3), MSSA izolatlarında ise en sık duyarlı fenotip (%73.9) tespit edilmiştir. Otsuka ve arkadaşları¹⁴ ise, iMLS_B fenotipini MSSA izolatlarında, MRSA kökenlerinden çok daha yaygın bulduklarını bildirmişler; *S.aureus* suşlarında fenotipik MLS_B direnç insidansının ilaç kullanımına, enfeksiyon çeşidine ve ülkelere göre değişebileceğini vurgulamışlardır. Ülkemizde Sarıbaş ve arkadaşlarının¹⁸ yaptıkları çalışmada, eritromisine dirençli *S.aureus* suşlarının %56.2'sinin iMLS_B, %40.2'sinin cMLS_B fenotipi gösterdiği; eritromisine dirençli koagülaz-negatif stafilocok (KNS) suşlarının ise %41.4'ünün iMLS_B, %34.5'inin cMLS_B ve %24.1'inin MS fenotipi gösterdiği saptan-



Şekil 3. *ermA* pozitif suşlara ait OLP11 primeri ile yapılan RAPD analizi.

miştir. Bu araştırmacılar, daha önce yaptıkları çalışmada en sık saptanan yapısal direnç fenotipinin, indüklenebilir dirence değiştiğini belirlemişler; bunun nedeninin klindamisin kullanımının azalmasına bağlı olabileceğini ifade etmişlerdir¹⁸. Çolakoğlu ve arkadaşları¹⁵, 892 *S.aureus* suşu ile indüklenebilir klindamisin direnç prevalansını araştırdıkları çalışmada, suşların 226'sını eritromisine dirençli ve klindamisine duyarlı olarak bulmuşlar; eritromisine dirençli bu suşlar içerisinde iMLS_B direnç oranını %76.5 olarak saptamışlardır. Bu oran tüm suşlar için %19.4 olarak belirlenmiş; standart duyarlılık testleri ile indüklenebilir klindamisin direncinin yanlış duyarlılık verebileceği, indüklenebilir direncin D-test ile belirlenmesinin tedavinin etkili ve güvenilir olması açısından önemli olduğu vurgulanmıştır¹⁵. Çalışmamızda, klinik örneklerden izole edilen *S.aureus* suşlarında toplam olarak indüklenebilir klindamisin direnç prevalansı %27.5 olarak bulunmuş; bu oran MRSA suşları için %56.3, MSSA suşları için %8.9 olarak saptanmıştır. MRSA suşlarında en sık indüklenebilir klindamisin direncinin saptanmasının sebeplerinden birisinin, hastanemizde yatan hastalarda klindamisin kullanımının kısıtlı olmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

S.aureus izolatlarında makrolid, linkozamid, streptogramin B direnci, eritromisin ribozom metilasyon (*erm*) genleri tarafından kodlanmaktadır. Bu hem yapısal hem de indüklenebilir özellikte olabilir. Dirence neden olan diğer mekanizmalar arasında, *msrA* ve *msrB* tarafından kodlanan aktif atım pompası genleri de tanımlanmıştır. Antibiyotiğin enzimatik inaktivasyonu yoluyla oluşan direnç sadece yapısal olarak ana antibiyotiğe benzeyen antibiyotiklere dirence sebep olmaktadır³. Stafilokoklarda makrolid, linkozamid, streptogramin B grubu antibiyotiklere karşı direncin fenotipik ve genotipik olarak tanımlanmasına yönelik araştırmalarda, hangi tip fenotipik dirençten hangi gen ve gen gruplarının sorumlu olduğu belirlenmeye çalışılmıştır. Lina ve arkadaşlarının¹⁰ yaptıkları çalışmada, MLS_B grubu antibiyotiklerden en az bir tanesine dirençli toplam 144 *S.aureus* ve 150 KNS izolatında *ermA*, *ermB*, *ermC*, *msrA*, *msrB*, *linA/linA'*, *vga*, *vgb* ve *vat* genlerinin varlığı araştırılmıştır. Bu çalışmada, *S.aureus* suşlarında *ermA*, *erm*, *ermC* ve *msrA* genlerinin bulunma sıklığı sırasıyla %63.2, %0.7, %25 ve %2.1 olarak saptanmış ve *S.aureus* suşlarında en sık *ermA* geninin bulunduğu belirtilmiştir¹⁰. Bir başka çalışmada da, 212 MSSA ve 314 MRSA izolatında *ermA*, *ermC* ve *msrA* genleri araştırılmış; toplam 129 suşta (17 MSSA, 112 MRSA) *ermA* geni tek başına ve en sık bulunan gen olarak saptanmış ve MRSA ve MSSA izolatlarında *ermA* ve *ermC* genlerinin MLS_B direncindeki önemi vurgulanmıştır¹⁹. Ülkemizde 2010 yılında yapılan bir çalışmada, *ermA*, *ermB*, *ermC* ve *msrA* genlerinin varlığı araştırılmıştır¹⁸. Fenotipik profil ile birlikte değerlendirildiğinde, cMLS_B fenotipine sahip izolatların %77.7 (35/45)'inde *ermA* ve *ermC* genleri bir arada saptanmış, ancak *msrA* geni hiçbir izolatta tespit edilmemiştir¹⁸. Ülkemizde yapılmış başka bir çalışmada, eritromisine dirençli 24 *S.aureus* ve 78 KNS izolatında *ermA*, *ermB* ve *ermC* genlerinin bulunma sıklığı sırasıyla %50, %8.3 ve %62.5 olarak belirlenmiştir²⁰. *S.aureus* suşlarında fenotipik olarak toplam beş izolatta MS fenotipi saptanmış olmasına rağmen üç izolatta *msrA* geni belirlenmiş; suşların %58.3'ünde cMLS_B, %20.8'inde iMLS_B fenotipi görülmüştür²⁰. Bu çalışmada, *S.aureus* suşlarında *ermA* ve *ermC* geni birlikteliği %37.5 oranında tespit edilmiştir²⁰. Bizim çalışmamızda, iMLS_B fenotipi gösteren suşların %81.9'unda *ermA*, %10.8'inde *ermC*, %10.8'inde *msrA*, %1.8'inde *msrB* ve

%0.9'unda *ermB*; cMLS_B fenotipi gösteren suşların %57.9'unda *ermA*, %36.8'inde *ermC* ve %15.8'inde *ermB*; MS fenotipi gösteren suşların %80'inde *ermA*, %75'inde *msrA*, %50'sinde *msrB* ve %25'inde *ermC* geni saptanmıştır. *ermA* ve *ermC* genleri 14 izolatta; *ermA*, *ermC* ve *msrA* genleri bir izolatta; *ermA* ve *msrA* genleri 11 izolatta; *ermA*, *msrA* ve *msrB* genleri üç izolatta; *ermA* ve *ermB* genleri üç izolatta birlikte saptanmıştır. Fenotipik ve genotipik sonuçlar arasında %77.7 oranında uyum tespit edilmiştir. Moleküler olarak direnç genlerinin araştırıldığı pek çok çalışmada birden fazla gen kombinasyonları saptanmış; en sık *ermA* ve *ermC* gen birlikteliği bildirilmiştir^{18,20,21}. Bizim çalışmamızda da *ermA* ve *ermC* genleri %10.3 oranında bir arada saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda en sık rastlanan genin *ermA* olduğu bildirilmiştir^{10,19,21,22}. Bu çalışmalarla uyumlu olarak bizim çalışmamızda da en sık *ermA* geni saptanmıştır.

Çalışmamızda, 23 *S.aureus* izolatu fenotipik olarak eritromisine dirençli saptanmasına rağmen, bu izolatlarda sorgulanan direnç genlerinden hiçbirisi belirlenememiştir. Benzer sonuçlar bu konuda yapılan diğer çalışmalarda da bildirilmiştir^{18,23}. Bu izolatlarda araştırılan genlerin dışında, makrolid direncine neden olabilecek *ereA/B*, *vat* gibi genlerin bulunmasının olası olabileceği düşünülmüştür. Çalışmamızda ayrıca, klindamisine dirençli, eritromisine duyarlı olan bir MRSA suşunda direnç genleri saptanmamış; bu dirençten *linA* geninin sorumlu olabileceği düşünülmüştür. Çalışmamızda D-testi negatif olan MS fenotipindeki iki MRSA suşunda tek başına *ermA*, iki MSSA suşunda ise *msr* genlerine ilaveten *erm* genleri de saptanmıştır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda, MS fenotipi gösteren *S.aureus* suşlarında *msr* genlerine ilaveten *erm* genleri bir arada bulunmamış; ancak MS fenotipi gösteren KNS izolatlarında *msr* genlerine ilaveten *erm* genleri bir arada saptanmıştır^{24,25}. Bizim çalışmamızda, *S.aureus* suşlarında *msr* genlerine ilaveten *erm* genleri de bir arada saptanmıştır. Bu durum D-test sinerji testi negatif olsa bile bazı suşlarda *erm* genlerinin olabileceğini göstermektedir. Direnç genlerini taşıyan bu suşlarda gen ekspresyonunun hangi mekanizma ile gerçekleştiği henüz tam olarak bilinmediğinden, in vitro olarak duyarlı görünen suşlar in vivo şartlarda direnç geliştirebilmektedirler. Bu durumdan dolayı klindamisine duyarlı gözükten suşların neden olduğu enfeksiyonlarda tedavi başarısızlığı görülebilmektedir.

Klonal benzerliğin araştırıldığı çalışmalarda suşlar arasında tek bir klonal tip hakimiyeti saptanmamıştır^{5,7}. Bu çalışmalardaki sonuçlara benzer şekilde, çalışmamızda da direnç genleri saptanan suşlar arasında tek bir klonal tipin hakimiyeti gözlenmemiştir.

S.aureus suşlarında makrolid direnç fenotip ve genotiplerinin belirlenmesi, bu suşların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek antibiyotiklerin seçimi açısından çok önemlidir. Stafilokokların neden olduğu enfeksiyonlarda önemli bir yeri olan klindamisinin direnç durumu bildirilmeden önce MLS_B direnç fenotipi belirlenmelidir. Standart antibiyotik duyarlılık testleri ile iMLS_B direnci gösteren stafilokok suşlarında klindamisin için yanlış duyarlı sonuç verilebileceği için, D-test ile iMLS_B direnç varlığının araştırılması değer taşımaktadır. Direnç mekanizmasının bilinmesi, klindamisin ve diğer MLS_B grubu antibiyotiklerin kullanılabilmesi açısından önemlidir. Ayrıca MLS_B direncine neden olan genetik temelin belirlenmesi ile, klinik ve epidemiyolojik olarak önemli veriler elde edileceği ve ileriye dönük çalışmalarda da yönlendirici olacağı kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Uyanık M, Yazgı H, Bilici D, Özden K, Karakoç E. Hastane kökenli *Staphylococcus aureus* türlerinde makrolid-linkozamid-streptogramin B direncinin araştırılması. ANKEM 2009; 23(2): 66-70.
2. Gönüllü N, Karaköse A, Çatal F, Küçükbasımacı Ö, Altinkum S, Torun M. Klinik örneklerden izole edilen stafilokok suşlarının makrolid ve linkozamid direnç fenotipleri. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2009; 39(1-2): 12-5.
3. Duygu E. Streptokoklarda makrolid, linkozamid, streptogramin B direnci. 6. Antimikrobik ve Kemoterapi Günleri, 8-10 Nisan 2004, İstanbul. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No: 47, s: 22-8.
4. 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.
5. Spiliopoulou I, Petinaki E, Papandreou P, Dimitracopoulos G. *erm(C)* is the predominant genetic determinant for the expression of resistance to macrolides among methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates in Greece. J Antimicrob Chemother 2004; 53(5): 814-7.
6. Schwendener S, Perreten V. New MLS_B resistance gene *erm(43)* in *Staphylococcus lentus*. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56(9): 4746-52.
7. Janapatla R, Yan J, Huang A, Chen H, Wu H, Wu J. 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.
8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Twenty-First Informational Supplement, M100-S21, 2011. CLSI, Wayne, PA.
9. Juyal D, Pal S, Sharma MK, Prakash R, Sharma N. The prevalence of inducible clindamycin resistance among staphylococci in a tertiary care hospital-a study from the Garhwal Hills of Uttarakhand, India. J Clin Diagn Res 2013; 7(1): 61-5.
10. Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43(5): 1062-6.
11. Reinosoa E, Betteraa S, Frigerioa C, DiRenzo M, Calzolaria A, Bognia C. RAPD-PCR analysis of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and human hosts. Microbiol Res 2004; 159(3): 245-55.
12. Levin TP, Suh B, Axelrod P, Truant AL, Fekete T. Potential clindamycin resistance in clindamycin-susceptible, erythromycin-resistant *Staphylococcus aureus*: report of a clinical failure. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49(3): 1222-4.
13. Schreckenberger PC, Ilendo E, Ristow KL. Incidence of constitutive and inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci in a community and a tertiary care hospital. J Clin Microbiol 2004; 42(6): 2777-9.
14. 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(3): 325-7.
15. Çolakoğlu Ş, Alışkan H, Turunç T ve ark. Klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus* suşlarında indüklenebilir klindamisin direnç prevalansı. Mikrobiyol Bul 2008; 42(3): 407-12.
16. Siberry GK, Tekle T, Carroll K, Dick J. Failure of clindamycin treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance in vitro. Clin Infect Dis 2003; 37(9): 1257-60.
17. Seifi N, Kahani N, Askari E, Mahdipour S, Naderi Nasab M. Inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates recovered from Mashhad, Iran. Iran J Microbiol 2012; 4(2): 82-6.
18. Sarbaş Z, Tunçkanat F, Özçakır O, Ercis S. Stafilokok klinik izolatlarında makrolid-linkozamid-streptogramin B (MLS_B) ve telitromisin direncinin araştırılması. Mikrobiyol Bul 2010; 44(2): 177-86.
19. Vandendriessche S, Kadlec K, Schwarz S, Denis O. Methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* ST398-t571 harbouring the macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance gene *erm(T)* in Belgian hospitals. J Antimicrob Chemother 2011; 66(11): 2455-9.

20. Aktaş Z, Arıdoğan A, Kayacan CB, Aydın D. Resistance to macrolide, lincosamide and streptogramin antibiotics in staphylococci isolated in Istanbul, Turkey. J Microbiol 2007; 45(4): 286-90.
21. Gül HC, Kılıç A, Guclu AU, Bedir O, Orhon M, Başustaoğlu AC. Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistant phenotypes and genotypes for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in Turkey, from 2003 to 2006. Polish J Microbiol 2008; 57(4): 307-12.
22. Çetin ES, Güneş H, Kaya S, Arıdoğan BC, Demirci M. Macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance phenotypes in clinical staphylococcal isolates. Int J Antimicrob Agents 2008; 31(4): 364-8.
23. Eady EA, Ross JL, Tipper JL, Walters CE, Cove JH, Noble WC. Distribution of genes encoding erythromycin efflux pump in epidemiologically distinct groups of staphylococci. J Antimicrob Chemother 1993; 31(2): 211-7.
24. Kaya I. Koagülaz pozitif ve koagülaz negatif stafilokok suşlarında makrolid, linkozamid, streptogramin B (MLSB) grubu antibiyotiklere direncin araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, 2011. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
25. Balaman N. Klinik materyallerden izole edilen stafilokoklarda makrolid, linkozamid ve streptogramin B direnci sıklığının disk yaklaştırma testi ve moleküler yöntemler kullanılarak araştırılması. (Doktora Tezi, 2008. Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara.