

---

## ÖZGÜN ARAŞTIRMA

---

# ***Streptococcus pneumoniae*'da *mef(A)/(E)* Denetimindeki Aktif Makrolid Pompasının, *erm(B)* Denetimindeki Makrolid Direncine Katkısı: Marmara Üniversitesi Hastanesi 2009 Sonuçları**

## ***The Contribution of *mef(A)/(E)* Mediated Active Macrolide Efflux to the *erm(B)* Mediated Macrolide Resistance in *Streptococcus pneumoniae*: 2009 Results of Marmara University Hospital***

**Burçin Karaçanlı, Burak Aksu, Ufuk Hasdemir**

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kadıköy-İstanbul

---

### **ÖZET**

**Amaç:** Bu çalışmada enfeksiyon etkeni olarak izole edilen *Streptococcus pneumoniae* izolatlarında, makrolid direncinin fenotipik özelliklerinin ve genetik belirleyicilerinin saptanması amaçlandı.

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

**Bulgular:** İzolatlarımızın %70'i cMLS<sub>B</sub>, %28'i M ve %2'si iMLS<sub>B</sub> fenotipi gösterdi. PZR sonuçlarına göre 20 izolatta (%40) tek başına *erm(B)*; 15 izolatta (%30) tek başına *mef(E)/(A)* geni; geri kalan 15 (%30) izolatta ise her iki gen birlikte saptandı. *erm(B)* geni taşıyan tüm izolatlar (%70), yüksek düzey makrolid ve linkozamid direnci gösterdi. Yalnız *mef(E)/(A)* geni taşıyan izolatların (%30) makrolid MİK'leri ise göreceli olarak düşük bulundu. Bu izolatların klindamisin MİK'leri duyarlılık sınırları içinde kaldı.

**Sonuç:** Çalışmamızda *mef(A)/(E)* geninin izolatların %60'ı tarafından taşındığının gösterilmesi ayrıca M fenotipine sahip izolatların oranının da oldukça yüksek (28%) 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

## SUMMARY

**Objective:** In this study, we aimed to determine phenotypic characteristics and genetic determinants of macrolide resistance in 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. 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 PCR.

**Results:** The percentages of the isolates presenting cMLS<sub>B</sub>, M and iMLS<sub>B</sub> phenotypes were 70%, 28%, and 2%, respectively. According to the PCR results, 20 isolates (40%) had *erm(B)* alone and 15 isolates (30%) had *mef(E)/(A)* alone. In the remaining 15 (%30) isolates, *erm(B)* and *mef(A)/(E)* genes were found concomitant. All *erm(B)* positive isolates (70%) presented high level macrolide and lincosamide resistance. In contrast, macrolide MICs of the isolates carrying *mef(A)/(E)* gene alone (30%), were relatively low while their clindamycin MICs remained in the susceptible ranges.

**Conclusion:** Demonstration of *mef(A)/(E)* gene and M phenotype in the 60% and 28% of the isolates, respectively in this study suggests that active macrolide efflux together with the ribosomal target mutation has significant role in the macrolide resistance of our pneumococcal isolates.

**Key Words:** *Streptococcus pneumoniae*, macrolide resistance

## 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. Bu patojenin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde uzun yıllar başarı ile kullanılan penisiline karşı direnç gösteren pnömokok izolatlarının tüm dünyada hızla yayılması, 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 (1). Ne var ki, pnömokoklar makrolidlere karşı direnç geliştirmekte de gecikmemişler ve özellikle son 20 yıldan bu yana dünyanın birçok bölgesinde makrolidlere dirençli pnömokok izolatlarının sayısının giderek arttığı bildirilmiştir (2). Pnömokoklarda makrolid direncinin en yüksek olduğu uzak-doğu Asya'dan %80-90'lara ulaşan makrolid direnç oranları bildirilmektedir (3). Bölge-

mize gelince Avrupa Antimikrobiyal Direnç İzleme Sistemi'nin (EARSS) 2007 yılı raporuna göre invaziv örneklerden (kan, BOS) izole edilen pnömokoklarda makrolid direnç oranları, Fransa, İtalya, Macaristan, Finlandiya ve Kıbrıs'ta % 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 (4). EARSS'ın 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 (5).

*S. 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 ifadesi yüksek dü-

zey makrolid, linkozamid, streptogramin B direnciyle ilişkili olup cMLS<sub>B</sub> fenotipinin ortaya çıkmasına yol açar. İndüklenebilir tipte ifadesi ise iMLS<sub>B</sub> fenotipinin ortaya çıkmasına; indükleyici makrolid ajanın varlığında direnç gelişmesine yol açar (6,7). *erm(TR)* geni tarafından kodlanan metilaz enzimi de nadir olarak *S. pneumoniae*'da makrolid, linkozamid, streptogramin B direncine neden olabilir (8). Pnömonoklarda MLS<sub>B</sub> fenotipi Asya, Avrupa ve Güney Afrika'da yaygın görülen bir fenotiptir (2). Ülkemizde yapılan bazı çalışmalar da, makrolid dirençli pnömonoklarda MLS<sub>B</sub> fenotipinin baskın olduğunu göstermektedir (9-11). *S. pneumoniae*'da ikinci ana makrolid direnç mekanizması, ilk kez *Streptococcus pyogenes*'te bulunan daha sonra *S. pneumoniae*'da da gösterilen *mef(A)* ile varlığı ilk kez *S. pneumoniae*'da gösterilen *mef(E)* geninin kodladığı aktif pompa proteinleri tarafından 14- ve 15- üyeli makrolidlerin hücre dışına pompalanması ile ortaya çıkan direnç mekanizmasıdır. Bu mekanizmaya sahip pnömonoklar M fenotipi gösterir ve 16-üyeli makrolidlere, linkozamidlere ve streptogramin B'ye duyarlı kalır (12,13). M fenotipine sahip pnömonok izolatlarının oranı Amerika ve Japonya'da %60-80'lere ulaşırken Avrupa'da %20'lerin altında kalmaktadır (14). 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 (6). *mef(E)* taşıyan pnömonoklara Kuzey ve Güney Amerika ile Asya'da; *mef(A)* taşıyanlara ise Avrupa'da daha sık rastlanmaktadır (15).

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 özelliklerini ve genetik belirleyicilerinin saptanmasını amaçladık.

## GEREÇ ve YÖNTEM

Ocak-Aralık 2009 tarihleri arasında Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen çeşitli klinik örneklerden, enfeksiyon etkeni olarak izole edilen 118 *S. pneumoniae* kökeni arasından rutin disk difüzyon testi ile eritromisine dirençli bulunan 50 köken çalışmaya dahil edildi. İzolatların tanımlanması standart yöntemlerle yapıldı (16). Elli *S. pneumoniae* izolatının % 94'ü solunum yolu örneklerinden, % 4'ü beyin omurilik sıvısı (BOS), % 2'si kan örneklerinden izole edildi.

İzolatların eritromisin, klaritromisin, azitromisin ve klindamisin duyarlılıkları disk difüzyon yöntemiyle belirlendi. Ayrıca aynı antibiyotiklerin minimum inhibitör konsantrasyonlarının (MİK) saptanmasında sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanıldı (17,18). İzolatların makrolid grubu antibiyotiklere direnç fenotiplerini saptamada eritromisin ve klindamisin çift disk metodu kullanıldı (17). Makrolid direncinden sorumlu genetik determinantlar, *erm(B)*, *erm(TR)*, *mef(A)/(E)* varlığı PZR yöntemi ile araştırıldı. Bu amaçla, bakteri DNA izolasyonu 'Roche High Pure PCR template Preparation' kiti (Roche, Almanya) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı. Ardından her gene özgü primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu ile hedef bölge amplifikasyonu yapıldı. Polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primerler, *erm(B)* için f 5'-ATTGGAACAGGTA-AAGGGC-3' ve r 5'-GAACATCTGTGG-TATGGCG-3'; *erm(TR)* için f 5'-ACAGAAA-AACCCGAAAATACG-3' ve r 5'-TTGGA-

TAATTTATCAAGATCAG-3'; *mef(A)/(E)* geni tespiti 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'-GGGAGATGAAAAGAAGGAGT-3' ve r 5'-TAAAATGGCACCGA-AAG-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 (19-22).

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 (23,24).

## BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen *S. pneumoniae* izolatlarının hepsi disk difüzyon yöntemiyle test edilen 14- ve 15- üyeli makrolidlerin hepsine (eritro-

misin, klaritromisin, azitromisin) dirençli bulunmuştur. Klindamisin direnci ise izolatların %70'inde belirlenmiş olup, 15 izolat (%30), disk difüzyon testinde klindamisine duyarlı saptanmıştır. Makrolid direnç fenotipini belirlemek üzere eritromisin-klindamisinle yapılan çift disk testinde de, izolatların %70'i (n:35) cMLS<sub>B</sub>; %2'si (n:1) iMLS<sub>B</sub>, %28'i (n:14) ise M fenotipinde bulunmuştur (Tablo 1). cMLS<sub>B</sub> fenotipine sahip izolatların hepsinin sıvı mikrodilüsyon testinde tüm antibiyotiklere karşı yüksek düzey direnç gösterdiği saptanmış olup makrolid ve linkozamid MİK<sub>50</sub>/MİK<sub>90</sub> değerleri Tablo 1'de verilmiştir. M fenotipi gösteren izolatların (%28) makrolid MİK değerleri göreceli olarak düşük olup, klindamisin MİK'leri duyarlılık sınırları dahilinde saptanmıştır (Tablo 1).

Makrolid direnç genlerini saptamak üzere yapılan PZR testi sonuçlarına göre *erm(B)* geni tek başına izolatların %40'ında, *mef(A)/(E)* geni tek başına izolatların %30'unda, her iki gen birlikte izolatların %30'unda saptanmıştır (Tablo 1). *erm(B)*'yi tek başına ya da *mef(A)/(E)* ile birlikte taşıyan izolatların tümü (%70), cMLS<sub>B</sub> fenotipine sahip olup, makrolid ve linkozamid MİK'leri yüksek düzeydedir (Tablo 1). Tek başına *mef(A)/(E)* taşıyan 15 izolatın 14'ü, M fenotipi göstermiş olup, makrolid MİK'leri, cMLS<sub>B</sub> fenotipindekilere kıyasla düşük olarak

**Tablo 1.** *Streptococcus pneumoniae* izolatlarının makrolid-linkozamid direnç fenotipi ve genotipi

	Makrolid direnç genleri dağılımı (%)				Eritromisin µg/ml		Azitromisin µg/ml		Klaritromisin µg/ml		Klindamisin µg/ml	
	<i>ermB</i>	<i>mefA/E</i>	<i>ermB+mefA/E</i>	Toplam	MİK <sub>50</sub>	MİK <sub>90</sub>	MİK <sub>50</sub>	MİK <sub>90</sub>	MİK <sub>50</sub>	MİK <sub>90</sub>	MİK <sub>50</sub>	MİK <sub>90</sub>
<b>Makrolid fenotip dağılımı</b>												
cMLS <sub>B</sub> <sup>a</sup>	20 (40)	-	15 (30)	35 (70)	>512	>512	>512	>512	512	512	256	512
iMLS <sub>B</sub> <sup>b</sup>	-	1 (2)	-	1 (2)	- <sup>c</sup>	-	-	-	-	-	-	-
<b>M</b>	-	14 (28)	-	14 (28)	4	16	8	32	2	4	0.06	0.06
<b>Toplam</b>	20 (40)	15 (30)	15 (30)	50 (100)								

<sup>a</sup>konstitütif MLSB fenotipi

<sup>b</sup>indüklenbilir MLSB fenotipi

<sup>c</sup>iMLS<sub>B</sub> fenotipi gösteren tek izolatın eritromisin, azitromisin, klaritromisin MİK'leri 4 µg/ml ve klindamisin MİK'i ise 0.03 µg/ml olarak saptanmıştır

saptanmıştır. Klindamisin MİK'leri ise duyarlılık sınırları dahilinde kalmıştır. *mef(A)/(E)* taşıyan 15 izolattan iMLS<sub>B</sub> fenotipi gösteren birinin makrolid MİK değerleri M fenotipindeki izolatlara benzer şekilde göreceli olarak düşüktür. Bu izolatın da klindamisin MİK'i duyarlılık sınırları içindedir. Araştırılan diğer makrolid direnç geni, *erm(TR)*, izolatların hiç birinde saptanmamıştır.

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.

## TARTIŞMA

*S. 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 bir çok bölgesinde olduğu gibi ülkemizde de makrolidlere direnç gösteren pnömokokların insidansının giderek arttığını ortaya koymaktadır (9-11). Hastanemize ait direnç surveyans verileri, makrolid dirençli pnömokokların oranının bir yıl içinde %14.6 oranında artış göstererek 2009'da %43.2'ye yükseldiğini göstermektedir (25).

Hastanemizde 2009 yılında izole edilen makrolid dirençli 50 pnömokok izolanda makrolid direncinin fenotipik ve genotipik karakteristiklerini belirlemek üzere yaptığımız bu çalışmada,

izolatlarımızın %70'inin cMLS<sub>B</sub> fenotipinde, %28'inin M fenotipinde ve %2'sinin de iMLS<sub>B</sub> fenotipinde olduğunu saptadık. cMLS<sub>B</sub> fenotipindeki izolatlar, beklenildiği gibi sıvı mikrodilüsyon testinde 14- ve 15- üyeli makrolidlerin (eritromisin, azitromisin, klaritromisin) hepsine ve klindamisine karşı yüksek düzeyde dirençli bulundular (Tablo 1). Buna karşın M fenotipine sahip izolatların makrolidlere düşük düzeyde direnç gösterdikleri, klindamisin MİK'lerinin ise duyarlılık sınırları içinde kaldığı tespit edildi (Tablo 1). Bu sonuçlar cMLS<sub>B</sub> fenotipini, makrolid dirençli pnömokok izolatlarımızda yaygın fenotip olarak karşımıza çıkartmakta ve ribozomal hedef değişikliğinin, izolatlarımızın yüksek düzey makrolid direncinden sorumlu ana mekanizması olduğunu kuvvetle düşündürmektedir. Bununla birlikte, çalışmamızda M fenotipinin %28 gibi azımsanmayacak bir oranda tespit edilmesi, ribozomal hedef değişikliğinin yanı sıra aktif makrolid pompasının da, izolatlarımızın makrolidlere karşı direncinde etkin rolü olduğunu göstermektedir. Fenotipik test sonuçlarımız ayrıca M fenotipine sahip pnömokok izolatlarının oranının bir yılda belirgin olarak arttığını da ortaya koymaktadır. Hastanemizde 2008 yılında izole edilen makrolid dirençli pnömokoklarda M fenotipi %7.9 olarak tespit edilmişken; bu oranın 2009'da %28'lere çıkması, aktif pompaya bağlı makrolid direncinin bölgemizde pnömokoklar arasında hızla yayıldığına işaret etmektedir (25). Ülkemizde yapılan diğer çalışmalar, MLS<sub>B</sub> fenotipine sahip pnömokokların bizdekine kıyasla çok daha yüksek (>%95) oranlarda olduğunu ve M fenotipine sahip pnömokokların oranının ise %5-18 arasında olduğunu göstermektedir (9-11).

Makrolid direncinin genetik determinantlarını belirlemek üzere yapılan PZR testiyle, izolatların %40'ında *erm(B)* genini, %30'unda

*mef(A)/(E)* genini tek başlarına, %30'unda da her iki geni birlikte saptadık (Tablo 1). İzolatlarımızda *mef(A)/(E)* geninin toplamda %60'lık bir oranla, *erm(B)* geninin saptanma oranına (%70) yakın bir oranda tespit edilmiş olması çalışmamızın en çarpıcı sonuçlarından biridir. 2008 yılında hastanemizde izole edilen makrolid dirençli pnömokoklarda da *mef(A)/(E)* geni, benzer oranda (%61.5) bulunmuştur. Bu sonuçlar, hastanemiz pnömokok izolatlarında *mef(A)/(E)* baskınlığının sürekliliğine işaret etmektedir (25). *mef(A)/(E)*'nin makrolid direncinin tek genetik determinantı olarak bulunduğu izolatların (%28) biri hariç tamamı, beklenildiği üzere M fenotipinde bulunmuştur. Ancak *mef(A)/(E)*'nin *erm(B)* ile birlikte saptandığı izolatlarda (%30), aktif makrolid pompa geni kendini fenotipte ifade edememiş, *erm(B)*'nin varlığı, yüksek düzey makrolid ve linkozamid direncine yol açarak, bu izolatlarda M fenotipi gelişimini engellemiştir.

Son yıllarda 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 izolatlar özellikle Rusya, Güney Afrika, Asya ve Amerika Birleşik Devletleri'nde rastlanmaktadır (2). Ülkemizin değişik bölgelerinde yapılan çalışmalarda, her iki geni birlikte taşıyan izolatların oranının % 2.5'u geçmediği görülmektedir (10,11). Çalışmamızda her iki makrolid direnç genini birlikte taşıyan izolatların oranı %30 olarak bulunmuştur ve bu yönüyle ülkemizde saptanmış en yüksek orandır. Yapılan çalışmalarda, *erm(B)* ve *mef(A)/(E)* genlerinin, tetrasiklin direncinden sorumlu *tetM* ile birlikte *Tn2010* üzerinde yer aldığı ve bu genleri taşıyan izolatların çoğunlukla serotip 19A ve klonal kompleks 320'de yer alan ve çoklu ilaç direnci gösteren kökenler oldukları gösterilmiştir (2,4).

Pnömokoklarda aktif makrolid pompasına bağlı direnç esas olarak iki genin kontrolü altındadır: Bunlardan biri *mef(A)*, diğeri ise *mef(E)*'dir. 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. Her iki gen arasında %90'ın üzerinde homoloji olması, bu genlerin PZR yöntemiyle ayırt edilmesini zorlaştırmaktadır (26). Biz çalışmamızda iki gen arasındaki yüksek homolojiyi dikkate alarak, izolatlarımızdaki 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 %60'ında *mef* geni varlığını gösterdik. Bu durum, PZR ile *mef* genini saptamaya yönelik araştırmalarda uygun primer çiftlerinin seçiminin önemini ortaya koymaktadır. Öte yandan her ne kadar PZR testinin, *mef(A)* ve *mef(E)* ayırımında yetersiz kaldığı ileri sürülüyorsa da, *erm(B)* olmaksızın sadece *mef(A)/(E)* geni taşıyan izolatlarımızın makrolid MİK değerlerinin, literatürde bildirilen *mef(E)* fenotipine benzerliği, kökenlerimizdeki aktif pompa geninin *mef(E)* olabileceğini destekleyen bir bulgudur (19). Bu izolatlarda ileri moleküler analizlerle *mef(A)*, *mef(E)* kesin ayırımının yapılması, bölgemizde pnömokoklarda baskın olan aktif makrolid pompa geninin belirlenmesi açısından önemlidir.

iMLS<sub>B</sub> fenotipi gösteren bir izolatta, sadece *mef(A)/mef(E)* geninin bulunmuş olması ve *erm* geninin saptanmamış olması çalışmamızın diğeri bir ilginç bulgusudur. Bu izolatın makrolid ve linkozamid MİK değerleri, M fenotipindeki izo-

latların MİK değerleri gibi düşük bulunmuştur (Tablo 1). Literatürde iMLS<sub>B</sub> fenotipe sahip olup da *erm* geni taşımayan ve sadece *mef(A)/mef(E)* geni bulunduran bir izolat bildirilmemiştir. Bu izolattaki makrolid direnç mekanizmasının aydınlatılmasına yönelik daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Son olarak izolatlarımızın % 28'inin M fenotipi göstermesi ve %60'ının *mef(A)/(E)* geni taşıması dolayısıyla rutin laboratuvarında pnömokok izolatlarının makrolid duyarlılıklarına ilaveten linkozamid duyarlılıklarının da test edilmesi gerektiğini düşünmekteyiz. Böylece makrolidlere direnç gösteren pnömokokların neden olduğu enfeksiyonların bir kısmında linkozamid grubu antibiyotiklerin kullanım şansı olabilecektir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmiştir. (Proje No: SAG-C-YLP-211009-0308, 2009).

## İletişim / Correspondence

Ufuk Hasdemir  
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji  
Anabilim Dalı, Haydarpaşa Kampusü, Tıbbiye Cad,  
34668 Kadıköy-İstanbul  
İş Tel: 0216 414 4732  
Cep Tel: 0533 351 8076  
Faks: 0216 414 4732  
e-posta:ufukhasdemir@marmara.edu.tr

## Kaynaklar

1. Musher, DM. *Streptococcus pneumoniae*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Mandell, Douglass and Bennett' s Principles and Practice of Infectious Diseases. New York: John Wiley & Sons, 2004:2392-2411.
2. Linares 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; 16:402-10.
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; 31:245–9.
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. Varaldo PE, Montanari MP, Giovanetti E. Genetic elements responsible for erythromycin resistance in streptococci. AAC 2009; 53:343-53.
7. Leclercq R, Courvalin P. Resistance to macrolides and related antibiotics in *Streptococcus pneumoniae*. AAC 2002; 46: 2727-34.
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. AAC 2008; 52:619–25.
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; 17:31-5.
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 Bül 2007; 41:1-9.
11. Gülay Z, Özbek ÖA, Biçmen M, Gür D. Macrolide resistance determinants in erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Turkey. Jpn J Infect Dis 2008; 61:490-3.
12. Leclercq R. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. Clin Infect Dis 2002; 34:482–92.
13. Hasdemir U. Çoklu ilaç direncinde bakteri hücre duvarı organizasyonunun ve aktif pompa sistemlerinin rolü. Mikrobiyol Bül 2007; 41: 309-27.
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.
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; 42:3570-4.

16. Streptococci and related genera. In: Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM, eds. *Bailey and Scotts Diagnostic Microbiology*. 9th ed. St Louis MO: Mosby, 1994; 333–52.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 16th informational supplement: M100-S19. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2009.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved Standard. 7th ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.
19. Amezaga 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; 40:3313–8.
20. Seppälä H, Skurnik M, Soini H, Roberts MC, Huovinen P. A novel erythromycin resistance methylase gene (*ermTR*) in *Streptococcus pyogenes*. *AAC* 1998; 42:257-62.
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; 22:867-79.
22. Tait-Kamradt A, Clancy J, Cronan M, et al. *mefE* is necessary for the erythromycin-resistant M phenotype in *Streptococcus pneumoniae*. *AAC* 1997; 41:2251-5.
23. Reinert RR, Lütticken R, Bryskier A, Al-Lahham A. Macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* in the pediatric population in Germany. *AAC* 2003; 47:489-93.
24. Kataja J, Huovinen P, Seppala H. Erythromycin resistance genes in group A streptococci of different geographical origins. *J Clin Microbiol* 2000; 46:789-92.
25. Sağıroğlu P. Klinik *Streptococcus pneumoniae* izolatlarında makrolid direnç mekanizmalarının araştırılması [uzmanlık]. İstanbul: Marmara Üniversitesi, 2009.
26. Klaassen CH, Mouton JW. Molecular detection of the macrolide efflux gene: to discriminate or not to discriminate between *mef(A)* and *mef(E)*. *AAC* 2005; 49:1271-8.