

STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE: KLASİK VE MOLEKÜLER TANIDA KARŞILAŞILAN SORUNLAR

Rahmiye BERKİTEN

İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL

ÖZET

Streptococcus pneumoniae viridans grubu (Smit grubu, mitis grubu) streptokoklardır; dolayısıyla grubun ortak özelliklerini taşır. Toplumda kazanılan pnömöni yanında çeşitli infeksiyonlara da yol açabilen kapsülsüz şekilleri üst solunum sisteminde viridans grubu bakterilerle beraber bulunur. Bu nedenle S.pneumoniae'nin atipik viridans grubu streptokoklardan (S.mitis, S.orilis, S.pseudopneumoniae) ve streptokok benzeri bakterilerden (Streptococcus-Like Bacteria) ayırd edilmesi gerekir. S.pseudopneumoniae son yıllarda tarif edilen, fenotipik ve genotipik özellikleri S.pneumoniae ve viridans grubu streptokoklardan farklı (kapsülsüz, optokine % 5 CO₂'li ortamda dirençli veya orta duyarlı, normal atmosferde duyarlı, safrada erimeyen, AccuProbe DNA prob hibridizasyon testi pozitif) bir türdür. Pnömokokta tanı, klasik [optokine duyarlılık, safrada erime, serolojik yöntem (kapsül şişme deneyi, lateks aglutinasyonu)] ve moleküler yöntemlerle yapılır. Normalde steril vücut bölgelerinden izole edilen suşlarda klasik tanı genellikle yeterlidir. Ancak bakteri balgam gibi alt solunum sistemi örneklerinden izole edildiğinde suş optokine duyarlı olan, safrada eriyen viridans grubu atipik bir streptokok olabileceği gibi optokine dirençli, safrada erimeyen atipik bir pnömokok da olabilir. Viridans grubu bir streptokokun pnömokok özelliği göstermesi, o özelliği şifreleyen genlerin kazanılması sonucu ortaya çıkar. Dolayısıyla pnömokok tanısını sağlayan bazı genlerin şüpheli bakteride gösterilmesi o bakterinin her zaman pnömokok olduğunu göstermez. Bu durum moleküler göstergelerin de bazı suşlarda doğru sonuç vermediğini ortaya koymaktadır. Atipik pnömokoklar tanıda hedef alınan etki bölgesinin mutasyonu sonucu ortaya çıkar. Dolayısıyla atipik viridans grubu bir streptokokla, atipik pnömokoklar her zaman doğru olarak tanımlanamazlar. Yanlış bakteriyolojik tanı, yanlış klinik tanıya neden olacağından, tedavi başarısını etkileyen önemli bir faktördür. Bu tip hataları önlemek için klasik yöntemlerin yanında hızlı ve kesin sonuç verebilecek çeşitli moleküler yöntemler geliştirilmeye çalışılmış, ancak henüz altın standart bir yöntem bulunamamıştır.

Anahtar sözcükler: atipik S.pneumoniae, atipik viridans streptokok, klasik ve moleküler tanı

SUMMARY

Streptococcus pneumoniae: Some Problems in the Conventional and Molecular Diagnosis

Streptococcus pneumoniae is a member of viridans group (the Smit group, streptococci of mitis group) streptococci and has the common characteristics of this group. The uncapsulated isolates may cause community acquired pneumoniae and many other infections, and exist together with the atypical viridans group streptococci in upper respiratory tract. Because of this, S.pneumoniae must be distinguished from atypical viridans group streptococci (S.mitis, S.orilis, S.pseudopneumoniae) and from Streptococcus-Like Bacteria. S.pseudopneumoniae which was described recently is a different species from S.pneumoniae and viridans group streptococci in terms of phenotypic and genotypic characteristics (uncapsulated, optochin resistant or intermediate in 5 % CO₂ atmosphere but susceptible in normal atmosphere, insoluble in bile, AccuProbe DNA probe hybridization positive). The diagnosis of S.pneumoniae can be performed by classical

Yazışma adresi: Rahmiye Berkiten. İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İSTANBUL
Tel.:(0212) 414 20 00/32371
e-posta: rhrtn@ istanbul.edu.tr

Alındığı tarih: 05.09.2006, revizyon kabulü: 06.09.2006

[optochin susceptibility, bile solubility, serological methods (Quellung reaction, latex agglutination)] and molecular methods. For the identification of strains isolated from sterile regions of the body, the classical methods are generally sufficient. But the isolates from lower respiratory tract specimens may be optochin susceptible and bile soluble atypical viridans group strains or optochin resistant, bile insoluble atypical pneumococci. Viridans group streptococci may have the pneumococcal characteristics due to the acquisition of related genes. Thus, the existence of pneumococcus genes does not necessarily show that the strain is a pneumococcus. Because of this, the molecular methods are not always valid. Atypical pneumococci are appeared by the mutations in the targeted regions in the diagnosis. Because of atypical viridans group streptococci and atypical pneumococci, identification may be incorrect and incorrect identification can cause false clinical diagnosis effecting the treatment. To prevent the incorrect identification, besides classical methods, there are many studies to improve the molecular methods which give more accurate and reliable results but there is not still any gold standard method.

Keywords: atypical *S.pneumoniae*, atypical viridans streptococcus, conventional and molecular diagnosis

GİRİŞ

S.pneumoniae toplumda kazanılan pnömoninin başlıca nedenidir. Ayrıca menenjit, septisemi ve orta kulak infeksiyonları gibi çeşitli infeksiyonlara da yol açar. Beyin-omurilik sıvısı, kan gibi normalde steril olan örneklerden izole edildiğinde klasik tanı yöntemleri (safrada erime, optokine duyarlılık, serolojik yöntem) genellikle yeterlidir. Ancak normal flora bakterilerinin bulunduğu bölgelerden, örneğin üst solunum sistemine temas eden balgam gibi örneklerden izole edildiğinde, florada bulunan ve bazı özellikleri ile pnömokoklara benzeyen *S.mitis*, *S.oralis* gibi atipik viridans streptokoklar (VS), *S.pseudopneumoniae* veya 'Gemella' gibi streptokok benzeri bakteriler (Streptococcus-Like Bacteria) ile karıştırılabilir (20,23,24,33). Bazı fenotipik özelliklerini kaybetmiş, safrada erimeyen veya optokine dirençli atipik pnömokoklar da yanlış değerlendirilerek VS tanısı alabilir. Bu durumda moleküler tanı tekniklerinden faydalanılır. Pek çok laboratuvar kolay ve ucuz olduğundan genellikle tek bir özellik saptayarak tanı koyar. Ancak saptanan özellik nadir de olsa hatalı tanıya yol açabilir. Günümüzde ilerleyen teknolojiye paralel olarak pnömokok virulans genlerini belirleyen çeşitli moleküler teknikler de geliştirilmiştir; fakat *Staphylococcus aureus*'da koagülaz veya proteain A varlığı, *Streptococcus pyogenes*'de basitrasine duyarlılık gibi kesin sonuç verecek bir yöntem henüz bulunamamıştır. Tanının tahmin edilenden çok karmaşık olması bu konudaki araştırmaların devam etmesine neden olmaktadır(5,15,23,24,33).

Uluslararası onlarca araştırmaya konu olan pnömokok ön tanı şüpheli suşlar ülkemizde henüz gündem bulamamıştır. Bu nedenle bu makalede konu ile ilgili uluslararası yayınlar incelenerek, klasik ve moleküler yöntemlerden elde edilen sonuçlar ve yorumları belirtilmeye çalışılacaktır.

Pnömokokların sınıflandırılmadığı yeri: *S.pneumoniae* zengin besiyerinde % 5-10 CO₂'li ortamda üreyen, optokine

duyarlı, safrada eriyen, oksidaz-katalaz negatif, kapsüllü, Gram pozitif diplokoklardır. Suşların % 8'i aerop ortamda üremez. 16S rRNA genleri temel alınarak yapılan çalışmaya göre alfa-hemolitik streptokoklar (Viridans grubu streptokoklar) 6 ana gruba ayrılmıştır⁽¹⁶⁾. Bu gruplardan biri mitis grubudur (Smit grubu veya mitis grubu streptokoklar) ve içinde yer alan *S.pneumoniae*, *S.mitis*, *S.oralis* ve *S.sanguinis* DNA-DNA homolojileri % 40-60 oranında benzerlik gösterdiğinden her zaman birbirlerinden doğru olarak ayırd edilemezler⁽¹⁵⁾. Pnömokokların en fazla karıştırıldığı türler *S.mitis*, *S.oralis* ve *S.pseudopneumoniae*'dir⁽²⁾. *S.crista* (*S.cristatus*), *S.peroris*, *S.infantis*, *S.australis* ve *S.oligofermentans* aynı grupta yer alan insan patojeni olabilen diğer türlerdir⁽³⁵⁾.

S.pseudopneumoniae ilk defa 2004 yılında Arbiqve ve ark.⁽²⁾ tarafından *S.pneumoniae* ve VS'lardan tamamen farklı bir tür olarak bildirilmiştir. Kapsülsüz, optokine % 5 CO₂'li ortamda dirençli veya orta duyarlı, normal atmosferde duyarlı, safrada erimeyen, DNA prob hibridizasyon testi pozitif bir türdür. Klinik önemi henüz bilinmemekle beraber Keith ve ark.⁽¹⁹⁾ alt solunum yolu şikayetleri bulunan [% 79'u kronik obstrüktif akciğer hastası (KOA)] ve pürülan balgam çıkaran hastalardan izole edilen 35 *S.pseudopneumoniae*'nin tümünün penisiline duyarlı, % 60'ının eritromisine, % 77'sinin tetrasikline dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca *S.pneumoniae* ve *S.pseudopneumoniae* saptanan hastalar karşılaştırıldıklarında *S.pseudopneumoniae* izole edilen hastaların çoğunun KOAH'lı olduğu, patojen insidansının araştırıldığı bir başka çalışmada *S.pneumoniae* ön tanı 120 suştan yalnız birinin DNA-DNA hibridizasyon sonucu *S.pseudopneumoniae* olduğu belirlenmiştir⁽¹²⁾.

Tür düzeyinde tanı: Gerek klasik, gerekse DNA'ya dayalı çeşitli moleküler yöntemler geliştirilmiş olmasına rağmen henüz kesin sonuç veren bir yöntem bulunamamıştır.

Klasik tanı: Dört fenotipik özellik aranır: bunlar kanlı jelozda

koloni morfolojisi, optokine duyarlılık (% 5 CO₂'li ortamda), safrada erime ve tipe özel antiserumlarla yapılan serolojik reaksiyonlardır (kapsül şişme deneyi, lateks aglutinasyonu). Tanı amacıyla hazırlanmış ticari kitler de (API 20 strep, API Rapid ID32 strep) bulunmaktadır, ancak laboratuvarların çoğu bunlardan yalnız birini uygular.

Koloni morfolojisi: Kanlı agar da alfa-hemoliz yapan kolonileri 2 şekilde görülür; biri üzerleri düz ve muntazam, diğeri kenarları kalkık, ortası çökük, pnömokoklara özgül kabul edilen tavla pulu görünümündeki kolonilerdir. Ortası çökük koloniler bakterinin otolitik enzimleri nedeniyle hücre yapılarının erimesi sonucu meydana gelir. Kapsüllü olanlar mukoit tipte koloni yaparlar.

Optokine duyarlılık: Bir kinin analogu olan optokine (ethylhydrocupreine hydrochloride) duyarlılık *S.pneumoniae*'nin VS'lerden ayırımında en çok aranan özelliktir. Ancak nadir de olsa dirençli suşlara rastlanmaktadır. Direnç oluşumu, yoğun antibiyotik kullanımına veya optokine etki mekanizmasında meydana gelen mutasyona bağlanmaktadır. Özellikle invaziv infeksiyonlardan izole edilen optokine dirençli suşlara VS tanısı konmadan evvel safrada erime ve DNA prob hibridizasyon deneyi yapılmalıdır. Optokine duyarlılık zon çapı, kullanılan besiyeri, kan (eritrosit çeşidi), kültür atmosferi (CO₂ yüzdesi ve normal ortam) ve inkübasyon süresine (18-24 saat) göre fark gösterir; bu nedenle Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI/NCCLS) kurallarına uymak gerekir (6). Optokin duyarlılığı ticari hazırlanmış iki farklı çaptaki (6 mm ve 10 mm) disk (5 µg) ile araştırılır. İnhibisyon zon çapının 6 mm'lik diskle >14 mm, 10 mm'lik diskle >16 mm olması duyarlılığı gösterir(6,14). Çap genişliği normal atmosferde ve % 5 CO₂'li ortamlarda farklı olabilir. CO₂'li ortamda üreyen bazıları yoğun üreme nedeniyle optokine dirençli veya orta duyarlı bulunabilir. Orta duyarlı olan şüpheli suşlar serolojik veya PCR yöntemi ile tekrar incelenmelidir.

Gardam ve Miller(10) kolumbia, triptik soy agar (TSA) ve Mueller-Hinton agar (MHA) besiyerlerinde inceledikleri 72 *S.pneumoniae* ve 22 *S.viridans* suşunun koyun kanlı TSA besiyerinde % 5 CO₂'li ortamda, CLSI önerilerine de uygun olarak daha güvenilir zon verdiğini bildirmişlerdir.

Pikis ve ark.(29) 1992-1998 yılları arasında çocuk hastalardan izole edilen optokine dirençli 4 *S.pneumoniae* suşundan 3'ünün, optokine duyarlı ve dirençli olmak üzere 2 farklı popülasyondan meydana geldiğini, ancak her alt popülasyondaki bakterinin serotipinin, antibiyogram sonuçlarının ve RFP (restriction fragment profiles)'lerinin aynı olduğunu; homojen dirençli olan 4. suşun optokin MİK değerinin duyarlı olandan 4-30 kat fazla, serotip ve RFP'nin farklı olduğunu, ortak klonal özellik göstermediğini bildirmişlerdir.

Safrada erime: Safra tuzu (sodium deoxycholate, sodium

taurocholate) bakterinin erimesine neden olan, indirekt etkili bir maddedir; otolitik enzim sentezini aktive ederek etkisini gösterir. Optokine duyarlılık deneyinden daha özgül olduğu kabul edilir. Test aktif üreme fazındaki, 18-24 saatlik katı veya daha özgül olan sıvı kültürler ile tüpte yapılır. Katı besiyeri için % 2'lik, tüp testi için % 10'luk sodyum deoksikolat hazırlanır. Sıvı kültürle yapılan deneyde bakteri tercihen uygun buyyon besiyerinde süspansiyon edilerek (0.5-1 McFarland) biri kontrol olan 2 tüpe 0.5 ml konur; birinin üzerine safra çözeltisi, diğere fizyolojik tuzlu su aynı miktarda ilave edilerek 35°C'de 2 saat bekletilir. Tüp deneyinde bakteri süspansiyonunun pH'sı 7'e ayarlanmalıdır, çünkü safra tuzu 6.5 ve daha düşük pH'da presipite olarak etkisiz kalır. Suşların % 86'sı tamamen erir(36); kısmen erime gösterenler kapsül şişme deneyi veya moleküler yöntemlerle tekrar incelenmelidir. Tüpte yapılan safrada erime deneyinin kolay, ucuz ve özgüllük oranının yüksek olması nedeniyle PCR deneylerinden önce yapılması önerilmektedir. Sonuçlar değerlendirilirken safrada erimeyen atipik pnömokokların varlığı unutulmamalıdır (18,28,33,35,36).

Kellogg ve ark.(20) çeşitli tanı testlerinin duyarlılığını ve özgüllüğünü araştırdıkları çalışmalarında 99 *S. pneumoniae* suşundan elde edilen sonuçları bildirmişlerdir (Tablo 1). Ayrıca bu çalışmada kandan elde edilen problem bir suşun GPI kart tekniği ile *Gemella* cinsi (spesifikliği % 94), referans laboratuvarında *Granulicatella adiacens* olarak tanı aldığı bildirilmiştir.

Tablo 1: 99 *S.pneumoniae* suşunda çeşitli tanı yöntemlerinin duyarlılığı ve özgüllüğü (%)(20).

Testler	Duyarlılık	Özgüllük
Koloni morfolojisi	94	77
Optokine duyarlılık	99	98
Safrada erime		
Katı kültür	99	98
Sıvı kültür	100	99
Directigen	100	85
Phadebact	100	98
GPI kart	90	96

GPI: Gram pozitif identifikasyon.

Serotip tayini: Klasik tanı yöntemlerinden biridir; optokine duyarlılık ve safrada erime deneylerinden şüpheli sonuç alındığında ileri doğrulama deneyi olarak da kullanılır.

Pnömokoklar kapsül antijenlerini belirleyen serolojik yöntemle (kapsül şişme reaksiyonu) 90 serotipe ayrılmıştır. Kapsül şişme deneyi daha güvenilir bir yöntemdir ve lateks aglutinasyonu ile şüpheli sonuç alındığında uygulanmalıdır. Kapsül serotip genlerinin transformasyon yolu ile suşlar arasında transfer olması çapraz reaksiyonların ortaya çıkmasına neden olur. Ayrıca pnömokok dışı alfa-hemolitik streptokoklarla, non-hemolitik streptokok türlerinin bir çoğunda pnömokok-

lardakine benzer kapsül antijenlerinin bulunduğu bildirilmiştir (18). Suşun kapsülünü kaybetmesi veya henüz bilinmeyen bir serotip antijenine sahip olması da suşların % 20'sinin tiplendirilmesine engel olmaktadır. Dolayısıyla bu yöntemin de her zaman yeterli özgüllüğe sahip olmadığı kabul edilmektedir.

Klasik ve moleküler yöntem uygulanan bazı alfa-hemolitik streptokoklarda saptanan ortak pnömokok özellikleri tablo 2'de verilmiştir.

Tablo 2: Bazı alfa-hemolitik streptokoklarda saptanan pnömokok özellikleri.

Suş/Kaynak	Serotip	Optokine duyarlılık	Safrada erime	PCR ply lytA
Mitis grubu ⁽³⁵⁾				
COL16	NT	Du	-	
COL20	NT	ODu	-	
<i>S.pseudopneumoniae</i> ⁽²⁸⁾				
11923/1992	NT	Du	-	
1230/1996	19	Du	-	
1383/1997	19	Du	-	
1629/1997	19	Du	-	
578(22)	NT	Du	-	
<i>S.oralis</i> ⁽³¹⁾		Di	+	-
<i>S.mitis</i> ⁽³¹⁾		Di	+	+
<i>S.pneumoniae</i> ⁽³¹⁾		Du	+	+

NT: tiplendirilemeyen; Du:duyarlı; ODu: orta duyarlı

Moleküler tanı: Bakterinin şüpheli klinik örneklerde gösterilmesinde veya saf kültürün tanısında özellikle virulans faktörlerini belirleyen genlerin saptanması tanı koydurucudur. Rintamaki ve ark.⁽³⁰⁾ pnömölizin gen yapısını belirlemek amacıyla özel geliştirilmiş PCR yöntemi ile klinik örneklerde oldukça güvenilir sonuçlar elde etmişlerdir. Yine pnömokok geni kazanan VS'larla, tanı hedef bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu özellik değiştiren atipik pnömokokların tanısında da kullanılır. Fakat bu yöntemler alt yapı yetersizliği ve maliyet yüksekliği nedeniyle bir çok laboratuvar da her zaman uygulanamaz.

Başlıcaları DNA-DNA hibridizasyonu, DNA prob hibridizasyonu, 16S rRNA sekanslama ve PCR teknolojisine dayalı yöntemlerdir. MLST (multilocus sequence typing)⁽¹¹⁾ ve LAMP (loop-mediated isothermal amplification)⁽³¹⁾ hata oranını azaltmak amacıyla son yıllarda geliştirilen diğer yöntemlerdir. PCR en çok uygulanandır ve bakterinin otolizin (autolysin, *lytA*), pnömölizin (pneumolysin, *ply*), pnömokok tutunma faktörü (pneumococcal adhesin A), pnömokok yüzey proteini (pneumococcal surface protein A, *PspA*); manganeeze bağlı superoksit dismutaz (manganeeze-dependent superoxide dismutase, *sodA*) gibi virulans genlerini saptamaktadır. MLST ile *aroE*, *gdh*, *gki*, *recP*, *spi*, *xpt*, *ddl* gibi gen belirleme çalışmaları yapılmaktadır⁽¹¹⁾. Ancak aranan ve belirlenen özelliklerin tümü *S.pneumoniae* için özgün değildir ve bazıları alfa-hemolitik streptokoklarda da bulunur. Ayrıca

S.pneumoniae'ye spesifik olması gereken bazı genler çok nadir de olsa *S.mitis* ve *S.oralis*'de gösterilmiştir⁽³⁵⁾. Yine alfa-hemoliz yapan bir streptokok suşunda *ply* ve *lytA* virulans faktörlerinin gösterilmesi o bakterinin pnömokok olduğunu her zaman göstermez⁽¹³⁾. Seki ve ark.⁽³¹⁾ geliştirdikleri, *lytA* genlerini hedef alan ve yeni bir nükleik asit amplifikasyonu olan LAMP yönteminin, klasik PCR'dan daha özgün olduğunu bildirmişlerdir.

DNA-DNA homoloji sonuçlarının tanı değeri oldukça yüksektir. Ancak pnömokoklarla Smit grubu arasında % 40-60 oranında benzerlik bulunduğundan tanı hatalı olabilir. *S.pneumoniae*'nin en fazla karıştırıldığı türler 16S rRNA nükleotid sırası *S.pneumoniae* ile % 99'un üzerinde aynı olan *S.mitis* ve *S.oralis*'dir ve bu nedenle kullanımı yine sınırlıdır^(7,36). Virulans genlerinin gösterilmesi de tanı için yeterli değildir. Kaijalainen ve ark.⁽¹⁵⁾ klasik tanı özelliklerine sahip olmayan şüpheli suşların identifikasyonu için *ply* PCR ve geliştirdikleri ticari RNA hibridizasyon testlerinin kesin sonuç vermediğini bildirmişlerdir. Housekeeping genlerin (örneğin *xpt*, *recP*, *hexB*, *ddl*) gösterilmesi *S.pneumoniae*'nin ayırımında ümit verici olduğu bildirilmiş, ancak altın standart bir yöntem olmadığı görülmüştür^(23,35). Örneğin *ddl* gibi pnömokok için spesifik olduğu kabul edilen bir gen *S.sanguinis* ve *S.gordonii*'de de bulunmuştur⁽¹⁷⁾.

Neeleman ve ark.⁽²⁷⁾ pnömokok ön tanısı konmuş (şüpheli), makrolit dirençli 141 suşu, 16S rRNA sekans, AFLP (amplified-fragment length polymorphism), *ply* ve *lytA* yönünden incelediklerinde, 91'inin (% 65) *S.pneumoniae*, 32'sininin *S.mitis*, 18'inin streptokok cinsi bakteri olduğunu saptamışlardır (Tablo 3). Sonuçta *lytA* saptanan suşların tümünün pnömokok, saptanamayanların ise pnömokok dışı bakteri olduğu görülmüştür.

Tablo 3: Pnömokok ön tanısı konan 141 suşun ileri inceleme sonuçları⁽²⁷⁾.

16S rRNA sekanslaması ve AFLP uygulaması	ply (+)	PCR (-)	lytA (+)	PCR (-)
<i>S.pneumoniae</i>	9	10	91	0
<i>S.mitis</i>	3	11	0	32
Streptococcus	10	8	0	18
Toplam	13	29	91	50

AFLP: Amplified-fragment length polymorphism; ply:pnömölizin; lytA:otolizin

Araştırmalarda ilk bakteri gruplamaları koloni şekline⁽⁵⁾, kapsül varlığına (tiplendirilebilme)^(4,11) veya atipik özellik⁽¹³⁾ göstermesine göre yapılmaktadır.

Chandler ve ark.⁽⁵⁾ 209 *S.pneumoniae* suşunun tanısında uyguladıkları 4 yöntemi (safrada erime, optokine duyarlılık, lateks aglutinasyonu, DNA prob hibridizasyonu) karşılaştırmak amacı ile yaptıkları bir çalışmada, bakterileri önce koloni morfolojilerine göre ikiye ayırmışlar ve 151 suşu Grup I (kenarları kalkık, ortası çökük), 58 suşu Grup II (alfa-hemolitik)

olarak belirlemişlerdir. DNA prob hibridizasyonu deneyinde Grup I'den 141, Grup II'den 10 suş *S.pneumoniae* olarak tanımlanmış; Grup I'de optokin duyarlılığı ve lateks deneyi % 100 duyarlılık ve spesifiklik göstermiş; safrada erime deneyi bir suş dışında tümünde pozitif; Grup II'de optokine duyarlılık ve spesifiklik % 100; lateks deneyinde duyarlılık % 80, spesifiklik % 94; safrada erime deneyinde duyarlılık % 80, spesifiklik % 100 bulunmuştur. Deney sonuçlarına göre tipik koloni morfolojisi gösteren suşlara uygulanan tüm testlerin güvenilir olduğu, alfa-hemoliz yapanlarda safrada erime ve lateks aglutinasyon pozitifliğinin yanlış tanıya yol açabileceği hususuna dikkat çekilmiştir.

Carvalho ve ark.⁽⁴⁾ epidemik konjunktivit etkeni kapsülsüz, dolayısıyla tiplendirilemeyen 11 suşun fenotipik ve genotipik özelliklerini inceledikleri çalışmalarında tümünün optokine duyarlı, safrada eriyen ve DNA-DNA hibridizasyonu pozitif *S. pneumoniae* olduğunu saptamışlardır.

Hanage ve ark.⁽¹¹⁾ tiplendirilebilen (kapsüllü) pnömokoklarla, pnömokok ön tanısı almış tiplendirilemeyen suşları MLST ve kısmi dizi analizi (partial sequencing) ile *ply* yönünden inceleyerek genetik yakınlıklarını araştırdıkları çalışmalarında tiplendirilemeyen suşların pnömokok olabileceği gibi viridans streptokok da olabileceğini, güç vakalarda *ply* geninin saptanmasının destekleyici olacağını bildirmişlerdir.

Ko ve ark.⁽²¹⁾ çeşitli Asya ülkelerinden toplanan ve tiplendirilemeyen 54 suşu inceledikleri [optokine duyarlılık, safrada erime, housekeeping gen tayini (MLST), virulansla ilgili genlerin amplifikasyonu, 16S rDNA-RsaI digestion ve 16S rDNA sequencing] çalışmalarında 6'sının *lytA*, 16S rDNA ve MLST yönünden pnömokoklardan farklı olduğunu ve klasik yöntemlerin yanlış tanıya götürdüğünü, ayrıca pnömokok tanısı alan bu suşların farklı bir türe ait olduğunu bildirmişlerdir (Tablo 4).

Messmer ve ark.⁽²⁴⁾ pnömokok ön tanısı alan fakat tiplendirilemeyen suşları, yakın benzerlik gösteren atipik streptokoklardan ayırmak için yaptıkları *lytA*, *psaA*, *ply* PCR deneylerinde sonuçların ayırd ettirici olmadığını bildirmişlerdir.

Llull ve ark.⁽²²⁾ çeşitli serotiplerden 29 *S.pneumoniae* ve 22 *S.mitis* (2'si *S.pseudopneumoniae*) suşunun *lytA*

genindeki nükleotid dizilimini inceledikleri çalışmalarında 19'unda pnömokoklara özel, 20'sinde atipik alellerin bulunduğunu; pnömokoklarda saptanan alellerin özgül, pnömokok dışı suşlarda saptananların ise atipik aleller olduğunu belirlemişlerdir.

Verhelst ve ark.⁽³³⁾ *S.pneumoniae* olduğu düşünülen optokine dirençli 49 alfa-hemolitik streptokok suşunu, kapsül varlığı ve *ply*, *lytA*, *psaA*, 16S rRNA hibridizasyonu yönünden inceledikleri çalışmalarında, yalnız 11'inin kapsüllü ve klasik pnömokok özelliklerini gösterdiğini, kalan kapsülsüz 38 suştan 20'sinin pnömokok olmadığını, 18'inin ise tür düzeyinde isimlendirilemediğini bildirmişlerdir. Sonuçta fenotipik ve genotipik yöntemlere rağmen tanıda hâlâ problemlerin bulunduğunu bildirmişlerdir.

Optokine biri duyarlı, diğeri orta duyarlı 2 viridans suşunun genetik özelliklerinin incelendiği bir çalışmada optokin MİK değerinin duyarlı suşda *S.pneumoniae*'ye eşit, orta duyarlı olanda yüksek olduğu saptanmış, ayrıca duyarlı suşun safrada erimediği, kapsül antiserumu ile reaksiyon vermediği, rRNA, *lytA* ve *pnl* pnömokok spesifik problemler ile hibridizasyon yapmadığı, 16S rRNA ve *sodA* genleri araştırıldığında bu 2 suşun *S.mitis* olduğu saptanmıştır. Duyarlı suşda optokinin hedef yeri olan ATPaz incelendiğinde, *S.pneumoniae* ile büyük benzerlik gösterdiği ve bu genin pnömokoklardan kazandığı, orta duyarlı suşa da optokin duyarlılığını sağlayan belirli aminoasit dizisininin transfer olduğu gösterilmiştir⁽²³⁾.

Heeg ve ark.⁽¹³⁾ Almanya, İspanya ve Fransa'da invaziv infeksiyonlardan izole edilen 12 atipik pnömokok suşunun fenotipik ve genotipik özelliklerini inceleyerek *S.pseudopneumoniae* ile karşılaştırdıklarında *S.pneumoniae*'nin 9'unda DNA prob hibridizasyonunun pozitif, geri kalan 3'ünde klasik pnömokok özellikleri olduğunu (safrada eriyen, optokine duyarlı veya kapsül şişme deneyi pozitif) saptamışlar; farklı olarak yedi suşun *S.pseudopneumoniae* gibi optokine % 5 CO₂'li ortamda dirençli, normal ortamda duyarlı sonuç verdiğini ve tümü kapsüllü olan suşlardan yalnız 3'ünün tiplendirilebildiğini (serotip 14) bildirmişlerdir. Genotipik özellikleri incelendiğinde tümünün *ply*, 6'sının *lytA*, 2'sinin *psaA* yönünden pozitif olduğu, MLTS deneyi ile tüm suşlarda farklı gen dizimi

Tablo 4: *S.pneumoniae* ön tanılı altı suşun fenotipik ve genotipik özellikleri⁽²¹⁾.

İzolasyon yeri	İzolasyon yılı	Örnek	Klinik tanı	Optokin duyarlılığı	Safrada erime	PCR			16S rDNA-RsaI paterni
						<i>ply</i>	<i>psA</i>	<i>lytA</i>	
Kor 145	1998	Balgam	Pnömoni	Du	+	+	+	+	M
HK P47	2000	Balgam	Pnömoni	Du	+	+	-	+	P
HK P55	2001	Balgam	Pnömoni	Du	-	+	-	+	M
HK P116	2001	Balgam	Pnömoni	Du	+	+	+	+	P
SI P25	2000	Balgam	Pnömon	Du	+	+	-	+	M
VN O27	2001	OKS	OM	Di	+	+	-	-	M

Kor:Kore; HK:Hong Kong; SI:Singapur; VN:Vietnam; Du:duyarlı; Di:dirençli; *ply*:pnömolin; *psA*:pnömokokkal yüzey antijen; *lytA*:otolin; OKS:orta kulak sıvısı; OM:ortakulak infeksiyonu; M:Mitis gruba özgül; P:*S.pneumoniae*'ye özgül.

Tablo 5: 12 atipik *S. pneumoniae*'nin fenotipik ve genotipik özellikleri⁽¹³⁾.

Suş sayısı	DNA prob	Safrada erime	Optokine duyarlılık	Kapsül şişme	ply	lytA	psaA
9/12	+						
3/12		+	+	+			
7/12			7*				
12/12					+		
6/12						+	
2/12							+

*% 5 CO₂'li ortamda dirençli, normal ortamda duyarlı.

bulunduğu saptanmıştır (Tablo 5).

Bu sonuçlara göre araştırmacılar *S.pneumoniae*'nin VS'lardan ve *S.pseudopneumoniae*'den ayırımının oldukça güç olduğunu, gösterilen *ply* ve *lytA* virulans faktörlerinin *S. mitis* ve *S. oralis*'de de bulunduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca atipik pnömokoklarla, alfa-hemolitik streptokokların DNA yapıları benzerlik gösterdiğinden elde edilen sonuçların kesin tanıya götürmediği anlaşılmıştır. Bunun yanında atipik pnömokokların belirlenmesinde MLST deneyinin ayırıcı bir öneme sahip olduğu kabul edilmiştir.

Suzuki ve ark.⁽³²⁾ 2005, Whalan ve ark.⁽³⁴⁾ 2006 yılında yayımladıkları ve pnömokok tanısını sağlayabilecek hedef moleküllerin belirlenmesini amaçlayan çalışmalarında yine kesin sonuç elde edememişlerdir.

Çalışmaların sonuçlarından elde edilen tüm veriler değerlendirildiğinde tipik koloni morfolojisi gösteren suşlarda saptanan *lytA*, *lytB*, *psaA*, *piaA* genlerinin yüksek tanı değerine sahip olduğu kabul edilmesine rağmen kesin tanıya götürmediği saptanmıştır^(24,25,26).

Ülkemizde moleküler yöntemler ile *S.pneumoniae* saptama ve tanı çalışmaları son yıllarda bildirilmeye başlamıştır (1,3,8,9). Klasik yöntemlerle pnömokok tanısı alan fakat ileri inceleme ile pnömokok olmadığı saptanan ilk suş Aktaş ve ark.⁽¹⁾ tarafından yayımlanmıştır. Bu çalışmada suşun, *psaA* gen amplifikasyonu ile pnömokok olmadığı, streptokok kiti (API ID32 strep) ile *Gemella haemolysans* (% 99.1) olduğu ortaya çıkmıştır.

Sonuç olarak ülkemizde, çeşitli infeksiyonlara neden olan atipik pnömokok veya atipik viridans grubu bir bakteri izole edildiğinde, özellikle invaziv infeksiyona neden olmuşsa, ileri incelemeye alınmalı ve hatalı tanının, dolayısıyla yanlış tedavinin engellenmesi sağlanmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Aktaş Z, Can B, Berkiten R: Dikkat: Safrada eriyen, optokine duyarlı, *psaA* PCR negatif alfa hemolitik Gram pozitif kok (Gemella?), ANKEM Derg 2005;19(Ek 1):56.
2. Arbiq JC, Poyart C, Trieu-Cuot P et al: Accuracy of phenotypic and genotypic testing for identification of *Streptococcus pneumoniae* and description of *Streptococcus pseudopneumoniae* sp. nov, J Clin

Microbiol 2004;42(10):4686-96.

3. Barış C: Solunum yolu örneklerinde *S.pneumoniae*'nin saptanmasında optokin disk duyarlılığı, safrada erime ve PCR yöntemlerinin yeri (Uzmanlık Tezi), İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul (2004).
4. Carvalho MG, Steigerwalt AG, Thompson T, Jackson D, Facklam RR: Confirmation of nontypeable *Streptococcus pneumoniae* like organisms isolated from outbreaks of epidemic conjunctivitis as *Streptococcus pneumoniae*, J Clin Microbiol 2003;4(9):4415-7.
5. Chandler LJ, Reisner BS, Woods GL, Jafri AK: Comparison of four methods for identifying *Streptococcus pneumoniae*, Diagn Microbiol Infect Dis 2000;37(4):285-7.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI/NCCLS): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fifteenth Informational Suppl., M100-S15, Wayne (2005).
7. Dowson CG: What is a pneumococcus, "Tuomanen EI, Mitchell TJ, Morrison DA, Spratt BG(eds): The Pneumococcus" kitabında s.3-14, ASM, Washington (2004).
8. Durmaz R, Çizmeci Z, Aktaş E, Bayraktar MR, Durmaz B, Kalcıoğlu MT: Sağlıklı ilkököl öğrencilerinin nazofarenkslerinden izole edilen *Streptococcus pneumoniae* izolatları arasındaki epidemiyolojik ilişkinin araştırılması, 3.Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Özet kitabı P13, Ankara (2004).
9. Durmaz R, Özerol IH, Kalcıoğlu MT, Öncel S, Aşgın N, Direkel S: Nazofarinks örneklerinde üç solunum yolu patojeninin multipleks polimeraz zincir reaksiyon (PZR) yöntemiyle araştırılması, 29. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Program ve özet kitabı P11-07, Antalya (2000).
10. Gardam MA, Miller MA: Optochin revisited: Defining the optimal type of blood agar for presumptive identification of *Streptococcus pneumoniae*, J Clin Microbiol 1998;36(3):833-4.
11. Hanage WP, Kaijalainen T, Herva E, Saukkoriipi A, Syrjänen R, Spratt BG: Using multilocus sequence data to define the pneumococcus, J Bacteriol 2005;187(17):6223-30.
12. Harf-Monteil C, Granello C, Le Brun C, Monteil H, Riegel P: Incidence and pathogenic effect of *Streptococcus pseudopneumoniae*, J Clin Microbiol 2006;44(6):2240-1.
13. Heeg C, Franken C, Linden M, Al-Lahham A, Reinert RR: Phenotypic and genotypic characterisation of 'atypical' *Streptococcus pneumoniae* isolates by MLST, 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, p.1134-01-225, Copenhagen (2005).
14. Jehl F, Chomarat M, Weber M, Gérard A: De l'antibiogramme à la prescription, BioMérieux yayını s.58, Marcy L'Étoile-France (2003).
15. Kaijalainen T, Rintamaki S, Herva E, Leinonen M: Evaluation of

- gene-technological and conventional methods in the identification of *Streptococcus pneumoniae*, *J Microbiol Methods* 2002;51(1):111-8.
16. Kawamura Y, Hou XG, Sultana F, Miura H, Ezaki T: Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*, *Int J Syst Bacteriol* 1995;45(2):406-8.
 17. Kawamura Y, Whiley RA, Shu SE, Ezaki T, Hardie JM: Genetic approaches to the identification of the *mitis* group within the genus *Streptococcus*, *Microbiology* 1999;145(Sep):2605-13.
 18. Kearns AM, Wheeler J, Freeman R, Seiders PR: Pneumolysin detection identifies atypical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *J Clin Microbiol* 2000;38(3):1309-10.
 19. Keith ER, Podmore RG, Anderson TP, Murdoch DR: Characteristics of *Streptococcus pseudopneumoniae* isolated from purulent sputum samples, *J Clin Microbiol* 2006;44(3):923-7.
 20. Kellogg JA, Bankert DA, Elder CJ, Gibbs JL, Smith MC: Identification of *Streptococcus pneumoniae* revisited, *J Clin Microbiol* 2001;39(9):3373-5.
 21. Ko KS, Oh WS, Peck KR, Lee JH, Lee NY, Song JH: Phenotypic and genotypic discrepancy of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from Asian countries, *Immunol Medical Microbiol* 2005;45(1):63-70.
 22. Llull D, Lopez R, Garcia E: Characteristic signatures of the *IytA* gene provide a basis for rapid and reliable diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections, *J Clin Microbiol* 2006;44(4):1250-6.
 23. Martin-Galiano AJ, Balsalobre L, Fenoll A, de la Campa AG: Genetic characterization of optochin-susceptible viridans group streptococci, *Antimicrobial Agents Chemother* 2003;47(10):3187-94.
 24. Messmer TO, Simpson JS, Stinson A, Wong B, Carlone GM, Facklam RR: Comparison of four polymerase chain reaction assays for specificity in the identification of *Streptococcus pneumoniae*, *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;49(4):249-54.
 25. Morrison KE, Lake D, Crook J et al: Confirmation of *psaA* in all 90 serotypes of *Streptococcus pneumoniae* and potential of this assay for identification and diagnosis, *J Clin Microbiol* 2000;38(1):434-7.
 26. Moscoso M, Obregon V, Lopez R, Garcia JL, Garcia E: Allelic variation of polymorphic locus *lytB*, encoding a choline-binding protein, from streptococci of the *mitis* group, *Appl Environ Microbiol* 2005;71(12):8706-13.
 27. Neeleman C, Klaassen CHW, Klomberg DM, de Valk HA, Mouton JW: Pneumolysin is a key factor in misidentification of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* and a putative virulence factor of *S. mitis* and other streptococci, *J Clin Microbiol* 2004;42(9):4355-7.
 28. Obregon V, Garcia P, Garcia E, Fenoll A, Lopez R, Garcia JL: Molecular peculiarities of the *lytA* gene isolated from clinical pneumococcal strains that are bile insoluble, *J Clin Microbiol* 2002;40(7):2545-54.
 29. Pikis A, Campos JM, Rodriguez WJ, Keith JM: Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae*: mechanism, significance, and clinical implications, *J Infect Dis* 2001;184(5):582-90.
 30. Rintamaki S, Saukkoriipi A, Salo P, Takala A, Leinonen M: Detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA by using polymerase chain reaction and microwell hybridization with Europium-labelled probes, *J Microbiol* 2002;50(3):313-8.
 31. Seki M, Yamashita Y, Torigoe H, Tsuda H, Sato S, Maeno M: Loop-mediated isothermal amplification method targeting the *IytA* gene for detection of *Streptococcus pneumoniae*, *J Clin Microbiol* 2005;43(4):1581-6.
 32. Suzuki N, Seki M, Nakano Y, Kiyoura Y, Maeno M, Yamashita Y: Discrimination of *Streptococcus pneumoniae* from viridans group streptococci by genomic subtractive hybridization, *J Clin Microbiol* 2005;43(9):4528-34.
 33. Verhelst R, Kaijalainen T, De Baere T et al: Comparison of five genotypic techniques for identification of optochin resistant pneumococcus-like isolates, *J Clin Microbiol* 2003;41(8):3521-5.
 34. Whalan RH, Funnell SG, Bowler LD, Hudson MJ, Robinson A, Dowson CG: Distribution and genetic diversity of the ABC transporter lipoproteins *PiuA* and *PiaA* within *Streptococcus pneumoniae* and related streptococci, *J Bacteriol* 2006;188(3):1031-8.
 35. Whatmore AM, Efstratiou A, Pickering A et al.: Genetic relationships between clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus oralis*, and *Streptococcus mitis*: characterization of "atypical" pneumococci and organisms allied to *S.mitis* harboring *S.pneumoniae* virulence factor-encoding genes, *Infect Immun* 2000;68(3):1374-82.
 36. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Gram-Positive Cocci Part II: Streptococci, Enterococci, and the 'Streptococcus-Like' Bacteria, 6.baski, s.672-764, Lippincott Williams Wilkins, Philadelphia (2006).