

## BOĞAZ SALGILARINDAN İZOLE EDİLEN BETA-HEMOLİTİK STREPTOKOKLARDA PENİSİLİN-G TOLERANSININ ARAŞTIRILMASI\*

Bülent GÜRLER<sup>1</sup>, Habibe ERDENİZ<sup>2</sup>

### ÖZET

Boğaz salgılarından izole edilen ve Slidex Strepto kiti (bioMérieux) kullanılarak aglütinasyon testi ile 61'i A grubu, ikisi B grubu ve yedisi C grubu olarak tanımlanan 70 beta-hemolitik streptokok suşunun penisilin-G'ye toleransı MBC/MIC oranı belirlenerek araştırılmıştır. Çalışmada Todd-Hewitt buyyonu (pH 7.5) ve mikrodilüsyon yöntemi kullanılmış, penisilin-G'nin 0.000125-0.25 µg/ml konsantrasyonları denenmiştir. 70 streptokok suşunun tamamı penisilin-G'ye duyarlı bulunmuştur. 52 suş için MBC ve MIC değerlerinin aynı olduğu, 12 suş için MBC değeri MIC değerinin iki katı, bir suş için dört katı, üç suş için sekiz katı, bir suş için 16 katı olduğu, bu 69 suşun penisilin-G'ye toleran olmadığı saptanmıştır. Bir suş için ise MIC'un 2-16 katı antibiyotik konsantrasyonları bakterisid etki gösterdiği halde 32 kat konsantrasyonda önemli oranda bakterinin canlı kaldığı, bu suşun toleran olduğu ve Eagle fenomeni gösterdiği kabul edilmiştir.

### SUMMARY

*Investigation of penicillin-G tolerance in beta-hemolytic streptococci isolated from throat swabs.*

By establishing the MBC/MIC ratios, penicillin-G tolerance was searched in 70 strains of beta-hemolytic streptococci isolated from throat swabs. Sixty-one strains were found to be group A, 2 to be group B and 7 to be group C by Slidex Strepto kit (bioMerieux). MIC and MBC were determined by microdilution technique in Todd-Hewitt broth (pH 7.5) containing from 0.000125 µg/ml to 0.25 µg/ml penicillin-G in two-fold dilutions. All strains were sensitive. For 52 strains MBCs were the same as MICs, for 12 strains were 2-folds, for 1 strain was 4-folds, for 3 strains were 8-folds, and for 1 strain was 16-folds and those 69 strains were not tolerant to penicillin-G. On the other hand, for one strain, although the 2-16 folds of the MIC were bactericidal, at 32 folds of MIC concentration a considerable number of bacteria were viable and this strain was accepted to be tolerant, expressing the Eagle phenomenon.

\* 10. Türkiye Antibiyotik ve Kemoterapi (ANKEM) Kongresi'nde sunulmuştur (6-9 Haziran 1995, Antalya).

1- İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çapa, İstanbul.

2- İstanbul Tıp Fakültesi, Mikroorganizma Kültür Koleksiyonları Araştırma ve Uygulama Merkezi (KÜKENS), Çapa, İstanbul.

## GİRİŞ

Streptokok infeksiyonlarının tedavisinde en fazla oral veya intramusküler penisilin türevleri kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda çeşitli çalışmalarda özellikle A grubu beta-hemolitik streptokokların penisilin türevleri ile üst solunum yollarından eradikasyonunda % 10-30 oranında başarısızlık bildirilmiştir (3, 5, 16). Bu başarısızlığın nedenleri arasında ağız ve üst solunum yollarının normal florasını oluşturan aerop ve anaerop bakterilerin beta-laktamaz enzimi salgılayarak penisilini inaktive etmesi, tedavi süresinin gerektiğinden kısa tutulması ve penisiline tolerans sayılabilir (1, 3, 6, 9).

Tolerans olayı ilk kez 1970 yılında Tomatz ve ark. (17) tarafından bir mutant *S.pneumoniae* suşunun penisilin varlığında aynı türden diğer streptokok suşlarına göre çok daha yavaş ölmesi ve erime olayının meydana gelmemesi ile gözlenmiştir. Sonraki yıllarda birçok toleran streptokok ve stafilokok suşları bildirilmiş olup, toleransın sadece laboratuvarlarda elde edilen mutant suşlarda rastlanan bir olay olmadığı gösterilmiştir (13, 14).

Literatürde yer alan özellikle A grubu beta-hemolitik streptokokların penisilin ile eradikasyonunda başarısızlık oranlarının artışı ile ilgili olarak, çalışmamızda boğaz salgılarından izole edilen beta-hemolitik streptokoklarda penisilin-G toleransının araştırılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Farenjitli hastalardan izole edilen 70 beta-hemolitik streptokok suşu çalışma kapsamına alınmıştır. Suşların grup tayini Slidex Strepto kiti (biöMérieux) kullanarak aglütinasyon testi ile yapılmıştır.

Penisilin-G'ye tolerans MBC/MIC oranları belirlenerek araştırılmıştır. Çalışmada Todd-Hewitt buyyonu (pH 7.5) ve mikrodilüsyon yöntemi kullanılmış, penisilin-G'nin 0.000125-0.25 µg/ml konsantrasyonları denenmiştir. Logaritmik üreme fazındaki bakteri inokulumunun hazırlanması için kanlı besiyerine azaltma yöntemi ile yayılan streptokok kolonilerinden 4-5 adet alınıp, 4 ml Todd-Hewitt buyyonuna ekilerek 37°C'de 4-5 saat bekletilmiştir. Sonra streptokok süspansiyonlarının bulanıklığı McFarland 0.5 numaralı standardına göre ayarlanmıştır. Bu şekilde elde edilen ve konsantrasyonu yaklaşık  $5 \times 10^8$  CFU/ml olan süspansiyondan 10 µl alıp 10 ml steril Todd-Hewitt buyyonuna aktararak konsantrasyonu yaklaşık  $5 \times 10^5$  CFU/ml olan bakteri süspansiyonu elde edilmiştir. Bu inokulumdan 100 µl alıp yine 100 µl antibiyotikli besiyeri içeren kuyulara aktarılmış ve bu şekilde kuyulardaki antibiyotik konsantrasyonunun iki kat azaldığı dikkate alınmıştır. Plaklar 37°C'de 24 saat bekletildikten sonra üremeyi inhibe eden en düşük antibiyotik konsantrasyonu MIC olarak belirlenmiştir.

MBC'ü belirlemek için üreme görülmeyen kuyuların her birine 2000 U/ml'lik penisilinaz enziminden 10 µl konmuş, kuyulardaki süspansiyon iyice karıştırıldıktan sonra 50 µl alınarak kanlı besiyerine ekim yapılmıştır. 37°C'de 48 saat inkübasyondan sonra üremeyi en az % 99.9 oranında inhibe eden en düşük antibiyotik konsantrasyonu MBC değeri olarak belirlenmiştir.

## BULGULAR

Çalışma kapsamına alınan 70 beta-hemolitik streptokok suşundan 61'inin A grubu, ikisinin B grubu ve yedisinin C grubu olduğu belirlenmiştir. Suşlar için penisilin-G'nin MIC değerleri tabloda gösterilmiştir.

Tablo. Penisilin-G'nin denenen 70 beta-hemolitik streptokok suşu için MIC değerlerinin dağılımı.

µg/ml	≥0.06	0.03	0.015	0.008	0.004	0.002	0.001	0.0005	0.00025	0.000125
Suş sayısı	0	1	13	26	7	6	7	0	1	9

NCCLS'in pnömokok dışında streptokokların penisiline duyarlılığı için kabul ettiği MIC sınırına göre ( $MIC \leq 0.12 \mu\text{g/ml}$ ) denenen 70 suşun tamamı penisiline duyarlı bulunmuştur. 52 suş için MBC ve MIC değerlerinin aynı olduğu, 12 suş için MBC değerlerinin MIC değerinin iki katı, bir suş için dört katı, üç suş için sekiz katı, bir suş için 16 katı olduğu, bu 69 suşun penisilin-G'ye toleran olmadığı saptanmıştır. Bir suş için ise MIC'nun 2-16 katı antibiyotik konsantrasyonları bakterisid etki gösterdiği halde 32 kat konsantrasyonda önemli oranda bakterinin canlı kaldığı, bu suşun toleran olduğu ve Eagle fenomeni gösterdiği belirlenmiştir.

### TARTIŞMA

Bakterilerde antibiyotik toleransı, bir bakterinin antibiyotiğin öldürücü etkisine daha dayanıklı olması, başka bakteri türlerine ya da aynı türden başka suşlara bakterisid etkili bir antibiyotiğin toleran bakteriye sadece bakteriyostatik etki göstermesidir (11). Tolerans özellikle beta-laktam antibiyotikler ve hücre duvarı sentezini inhibe eden diğer bakterisid antibiyotiklerle Gram pozitif bakteriler arasında saptanan bir olaydır. Stafilokok ve streptokoklarda, enterokoklarda, laktobasillerde, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* ve *Bacillus subtilis*'de antibiyotik toleransı bildirilmiştir. Laboratuvarında elde edilen toleran bir *E.coli* mutanını dışında, Gram negatif çomak şeklindeki bakterilerde tolerans olayı hakkında kesin bilgi yoktur (6). Çeşitli çalışmalarda belirtilen tolerans oranları oldukça farklıdır. *Streptococcus pyogenes* suşlarında penisiline % 16-91, *Staphylococcus aureus* suşlarında penisilinaza dayanıksız penisilinler için % 0-100 arasında tolerans oranları bulunmuştur (6). Bu oranların birbirinden çok farklı olmasının sebepleri arasında tolerans belirlemede henüz standardize yöntem olmadığı için farklı ve standardize edilmemiş yöntemlerin kullanılması, kullanılan besiyerinin içeriği, inokulumun üreme fazı ve konsantrasyonu, MBC'yi belirlemek için sıvı dilüsyonlardan katı besiyerine ekim yapma esnasında antibiyotiğin taşınması sayılabilir (15).

Çalışmamızda kullanılan besiyeri, inokulumun üreme fazı ve konsantrasyonu NCCLS'in önerdiği gibi yapılmış ve kullanılmıştır (12). Ayrıca sıvı besiyerinden katı besiyerine antibiyotik taşınmasını önlemek için ekim öncesi üreme gözlenmeyen her kuyuya 20 U penisilinaz enzimi konmuştur.

Bakterilerde antibiyotik toleransını belirlemek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlardan en sağlıklı sonuç veren zaman-ölüm grafiklerinin çizilmesi çalışmalarına dayanan yöntemdir; ancak oldukça zahmetlidir ve bakteriyoloji laboratuvarlarında birçok suş için kolay uygulanabilecek bir yöntem değildir. Toleransın belirlenmesinde en yaygın olarak kullanılan yöntem MBC/MIC oranının belirlenmesine dayanan yöntemdir. MBC/MIC oranının 32 veya daha fazla olduğunda suşlar toleran olarak kabul edilir (7, 18).

Çalışmamızda denenen suşların penisilin-G'ye toleransı MBC/MIC oranları belirlenerek araştırılmıştır. Çalışmamızda bu oranın (MBC/MIC) 52 suş için bir, 12 suş için iki, bir suş için dört, üç suş için sekiz, bir suş için 16 olduğu, bu 69 suşun penisilin-G'ye toleran olmadığı saptanmıştır. Bir suş için ise MIC'un 2-16 katı antibiyotik konsantrasyonları bakterisid etki gösterdiği halde 32 kat konsantrasyonda önemli oranda bakterinin canlı kaldığı, bu suşun toleran olduğu ve Eagle fenomeni gösterdiği belirlenmiştir. 1948 yılında Eagle, bakterisid etkili bir antibiyotik olan penisilinin, MIC'un hemen üstündeki konsantrasyonlarda bakterinin ölümüne yol açtığı halde, çok daha yüksek konsantrasyonlarda bakteri ölümünün azaldığını, yani etkinin bakteriyostatik hale döndüğünü göstermiştir (18).

Son 15 yıl içinde çeşitli araştırmacılar A grubu beta-hemolitik streptokokların neden olduğu farenjitlerin % 10-30 arasında değişen oranlarda penisilin ile tedavi edilemediğini açıklamışlardır (3, 5, 16). Tedavi başarısızlığı konusunda farklı görüşler bildirilmiştir. Brook (1) orofarengeal florada yer alan aerop ve anaerop bakterilerin penisilini lokal inaktivasyon ile etkisiz hale getirerek tedavi başarısızlığını arttırdığını belirtmiştir. Kim ve Kaplan (9) A grubu beta-hemolitik streptokokların penisilin ile eradike edilememesinin bir nedeninin penisilin toleransı olabileceğini öne sürmüşler; penisilin ile tedavi edilen hastalardan izole ettikleri suşların hiçbirinde tolerans belirlenemezken, tedavisi başarısız olan hastalardan elde ettikleri suşların % 25'inin penisiline toleran olduğunu bildirmişlerdir. Belirtilen bu görüşlerin tersine bazı yayınlarda penisilin toleransı ve tedavi başarısızlığı arasında bir bağlantı olmadığı vurgulanmıştır. Feldman ve arkadaşları (5) akut farenjitli çocukların % 12'sini penisilinle tedavi edemezken bu hastalardan elde ettikleri hiçbir suşun penisiline toleran olmadığını belirtmişlerdir. Aynı şekilde Chaudhary ve arkadaşları (2) penisilin ile eradike edilemeyen suşları incelemişler, hiçbirinde tolerans saptamamışlardır.

Dış kaynaklı literatürde A grubu ve diğer gruplardan beta-hemolitik streptokokların penisilin-G'ye toleransı konusunda birçok çalışma olmasına karşın, yurdumuzda bu konuda yapılan araştırmalar azdır. Ergüven ve arkadaşları (4) inceledikleri beta-hemolitik streptokoklarda penisiline % 8 tolerans belirlerken, Karabiber ve Türet (8), Kiraz ve Kaya (10) A grubundan suşlarda penisiline tolerans saptamamışlardır.

#### KAYNAKLAR

- 1- Brook I: The role of beta-lactamase-producing bacteria in the persistence of streptococcal tonsillar infection, *Rev Infect Dis* 6: 601 (1984).
- 2- Chaudhary S, Bilinsky SA, Hennessy JL, Soler SM, Wallace SE, Schacht CM, Bisno AL: Penicillin V and rifampin for the treatment of group A streptococcal pharyngitis: a randomized trial of 10 days penicillin vs. 10 days penicillin with rifampin during the final 4 days of therapy, *J Pediatr* 106: 481 (1985).
- 3- Dagan R, Ferne M: Association of penicillin-tolerant streptococci with epidemics of streptococcal pharyngitis in closed communities, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 8: 629 (1989).
- 4- Ergüven S, Çerikçioğlu N, Arıtan S, Berkman E: Boğaz kültürlerinden izole edilen beta-hemolitik streptokoklarda penisilin toleransı, *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 20: 263 (1990).
- 5- Feldman S, Bisno AL, Lott L, Dodge R, Jackson RE: Efficacy of benzathine penicillin G in group A streptococcal pharyngitis: Reevaluation, *J Pediatr* 110: 783 (1987).
- 6- Handwerger S, Tomasz A: Antibiotic tolerance among clinical isolates of bacteria, *Rev Infect Dis* 7: 368 (1985).

- 7- Holdbrook WP, Olafsdottir D, Magnusson HB, Benediktsdottir E: Penicillin tolerance among oral streptococci, *J Med Microbiol* 27: 17 (1988).
- 8- Karabiber N, Türet S: A grubu beta-hemolitik streptokoklarda penisilin toleransının gösterilmesinde gradient replika plate yönteminin kullanılması, *ANKEM Derg* 5: 1 (1991).
- 9- Kim KS, Kaplan EL: Association of penicillin tolerance with failure to eradicate group A streptococci from patients with pharyngitis, *J Pediatr* 107: 681 (1985).
- 10- Kiraz N, Kaya D: Farenjitli hastalardan izole edilen grup A streptokoklarda penisilin G toleransının araştırılması (özet), *ANKEM Derg* 8: 90 (1994).
- 11- Michel MF, Leeuwen van WB: Degree and stability of tolerance to penicillin in *Streptococcus pyogenes*, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 8: 225 (1989).
- 12- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, Fourth Informational Supplement; Approved Standard, NCCLS Document M100-S4, Villanova (1992).
- 13- Rolston KVI, Chandrasekar PH, Le Frock J L: Antimicrobial tolerance in group C and group G streptococci, *J Antimicrob Chemother* 13: 389 (1984).
- 14- Sabath LD, Wheeler N, Laverdiere M, Blazevic D, Wilkinson BJ: A new type of penicillin resistance of *Staphylococcus aureus*, *Lancet* 1: 443 (1977).
- 15- Sherris JC: Problems in in vitro determination of antibiotic tolerance in clinical isolates, *Antimicrob Agents Chemother* 30: 633 (1986).
- 16- Smith TD, Huskins WC, Kim KS, Kaplan EL: Efficacy of  $\beta$ -lactamase-resistant penicillin and influence of penicillin tolerance in eradicating streptococci from the pharynx after failure of penicillin therapy for group A streptococcal pharyngitis, *J Pediatr* 110: 777 (1987).
- 17- Tomasz A, Albino A, Zanati E: Multiple antibiotic resistance in a bacterium with suppressed autolytic system, *Nature* 227: 138 (1970).
- 18- Töreci K: Bakterilerde antibiyotik toleransı, "Çalangu S, Eraksoy H, Özsüt H (eds): *İnfeksiyon Hastalıkları 92*" kitabında s.39, Yüce Yayınları, İstanbul (1992).