

## ***Streptococcus pneumoniae*'da Makrolid Direnç Mekanizmalarının Araştırılması: 2005-2008, Marmara Üniversitesi Hastanesi Sonuçları**

### ***Investigation of Macrolide Resistance Mechanisms in Streptococcus pneumoniae: Results of Marmara University Hospital Between 2005-2008***

Pınar SAĞIROĞLU, Burak AKSU, M Ufuk HASDEMİR

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, İstanbul, Türkiye

#### **ÖZET**

**Amaç:** Bu çalışmada enfeksiyon etkeni olarak izole edilen *Streptococcus pneumoniae* izolatlarında, makrolid direncinin fenotipik karakteristiklerinin ve genetik determinantlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntemler:** Eritromisin direnci gösteren 50 *S. pneumoniae* izolatının 14-, 15- üyeli makrolid ve linkozamid duyarlılıkları disk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleriyle saptanmıştır. Makrolid direnç fenotiplerini belirlemek üzere eritromisin-klindamisin çift disk testi kullanılmıştır. Makrolid direncinin genetik determinantları, *mef(E)/(A)*, *erm(B)* ve *erm(TR)*'nin saptanmasında Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) yöntemi kullanılmıştır.

**Bulgular:** İzolatlarımızın % 86'sı Makrolid-Linkozamid-Streptogramin B (MLSB) (%76 cMLSB ve %10 iMLSB), % 14'ü M fenotipi göstermiştir. PZR sonuçlarına göre 18 izolatta (% 36) tek başına *erm(B)*; 11 izolatta (% 22) tek başına *mef(E)/(A)* geni; geri kalan 21 (% 42) izolatta ise her iki gen birlikte saptanmıştır. *erm(B)* geni taşıyan tüm izolatlar (%78), yüksek düzey makrolid ve linkozamid direnci gösterirken, *mef(E)/(A)* genini tek başına taşıyan 11 izolatın 7'si M, 4'ü MLSB fenotipi göstermiştir. M fenotipindeki izolatların makrolid MİK'leri ise düşük düzeyde bulunmuştur.

**Sonuç:** Çalışmamızda *mef(A)/(E)* geninin tek başına ya da *erm(B)* ile birlikte izolatların %64'ü tarafından taşındığının gösterilmesi ayrıca M fenotipine sahip izolatların oranının da oldukça yüksek (%14) bulunması, aktif makrolid pompasının, ribozomal hedef mutasyonu ile birlikte hastanemiz pnömokok izolatlarının makrolid direncinde çok önemli rolü olduğunu ortaya koymaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** *Streptococcus pneumoniae*, makrolid direnci, *mef(A)/(E)*, *erm(B)*

#### **ABSTRACT**

**Objective:** In this study, we aimed to determine the phenotypic characteristics and genetic determinants of macrolide resistance in the clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*.

**Materials and Methods:** In 50 erythromycin resistant *S. pneumoniae* isolates, 14-, 15- membered macrolides and lincosamide susceptibilities were determined by both disk diffusion and broth microdilution methods. The erythromycin-clindamycin double disk method was applied for the detection of macrolide resistance phenotypes. Genetic determinants of macrolide resistance, *erm(B)*, *erm(TR)* and *mef(A)/(E)* were investigated by Polymerase Chain Reaction (PCR).

**Results:** The percentages of the isolates presenting Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B (MLSB) and M phenotypes were 86% (cMLSB phenotype: 76%; iMLSB phenotype: 10%) and 14%, respectively. According to the PCR results, 18 isolates (36%) had *erm(B)* gene, 11 isolates (22%) had *mef(E)/(A)* gene and the remaining 21 (%42) isolates had both *erm(B)* and *mef(A)/(E)* genes. All *erm(B)* positive isolates (78%) presented high level macrolide and lincosamide resistance. Seven out of 11 isolates carrying the *mef(A)/(E)* gene alone presented M phenotype with low level macrolide MICs.

**Conclusion:** The demonstration of the *mef(A)/(E)* gene either alone or together with *erm(B)* in a high proportion of the isolates (64%) in addition to the high rate of M phenotype (14%) signifies that active macrolide efflux together with the ribosomal target mutation has a significant role in the macrolide resistance of our pneumococcal isolates.

**Keywords:** *Streptococcus pneumoniae*, macrolide resistance, *mef(A)/(E)*, *erm(B)*

**Başvuru tarihi / Submitted:** 23.11.2010 **Kabul tarihi / Accepted:** 16.12.2010

**İletişim Bilgileri:** Dr. M. Ufuk Hasdemir, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, İstanbul, Türkiye, e-mail: ufukhasdemir@marmara.edu.tr

## GİRİŞ

*Streptococcus pneumoniae*, toplum kaynaklı pnömoni başta olmak üzere akut otitis media, akut bakteriyel sinüzit ve kronik bronşit alevlenmelerinin önde gelen etkenlerinden biri olup menenjit ve bakteriyemi gibi morbiditesi ve mortalitesi yüksek enfeksiyonlara da yol açan çok önemli bir patojendir. Pnömonikal enfeksiyonların tedavisinde uzun yıllar başarı ile kullanılan penisiline karşı direnç gösteren pnömokok izolatlarının sayısının son 20 yıldan bu yana tüm dünyada hızla artması, alternatif antibiyotiklerin tedavi protokoluna girmesini zorunlu kılmış ve bunlar arasında makrolid grubu antibiyotikler, yüksek etkinlikleri, düşük yan etkileri, doku ve serumda yüksek konsantrasyona ulaşma özellikleri ile ön sırada yerlerini almışlardır<sup>1</sup>. Ne var ki, pnömokoklar makrolidlere karşı direnç geliştirmekte de gecikmemişlerdir. Özellikle son 20 yıldan bu yana dünyanın bir çok bölgesinde makrolidlere dirençli pnömokok izolatlarının sayısı giderek artmaktadır<sup>2</sup>. Pnömonoklarda makrolid direncinin en yüksek olduğu uzak-doğu Asya'dan %80-90'lara ulaşan makrolid direnç oranları [Tayvan (%97.6), Japonya (%81.9), Hong Kong (%80.6), ve Çin (%81.6)] bildirilmektedir<sup>3</sup>. Bölgemize gelince, Avrupa Antimikrobiyal Direnç İzleme Sistemi'nin (EARSS) 2007 yılı raporuna göre Fransa, İtalya, Macaristan, Finlandiya ve Kıbrıs'ta makrolid dirençli pnömokokların oranı, % 25-50; İzlanda, İrlanda, Portekiz, Belçika, Avusturya, İsviçre, Hırvatistan, Bulgaristan, Romanya ve Türkiye'de % 10-25; İngiltere, Norveç, İsveç, Almanya, Hollanda, Çek Cumhuriyeti ve Litvanya'da % 5-10 arasındadır<sup>4</sup>. EARSS'in 2008 yılı raporunda Türkiye, %29'luk oranla, pnömokok izolatlarında makrolid direncinin % 25-50 arasında bildirildiği İtalya, Fransa, Macaristan ve Kıbrıs ile aynı grupta yerini almıştır<sup>5</sup>.

*Streptococcus pneumoniae*'nin klinikte önem taşıyan makrolid direncinden sorumlu olan iki ana mekanizma tanımlanmıştır. Bunlardan birincisinde transpozonlarla (Tn917, Tn6002 vb.) taşınan 'erythromycin ribosomal methylase B' [*erm(B)*] geninin kodladığı metilaz enzimi aracılığı ile 23S rRNA'daki adeninin metilasyonu sonucu antibiyotik hedefinde değişiklik ortaya çıkmaktadır. Bu genin yapısal ekspresyonu yüksek düzey makrolid, linkozamid, streptogramin B direnciyle ilişkili olup cMLSB fenotipinin ortaya çıkmasına yol açar. İndüklenebilir tipte ekspresyonu ise indükleyici makrolid ajanının varlığında direnç gelişimiyle sonuçlanır<sup>6,7</sup>. *erm(TR)* geni tarafından kodlanan metilaz enzimi de nadir olarak *S. pneumoniae*'da makrolid, linkozamid, streptogramin B direncine neden olabilir<sup>8</sup>. Pnömonoklarda MLSB fenotipi Asya, Avrupa ve Güney Afrika'da yaygın görülen bir fenotiptir<sup>2</sup>. Ülkemizde yapılan bazı çalışmalar da, makrolid dirençli pnömokoklarda MLSB fenotipinin baskın olduğunu göstermektedir<sup>9-11</sup>. *Streptococcus pneumoniae*'da ikinci ana makrolid direnç mekanizması, *mef(A)* ve *mef(E)* genlerinin denetimindeki aktif makrolid pompasıdır. Bu mekanizmaya sahip pnömokoklar M fenotipi sergilerler ve 14-, 15- üyeli makrolidlere dirençli; 16- üyeli makrolidlere, linkozamidlere ve streptogramin B'ye duyarlı bulunurlar<sup>12,13</sup>. M fenotipine sahip pnömokok izolatlarının oranı Amerika ve Japonya'da

%60-80'lere ulaşırken Avrupa'da %20'lerin altında kalmaktadır<sup>14</sup>. Pnömonoklarda, aralarında %90'ın üzerinde homoloji bulunan bu iki genden *mef(A)*, Tn1207.1 üzerinde; *mef(E)* ise 'macrolide efflux genetic assembly' (mega) olarak adlandırılan genetik element tarafından taşınmaktadır<sup>6</sup>. *mef(E)* taşıyan pnömokoklara Kuzey ve Güney Amerika ile Asya'da; *mef(A)* taşıyanlara ise Avrupa'da daha sık rastlanmaktadır<sup>15</sup>.

Pnömonoklarda makrolid direncinden sorumlu mekanizmaların bilinmesi, bu tür kökenlerin yol açtığı enfeksiyonlardan korunmada ve tedavi yaklaşımlarının düzenlenmesinde büyük öneme sahiptir. Bu çalışmada hastanemizde enfeksiyon etkeni olarak izole edilen ve makrolidlere dirençli bulunan *S. pneumoniae* izolatlarında, makrolid direncinin fenotipik karakteristiklerini ve genetik determinantlarını belirlemeyi amaçladık.

## GEREÇ ve YÖNTEM

2005-2008 yılları arasında Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen çeşitli klinik örneklerden, enfeksiyon etkeni olarak izole edilen ve eritromisine dirençli bulunan 50 *S. pneumoniae* kökeni çalışmaya dahil edilmiştir. İzolatların tanımlanması standart yöntemlerle yapılmıştır<sup>16</sup>. Elli *S. pneumoniae* izolatının 45'i solunum yolu örneklerinden, 3'ü göz sürüntüsü, 1'i beyin omurilik sıvısı (BOS), 1'i kan örneklerinden izole edilmiştir. Çalışmamıza dahil edilen kökenlerin % 70'i penisilinlere orta düzeyde dirençli, % 8'si yüksek düzeyde dirençli, % 82 'si tetrasiklin ve ko-trimaksazol dirençli, % 3'ü de kinolon dirençli bulunmuştur.

İzolatların eritromisin, klaritromisin, azitromisin ve klindamisin duyarlılıkları disk difüzyon yöntemiyle belirlenmiştir. Ayrıca aynı antibiyotiklerin minimum inhibitör konsantrasyonlarının (MİK) saptanmasında sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılmıştır<sup>17,18</sup>. İzolatların makrolid grubu antibiyotiklere direnç fenotiplerini saptamada eritromisin-klindamisin çift disk metodu kullanılmıştır<sup>17</sup>. Makrolid direncinden sorumlu genetik determinantlar, *erm(B)*, *erm(TR)*, *mef(A)*/(E) varlığı PZR yöntemi ile araştırılmıştır. Bu amaçla, bakteri DNA izolasyonu, 'Roche High Pure PCR template Preparation' kiti (Roche, Almanya) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapılmıştır. Ardından her gene özgü primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu ile hedef bölge amplifikasyonu yapılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primerler, *erm(B)* için f 5'-ATTGGAACAGGTTAAAGGGC-3' ve r 5'-GAACATCTGTGGTATGGCG-3'; *erm(TR)* için f 5'-ACAGAAAAACCCGAAAAATACG-3' ve r 5'-TTGGATAATTTATCAAGATCAG-3' dır. *mef(A)*/(E) geni tesbiti için iki farklı primer seti kullanılmıştır. Bunlardan biri *mef(A)*'ya özgü olduğu bildirilen, f 5'-TGGTTCGGTGCTTACTATTGT-3' ve r 5'-CCCCTATCAACATTCCAGA-3' dizisine sahip primer çifti; diğeri ise *mef(E)*'ye özgü olduğu bildirilen, f 5'-GGGAGATGAAAAAGAAGGAGT-3' ve r 5'-TAAAATGGCACCGAAAG-3' dizisine sahip primer çiftidir. Amplifikasyon için PZR koşulları, başlangıç denatürasyonu için 94°C'de 4', 1 siklus; denatürasyon için 94°C'de 1', primer bağlanma için

55°C'de 1', [*erm*(TR) için 50°C], uzama (elongasyon) için 72°C'de 1', 30 siklus ve son uzama (final elongasyon) için 72°C'de 7', 1 siklus olarak uygulandı<sup>19-22</sup>.

Polimeraz zincir reaksiyonu testlerinde, *erm*(B) pozitif *S. pneumoniae* ATCC 700677, *mef*(A) pozitif *S. pneumoniae* ATCC 700676, *mef*(E) pozitif *S. pneumoniae* KTL spn-237 ve *erm*(TR) pozitif *Streptococcus pyogenes* A200, pozitif kontrol kökenler olarak; bu genlerin hiç birini taşımayan *S. pneumoniae* ATCC 700675 ise negatif kontrol köken olarak kullanıldı<sup>23,24</sup>.

#### BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen *S. pneumoniae* izolatlarının hepsi disk difüzyon yöntemiyle test edilen 14- ve 15- üyeli makrolidlerin hepsine (eritromisin, klaritromisin, azitromisin) dirençli bulunmuştur. Klindamisin direnci ise izolatların %86'sinde belirlenmiş olup, 7 izolat (%14), disk difüzyon testinde klindamisine duyarlı saptanmıştır. Makrolid direnç fenotipini belirlemek üzere eritromisin-klindamisine yapılan çift disk testinde, izolatların %76'sı (n:38) cMLSB; %10'u (n:51) iMLSB, %14'ü (n:7) M fenotipinde bulunmuştur (Tablo I). MLSB fenotipine sahip izolatların hepsinin sıvı mikrodilüsyon testinde tüm antibiyotiklere karşı yüksek düzey direnç gösterdiği saptanmış olup makrolid ve linkozamid MİK50 / MİK90 değerleri Tablo 1'de verilmiştir. M fenotipi gösteren izolatların (%14) makrolid MİK değerleri göreceli olarak düşük

olup, klindamisin MİK'leri duyarlılık sınırları dahilinde saptanmıştır (Tablo I).

Makrolid direnç genlerini saptamak üzere yapılan PZR testi sonuçlarına göre *erm*(B), *mef*(A)/(E) ve *erm*(B)+*mef*(A)/(E)'yi taşıyan izolatların oranları sırasıyla %36, %22 ve %42'dir (Tablo 1). *erm*(TR) geni izolatların hiç birinde saptanmamıştır. *erm*(B) genini taşıyan tüm izolatlar (%78), cMLSB ve/veya iMLSB fenotipi sergilemişlerdir. Bu izolatlarda makrolid ve linkozamid MİK'leri yüksek düzeyde bulunmuştur (Tablo I). Tek başına *mef*(A)/(E) geni taşıyan 11 izolatın 7'si M fenotipi göstermiştir. Bu izolatların makrolid MİK'leri, cMLSB ve iMLSB fenotipindekilere kıyasla düşük olarak bulunmuştur. Klindamisin MİK'leri ise duyarlılık sınırları dahilinde kalmıştır (Tablo I). *mef*(A)/(E)'yi tek başına taşıdığı tesbit edilen diğer 4 izolatın 3'ü cMLSB, 1'i de iMLSB fenotipinde bulunmuştur.

Polimeraz zincir reaksiyonunda makrolid pompa genini saptamak üzere *mef*(A) ve *mef*(E)'ye özgü oldukları bildirilen iki farklı primer seti kullanılmıştır. Bu iki setten *mef*(A)'ya özgü olduğu ileri sürülen primer çiftiyle yapılan PZR testlerinde pozitif sonuç elde edilmemiştir. İzolatlarda aktif makrolid pompa geni varlığı, *mef*(E)'ye özgü primer çifti ile yapılan PZR testleriyle gösterilmiştir. Bu primer çiftiyle elde edilen PZR pozitifliği, *mef*(A) ve *mef*(E) genleri arasındaki yüksek homolojiden ötürü spesifiye etmeden *mef*(A)/(E) pozitifliği olarak ifade edilmiştir.

**Tablo I.** *Streptococcus pneumoniae* izolatlarının makrolid-linkozamid direnç fenotipi ve genotipi dağılımı

| Makrolid direnç genlerinin dağılımı n (%) |             |               |                               |          | Eritromisin (µg/ml) |           | Azitromisin (µg/ml) |           | Klaritromisin (µg/ml) |           | Klindamisin (µg/ml) |           |
|---|-------------|---------------|-------------------------------|----------|---------------------|-----------|---------------------|-----------|-----------------------|-----------|---------------------|-----------|
| Makrolid direnç fenotipi dağılımı         | <i>ermB</i> | <i>mefA/E</i> | <i>ermB+</i><br><i>mefA/E</i> | Toplam   | MİK<br>50           | MİK<br>90 | MİK<br>50           | MİK<br>90 | MİK<br>50             | MİK<br>90 | MİK<br>50           | MİK<br>90 |
| cMLSBa                                    | 15 (30)     | 3 (6)         | 20 (40)                       | 38 (76)  | >512                | >512      | >512                | >512      | 64                    | 64        | >512                | >512      |
| iMLSBb                                    | 3 (6)       | 1 (2)         | 1 (2)                         | 5 (10)   | >512                | >512      | >512                | >512      | 64                    | 128       | >512                | >512      |
| M   | -           | 7 (14)        | -                             | 7 (14)   | 4                   | 8         | 2                   | 4         | 4                     | 8         | 0.25                | 0.25      |
| Toplam                                    | 18 (36)     | 11 (22)       | 21 (42)                       | 50 (100) |                     |           |                     |           |                       |           |                     |           |

a konstitütif MLSB fenotipi

b indüklenbilir MLSB fenotipi

## TARTIŞMA

*Streptococcus pneumoniae* izolatları arasında makrolid grubu antibiyotiklere karşı direncin hızla yayılması, bu grup antibiyotiklerin pnömokok enfeksiyonlarının tedavisinde uzun vadeli olarak kullanımını tehdit eder niteliktedir. Son 10 yıldan bu yana yapılan çalışmalar, dünyanın birçok bölgesinde olduğu gibi ülkemizde de makrolidlere direnç gösteren pnömokokların insidansının giderek arttığını ortaya koymaktadır<sup>9-11</sup>.

Hastanemizde 2005-2008 yılları arasında izole edilen ve eritromisine dirençli bulunan 50 pnömokok izolatında makrolid direncinin fenotipik ve genotipik karakteristiklerini belirlemek üzere yaptığımız bu çalışmada, izolatlarımızın %76'sının cMLSB, %10'unun iMLSB, %14'ünün M fenotipinde olduğunu saptadık. cMLSB ve iMLSB fenotipindeki izolatlar, sıvı mikrodilüsyon testinde 14- ve 15- üyeli makrolidlerin (eritromisin, azitromisin, klaritromisin) hepsine ve klindamisine karşı yüksek düzeyde dirençli bulundular (Tablo I). Buna karşın M fenotipine sahip izolatların makrolidlere düşük düzeyde direnç gösterdikleri, klindamisin MİK'lerinin ise duyarlılık sınırları içinde kaldığı tesbit edildi (Tablo I). Çalışmamızda M fenotipinin %14 gibi azımsanmayacak bir oranda tesbit edilmesi, ribozomal hedef değişikliğinin yanı sıra aktif makrolid pompasının da, izolatlarımızın makrolidlere karşı direncinde etkin rolü olduğunu göstermektedir. Ülkemizde yapılan diğer çalışmalar, MLSB fenotipine sahip pnömokokların bizdekine kıyasla çok daha yüksek (>%95) oranlarda olduğunu ve M fenotipine sahip pnömokokların oranının %3'ü geçmediğini göstermektedir<sup>9-11</sup>.

Makrolid direncinin genetik determinantlarını belirlemek üzere yapılan PZR testiyle, izolatların %36'sında sadece *erm(B)* genini, %22'sinde sadece *mef(A)/(E)* genini, %42'sinde de her iki geni birlikte saptanmıştır (Tablo 1). İzolatlarımızda *mef(A)/(E)* geninin toplamda %64'lük bir oranla nerdeyse *erm(B)* geninin saptanma oranına (%78) yakın bir oranda tesbit edilmiş olması çalışmamızın en çarpıcı sonuçlarından biridir (Tablo I). Ülkemizde bu konuda yapılan diğer çalışmalarda *mef(A)/(E)* geninin makrolid dirençli pnömokoklarda saptanma oranı %16,5'i geçmemektedir<sup>9,11</sup>. Bu yönüyle çalışmamız ülkemizde makrolid dirençli pnömokoklarda *mef(A)/(E)* geninin yaygınlığını gösteren ilk çalışmadır. *mef(A)/(E)*'nin genotipteki bu yaygınlığının fenotipe yansıma oranı %14'de kalmıştır (Tablo 1). Bunun nedeni *mef(A)/(E)* genini taşıyan izolatların büyük çoğunluğunun *erm(B)* genini de taşımaları ve dolayısıyla MLSB fenotipini sergilemeleridir. Çalışmamızda her iki makrolid direnç genini birlikte taşıyan izolatların oranı %42 olarak bulunmuştur. Son yıllarda dünyanın çeşitli bölgelerinden makrolid direnci gösteren pnömokok izolatlarında *erm(B)* ve *mef(A)/(E)* genlerinin birlikte bulunma sıklığının giderek arttığına dikkat çekilmektedir. Bu iki geni bir arada taşıyan izolatlara özellikle Rusya, Güney Afrika, Asya ve A.B.D'de rastlanmaktadır<sup>2</sup>. Ülkemizin değişik bölgelerinde yapılan çalışmalarda, her iki geni birlikte taşıyan izolatların oranının % 2,5'u geçmediği

görülmektedir<sup>10,11</sup>. Bu sonuçlar, *mef(A)/(E)* denetimindeki aktif ilaç pompasının, buzdağının görünmeyen kısmı gibi izolatlarımızın makrolid direncinde gizli bir tehdit olarak var olduğunu ve bu durumun bölgemizde izole edilen pnömokokların makrolid direncinin değerlendirilmesinde mutlaka dikkate alınması gerekliliğini ortaya koymaktadır. Çalışmamızın ilginç sonuçlarından bir diğeri, *mef(A)/(E)*'yi tek başına taşıyan izolatların bir kısmının M fenotipi yerine MLSB fenotipi sergilemiş olmalarıdır (Tablo I). Bu izolatlarda *erm(B)* ya da *erm(TR)* genlerinin saptanmamış olması, izolatların yüksek düzey makrolid-linkozamid direncinden, nadir rastlanan makrolid direnç mekanizmalarından birinin (ribozomal L22 veya L4 proteinlerinde alterasyon) sorumlu olabileceğini düşündürmektedir<sup>6</sup>.

Bilindiği üzere pnömokoklarda aktif makrolid pompasına bağlı direnç esas olarak iki genin kontrolü altındadır: Bunlardan biri *mef(A)*, diğeri ise *mef(E)*'dir. Ancak her iki gen arasında %90'ın üzerinde homoloji olması, bu genlerin PZR yöntemiyle ayırt edilmesini zorlaştırmaktadır<sup>25</sup>. DNA hibridizasyonu, restriksiyon enzimleri ile kesim, PCR-RFLP gibi ileri moleküler yöntemler kullanılarak yapılan çalışmalar bu iki genin dağılımının da coğrafik farklılıklar gösterdiğini ortaya koymaktadır. Biz çalışmamızda iki gen arasındaki yüksek homolojiyi dikkate alarak, izolatlarımızın makrolid direncinden sorumlu aktif makrolid pompa genini saptama duyarlılığını arttırmak üzere, *mef(A)* ve *mef(E)*'ye özgü oldukları bildirilen iki farklı primer seti kullandık. Bunlardan *mef(A)*'ya özgü primer çifti ile hiçbir izolatta pozitif sonuç elde edemedik. Buna karşın, *mef(E)*'ye özgü primer çifti ile yapılan PZR'de, izolatlarımızın %64'ünde *mef* geni varlığını gösterdik. Bu durum, PZR ile *mef* genini saptamaya yönelik araştırmalarda uygun primer çiftlerinin seçiminin önemini ortaya koymaktadır. Öte yandan izolatlarımızın makrolid MİK değerlerinin, literatürde bildirilen *mef(E)* fenotipine benzemesi, kökenlerimizdeki aktif pompa geninin *mef(E)* olabileceğini destekleyen bir bulgudur<sup>19</sup>. Bu izolatlarda ileri moleküler analizlerle *mef(A)*, *mef(E)* kesin ayırımının yapılması, bölgemizde pnömokoklarda baskın olan aktif makrolid pompa geninin belirlenmesi açısından önemlidir.

Son olarak çalışmamıza dahil ettiğimiz kökenlerin %86'sının MLSB fenotipi göstermiş olması ve makrolid ve linkozamid MİK değerlerinin yüksek düzeyde bulunması her iki ilaç grubunun tedavide kullanılabilmesini imkansız hale getirmiştir. Öte yandan test edilen kökenlerin % 14'ünün M fenotipi göstermesi, bu kökenlerin eritromisin, klaritromisin ve azitromisin için MİK değerlerinin 2 ile 8 µg/mL arasında düşük düzeyde bir direnç paterni göstermesi ve bunun yanında klindamisin MİK değerlerinin 0.25 µg/mL ile hassas sınırları içinde kalması, bu kökenlerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde linkozamid grubu antibiyotiklerin kullanılabilmesini göstermektedir. Sonuç olarak rutin laboratuvarlarda pnömokok izolatlarının makrolid duyarlılıklarına ilaveten linkozamid duyarlılıklarının da test edilmesi

gerekmektedir. Böylece makrolidlere direnç gösteren pnömokokların neden olduğu enfeksiyonların bir kısmında linkozamid grubu antibiyotiklerin kullanım şansı olabilecektir.

Makrolidlere dirençli pnömokokların oranı ülkeden ülkeye, bölgeden bölgeye, hastaneden hastaneye hatta aynı hastane içinde çeşitli birimler arasında farklılıklar göstermektedir. Çalıştığımız kökenlerdeki yüksek eritromisin direncinden sorumlu olan ana mekanizma hedef değişikliğine bağlı *erm* (B) olarak bulunmasına rağmen yalnız başına ya da *erm*(B) ile birlikte bulunan yüksek *meF*(A)/(E) geni varlığı bölgemizdeki makrolid dirençli pnömokoklar açısından yeni bir tehdit olarak karşımıza gelmektedir.

#### Bilgilendirme

Bu çalışma, M.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No.: **SAG-C-TUP-110908-0218**).

Bu çalışma Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulunca **05.09.2008** tarihinde ve **B.30.2.MAR.0.01.02/AEK/567** sayılı karar ile onaylanmıştır.

#### KAYNAKLAR

1. Musher, D. M. *Streptococcus pneumoniae*. In: Mandell GL., Bennett JE., Dolin R., eds. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. New York: John Wiley & Sons, 2004:2392-2411. doi:10.1086/507699
2. Liñares J, Ardanuy C, Pallares R, Fenoll A. Changes in antimicrobial resistance, serotypes and genotypes in *Streptococcus pneumoniae* over a 30-year period. *Clin Microbiol Infect* 2010;16(5):402-410. doi:10.1111/j.1469-0691.2010.03182.x
3. Farrell DJ, Couturier C, Hryniewicz W. Distribution and antibacterial susceptibility of macrolide resistance genotypes in *Streptococcus pneumoniae*: PROTEKT year 5 (2003–2004). *Int J Antimicrob Agents* 2008;31:245–249. doi:10.1016/j.ijantimicag.2007.10.022
4. The European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) Annual Report 2007 [http://www.rivm.nl/earss/result/Monitoring\_reports/Annual\_reports.Jsp]
5. The European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) Annual Report 2008 [http://www.rivm.nl/earss/result/Monitoring\_reports/Annual\_reports.Jsp]
6. Valardo PE, Montanari MP, Giovanetti E. Genetic elements responsible for erythromycin resistance in streptococci. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(2):343-353. doi: 10.1128/AAC.00781-08
7. Leclercq R, Courvalin P. Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(9): 2727-2734. doi: 10.1128/AAC.46.9.2727-2734.2002
8. Camilli R., Del Grosso M., Iannelli F., Pantosti A... New genetic element carrying the erythromycin resistance determinant *erm*(TR) in *Streptococcus pneumoniae*: insertion sites and association with other genetic elements. *Antimicrob. Agents Chemother* 2008;52:619–625. doi: 10.1128/AAC.01081-07
9. Sener B, Köseoglu O, Gür D, Bryskier A. Mechanisms of macrolide resistance in clinical pneumococcal isolates in a university hospital, Ankara, Turkey. *J Chemother* 2005;17(1):31-35.
10. Gür D, Mülazımoğlu L, Ünal S. In Vitro susceptibility of respiratory isolates of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* to telithromycin and 11 other antimicrobial agents: Turkish results of e-BASKETT II surveillance study. *Mikrobiyol Bul* 2007;41(1):1-9.
11. Gülay Z, Özbek ÖA, Biçmen M, Gür D. Macrolide resistance determinants in erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Turkey. *Jpn J Infect Dis* 2008;61, 490-493.
12. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: Nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis* 2002; 34: 482–492. doi: 10.1086/324626
13. Hasdemir U. Çoklu ilaç direncinde bakteri hücre duvarı organizasyonunun ve aktif pompa sistemlerinin rolü. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2007; 41(2): 309-327.
14. Lynch III JP, Martinez FJ. Clinical relevance of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* for community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis* 2002; 34 (Suppl 1): S27-S46. doi: 10.1086/324527
15. Daly MM, Doktor S, Flamm R, Shortridge D. Characterization and prevalence of *MefA*, *MefE*, and the associated *msr*(D) gene in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 2004;42(8):3570-3574. doi: 10.1128/JCM.42.8.3570-3574.2004
16. *Streptococci and related genera*. In: Baron EJ, Peterson LR, Tenover FC, eds. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology*. 9th ed. St Louis, MO: Mosby, 1994; 333–352.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Sixteenth informational supplement. M100-S19. Wayne, PA. CLSI; 2009.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved Standard, 7th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. CLSI; 2006.
19. Amezcua MR., Carter PE., Cash P., McKenzie H.. Molecular epidemiology of erythromycin resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolates from blood and noninvasive sites. *J Clin Microbiol* 2002;40:3313–3318.
20. Seppälä H, Skurnik M, Soini H, Roberts MC, Huovinen P. A novel erythromycin resistance methylase gene (*erm*TR) in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42(2):257-262.

21. Clancy, J., Petitpas J., Dib-Hajj F., et al. Molecular cloning and functional analysis of a novel macrolide-resistance determinant, *mefA*, from *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* 1996;22:867-879. doi: 10.1046/j. 1365-2958.1996.01521.x
22. Tait-Kamradt, A., Clancy J., Cronan M., et al. *mefE* is necessary for the erythromycin-resistant M phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:2251-2255.
23. Reinert RR, Lütticken R, Bryskier A, Al-Lahham A. Macrolide-Resistant *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* in the Pediatric Population in Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47(2):489-493. do.: 10.1128/AAC.47.2.489-493.2003
24. Kataja J, Huovinen P, Seppala H. Erythromycin resistance genes in group A streptococci of different geographical origins. *J Clin Microbiol* 2000; 46:789-792. doi: 10.1093/jac/46.5.789
25. Klaassen CH, Mouton JW. Molecular detection of the macrolide efflux gene: to discriminate or not to discriminate between *mef(A)* and *mef(E)*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005 Apr;49(4):1271-1278. doi: 10.1128/AAC.49.4.1271-1278.2005