

# A GRUBU BETA-HEMOLİTİK STREPTOKOKLARDA PENİSİLİN TOLERANSININ GÖSTERİLMESİNDE GRADIENT-REPLİKA PLATE YÖNTEMİNİN KULLANILMASI

Nihal KARABİBER<sup>1</sup>, Sevgi TÜRET<sup>2</sup>

## ÖZET

Boğaz kültürlerinden izole edilen 20 A grubu beta-hemolitik streptokok suşunda gradient-replika plate ve MBC/MIC yöntemleri ile penisilin toleransı araştırılmıştır. İncelenen 20 suşun hiçbirinde penisilin toleransına rastlanmamıştır MBC değeri 0.04 µg/ml olan bir suş dışında tüm suşların MIC ve MBC değerleri 0.02 µg/ml olarak bulunmuştur. Penisilin toleransının araştırılmasında gradient-replika plate yöntemi MBC/MIC yöntemine göre daha pratik bulunmuştur. Yöntemin duyarlılığı konusunda yorum yapabilmek için ve bizim toplumumuzdan izole edilen A grubu beta-hemolitik streptokoklarda penisilin toleransına ilişkin daha fazla bilgi edinmek için, daha çok sayıda suş içeren, tedavi öncesi ve sonrası izole edilen suşların inceleneceği daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

## SUMMARY

*Use of gradient-replica plate method for the demonstration of tolerance to penicillin in group A beta-hemolytic streptococci.*

Penicillin tolerance was investigated in 20 strains of group A beta-hemolytic streptococci isolated from throat cultures. Gradient-replica plate and MBC/MIC methods were used. None of the strains showed evidence of tolerance. In one strain MBC and MIC values were 0.04 µg/ml and 0.02 µg/ml, respectively. In 19 strains both MBC and MIC values were found to be 0.02 µg/ml.

Replica-plate method was found more practical than MBC/MIC method. However, in order to get much more knowledge about penicillin tolerance in group A beta-hemolytic streptococci isolated in our country, more extensive studies in which a large number of strains isolated in pre and post-treatment periods are to be examined are needed.

1. Türkiye Yüksek İhtisas Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

2. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Beşevler, Ankara.

## GİRİŞ

A grubu beta-hemolitik streptokokların (AGBHS) neden olduğu üst solunum yolu infeksiyonlarının tedavisinde oral veya intramusküler penisilin ilk tercih edilen antibiyotiktir (1). Ancak son 20 yılda, penisilinle yapılan tedavilerde % 6'dan % 38'e kadar değişen oranlarda, klinik ya da bakteriyolojik olarak iyileşme sağlanamadığı bildirilmiştir (5, 6, 7, 11, 17). Tedavinin başarısız olmasının nedeni olarak bazı teoriler öne sürülmüştür: Bunlar arasında, verilen antibiyotiğin muntazam olarak kullanılmamış olması (9), boğaz florasında bulunan başka organizmaların meydana getirdiği beta-laktamaz enziminin penisilini inaktive ederek streptokokları penisilin etkisinden koruması (2, 3), taşıyıcılık (6) sayılabilir. Etken organizmanın penisiline toleran olması da tedavi başarısızlığında etkili olduğu öne sürülen bir diğer nedendir (8, 11).

Tolerans, bir antibiyotiğin MBC/MIC (Minimum Bakterisidal Konsantrasyon/Minimum İnhibitör Konsantrasyon) oranının 16 ya da fazla olması şeklinde tanımlanmaktadır (8).

Streptokoklarda penisilin toleransının gösterilmesi için MBC/MIC oranının belirlenmesinden başka, zamana göre öldürme oranının saptanması (time-kill studies) (8, 13, 14), disk difüzyon tekniği (16) ve gradient-replika plate (13, 14) yöntemleri kullanılmaktadır.

Dış kaynaklı literatürde penisilin toleransına ilişkin birçok araştırma olmasına karşın ülkemizde bu konu ile ilgili araştırmalara çok az rastlanmaktadır.

Bu çalışmanın amacı ülkemizde AGBHS'larda penisilin toleransının olup olmadığına dair bir fikir sahibi olmak ve bu amaçla gradient-replika plate yöntemi ile MBC/MIC yöntemini uygulama kolaylığı ve güvenilirlik bakımından karşılaştırmaktır.

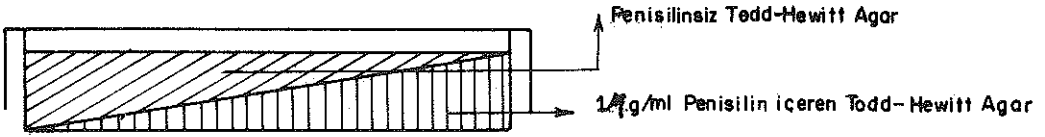
## GEREÇ VE YÖNTEM

### Bakteriler:

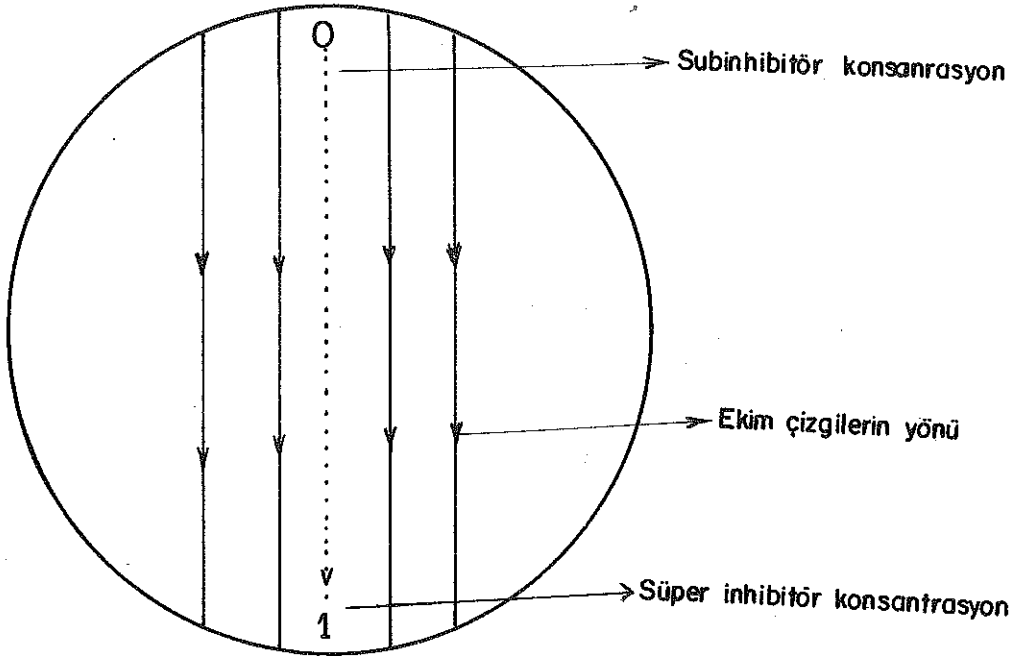
Boğaz kültürlerinden izole edilen ve basitrasine (0.04 Ü) duyarlı ve trimetoprim-sulfametoksazole (25 µg) dirençli olmaları ile A grubu olarak değerlendirilen (10) adet beta-hemolitik streptokok suşu incelenmiştir. Tek koloni pasajları ile Todd-Hewitt buyyonunda elde edilen logaritmik faz kültürleri çalışma yapılıncaya kadar -70°C'de saklanmıştır (13). Çalışma için -70°C'den çıkarılan kültürler eritilmiş, % 5'lik koyun kanlı agara pasaj yapılmış ve 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. Her suştan tek koloni alınarak 5 ml Todd-Hewitt buyyonuna pasaj yapılmış ve 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. Bu bir gecelik kültürden 1/10 oranında olmak üzere taze buyyona inoküle edilmiş ve 3-4 saat süreyle, kültürlerin bulanıklığı McFarland 0.5 standardına uygun gelinceye kadar inkübe edilmiştir. Tolerans araştırılmasında bu, logaritmik faz kültürleri kullanılmıştır (13).

### Penisilin-gradient plaklarının hazırlanması:

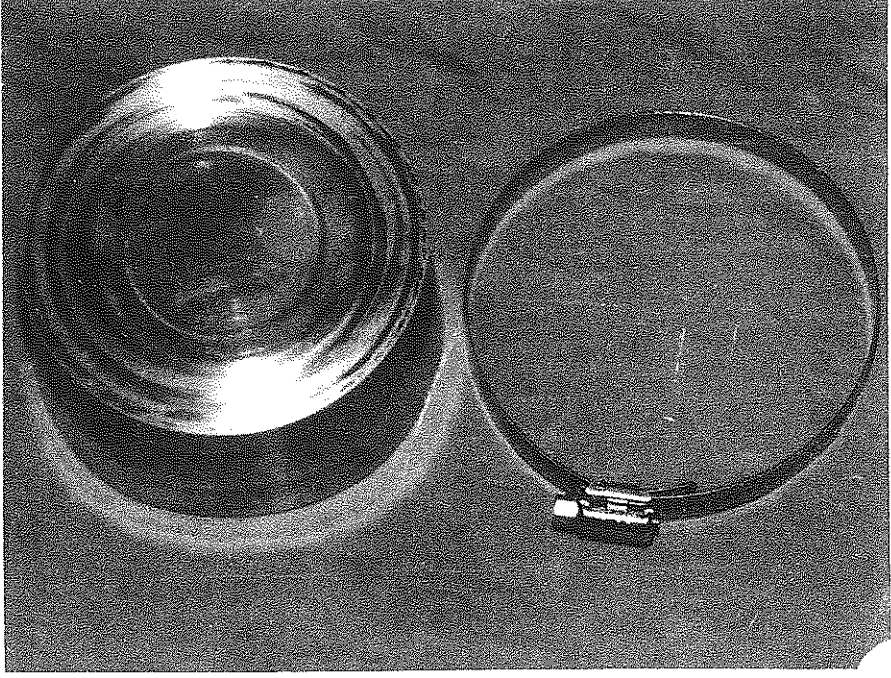
Plaklar, penisilin gradienti yaklaşık  $1 \mu\text{g/ml}$  - 0 olacak şekilde agar örtme tekniği (agar overlay technique) ile hazırlanmıştır (12, 13). 12 cm çapındaki steril petri kutularına  $1 \mu\text{g/ml}$  penisilin içeren Todd-Hewitt agardan 30 ml dökülmüştür. Petrilerin bir tarafı 4-5 mm yükseltilecek şekilde eğik olarak donması sağlanmıştır. Daha sonra penisilinsiz olarak hazırlanmış olan aynı besiyerinden 45 ml bu eğik tabakanın üzerine dökülmüş ve düz bir yüzey olacak şekilde katılaşmaya bırakılmıştır (Şekil 1). Bu plaklar buzdolabında saklanmış ve ertesi gün kullanılmıştır. Bu şekilde hazırlanan penisilin-gradient plaklarında penisilin konsantrasyonu plağın bir tarafından diğer tarafına  $1 \mu\text{g/ml}$ 'den 0'a değişmektedir. Bu miktarlar penisilin için süper ve subinhibitör konsantrasyonlarını kapsamaktadır (Şekil 2).



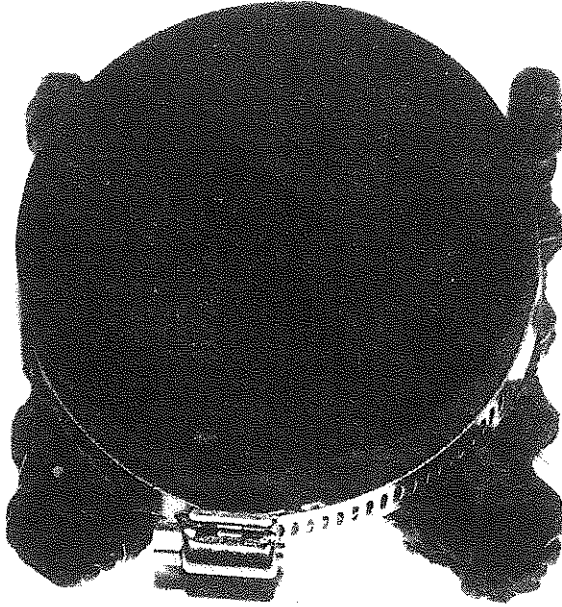
Şekil 1- Şematik olarak penisilin-gradient plağı.



Şekil 2- Penisilin miktarı 0-1  $\mu\text{g/ml}$  olacak şekilde hazırlanmış olan penisilin-gradient plağının şematik olarak gösterilmesi.



Resim 1- Kadife kalıp hazırlanmasında kullanılan gereçler (12 cm çapındaki Petri kutusuna rahatlıkla uygulanabilecek boyutlarda hazırlanmıştır).



Resim 2- Streptokokların penisilin-gradient plağından replika plağına aktarılmasında kullanılan kadife kalıp.

### **İn-vitro olarak penisilin toleransının araştırılması:**

Streptokoklar, logaritmik faz kültürleri emdirilmiş olan ucu pamuklu eküvyonlarla, penisilin gradientinin eksenine paralel olmak üzere, penisilin konsantrasyonunun düşük olduğu taraftan yüksek olduğu tarafa doğru, çizgi halinde, bir plağa 4 suş olmak üzere transfer edilmiştir. 24 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra organizmalar steril kadife bir kalıp yardımıyla (Resim 1, 2), penisilinsiz % 5'lik koyun kanlı agara (Replika plate) olduğu gibi aktarılmış ve 48 saat 37°C'de inkübe edilmiştir. Toleran suşların penisilin-gradient plağında sadece subinhibitör konsantrasyonlarda üremesi ya da hiç ürememesine karşın transfer edildikleri replika plaklarda, gradient plaktaki süperinhibitör konsantrasyonlara uygun gelen bölgelerde üremesi beklenmiştir.

### **MBC/MIC oranının belirlenmesi:**

İncelenmeye alınan 20 AGBHS suşunun MIC ve MBC değerleri tüp sulandırım yöntemiyle saptanmıştır (15). MIC, gözle görülen üremeyi önleyen en düşük penisilin konsantrasyonu olarak belirlenmiştir. MBC için bulanıklık göstermeyen tüplerden 50'şer µl alınarak koyun kanlı agara pasaj yapılmış, 37°C'de bir gece inkübe edilmiştir. Üreme göstermeyen en düşük sulandırım, MBC olarak değerlendirilmiştir.

## **BULGULAR**

İncelenen 20 AGBHS suşundan hiçbirinde, kullanılan her iki yöntemle de penisilin toleransına rastlanmamıştır. MBC değeri 0.04 µg/ml bulunan bir suş dışında tüm suşlar için penisilin MIC ve MBC değerleri 0.02 µg/ml bulunmuştur. Bu suşlar, daha önce disk difüzyon yöntemiyle yapılan duyarlılık testlerinde de penisiline duyarlı bulunmuştu (18).

Tablo 1. 4 ayrı çalışmada AGBHS'lar için elde edilen penisilin MIC ve MBC değerleri (µg/ml).

Kaynak No	MIC (sınırlar)	MBC (sınırlar)
4	0.50 - 0.0000625	4 - 0.000125
5	0.02	0.04
8	0.01 - 0.02	0.02 - 10
14	0.008 - 0.015	0.015 - 0.06

## **TARTIŞMA**

Penisilin toleransı ya da üremeyi inhibe eden penisilin konsantrasyonlarının streptokokları öldürememesi, bazı hastaların tedavisindeki başarısızlığın nedeni olarak gösterilmiştir. Ancak toleransın klinik önemi bilinmemektedir.

Kim ve Kaplan (14), penisilinle tedavisi başarısız olan hastalardan elde ettikleri AGBHS suşlarının % 25'inin penisiline toleran olduğunu,

halbuki tedavisi başarılı olan hastalardan izole ettikleri suşların hiçbirinde toleransa rastlamadıklarını bildirmişlerdir. Grahn ve arkadaşları (8), klinik olarak iyileşmeyen 18 hastadan izole ettikleri 18 suşun 11'inin penisiline toleran olduğunu, tedavisi başarılı olanlardan izole ettikleri suşların hiçbirinde tolerans görülmediğini bildirmişlerdir. Her iki araştırmanın sonucunda tedavi başarısızlığının bir nedeninin penisilin toleransı olabileceği öne sürülmüştür. Halbuki Feldman ve arkadaşları (5), tedavi başarısızlığının toleransla ilgisi olmadığını bildirirken Smith ve arkadaşları (17), tedavisi başarılı ve başarısız olan çocuklardan izole ettikleri suşlarda aynı oranda penisilin toleransı saptamışlar ve AGBHS'ların penisilinle eradike edilemeyeşinin nedenlerinin karmaşık olduğu, toleransla izah edilemeyeceği sonucuna varmışlardır.

Tolerans genellikle MBC/MIC oranının belirlenmesiyle tanımlanmaktadır. Ancak elde edilen MIC ve MBC değerleri laboratuvar dan laboratuvara birçok nedenle (inokulum miktarı, inokule edilen organizma sayısı, kültürün üreme fazı, kullanılan besiyeri) değişmektedir (12). Tablo 1'de 4 farklı çalışmada elde edilen MIC ve MBC değerleri gösterilmiştir. Kim ve Anthony (13) MBC/MIC yönteminin bu yönlerini dikkate alarak gradient-replika plate yöntemini geliştirmişler ve bu yöntemin uygulanması kolay ve güvenilir olduğunu bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamız, tedavi kontrollü bir çalışma olmayıp, laboratuvar izolasyonlarına dayalı bir çalışmadır. Bu nedenle penisiline tolerans göstermeyen ve son derece duyarlı olan bu suşların penisilin tedavisinden sonra eradike edilip edilmedikleri hakkında bilgi sahibi değiliz. Aynı şekilde, laboratuvar izolasyonlarına dayalı bir çalışmada Ergüven ve arkadaşları (4), incelendikleri 40 AGBHS suşunun 5'inde penisilin toleransı olduğunu bildirmişlerdir.

Gradient-replika plate yönteminin, MBC/MIC yöntemine kıyasla yapılmasının kolay olması, laboratuvar dan laboratuvara farklı sonuç elde edilmesine neden olacak faktörlerin bulunmaması bakımından, tolerans araştırmalarında rahatlıkla kullanılacak bir yöntem olduğunu söyleyebiliriz. Ancak bizim toplumumuzdan izole edilen AGBHS'larda penisilin toleransına ilişkin daha fazla bilgi edinebilmek için, daha çok sayıda suş içeren, tedavi öncesi ve sonrası izole edilen suşların inceleneceği daha geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

#### KAYNAKLAR

- 1- Bisno A L: *Streptococcus pyogenes*, "G L Mandel, R G Douglas Jr, J E Bennet (eds): *Principles and Practice of Infectious Disease*, 2. baskı" kitabında s. 1124, John Willey Med Publ, NewYork (1985).
- 2- Brook I: The role of beta-lactamase-producing bacteria in the persistence of streptococcal tonsillar infection, *Rev Infect Dis* 6: 601 (1984).
- 3- Brook I: Treatment of patients with acute recurrent tonsillitis due to group A beta-hemolytic streptococci: A prospective randomized study comparing penicillin and amoxycillin/clavulanate potassium, *J Antimicrob Chemother* 24: 227 (1989).

- 4- Ergüven S, Çerikçiođlu N, Arıkan S, Berkman E: Beta-hemolitik streptokoklarda penisilin toleransı, XXIV. *Türk Mikrobiyoloji Kongresi*, Özet kitabı s.40 (1990).
- 5- Feldman S, Bisno A L, Lott L, Dodge R, Jackson R E: Efficacy of benzathine penicillin G in group A streptococcal pharyngitis: Reevaluation, *J Pediatr* 110: 783 (1987).
- 6- Gastanaduy A S, Kaplan E L, Huwe B B, Mc Kay C, Wannamaker L W: Failure of penicillin to eradicate group A streptococci during an outbreak of pharyngitis, *Lancet* 2: 498 (1980).
- 7- Gerber M A, Randolph M F, Chantry J C, Wright L L, Anderson L R, Kaplan E L: Once daily therapy for streptococcal pharyngitis with cefadroxil, *J Pediatr* 109: 531 (1986).
- 8- Grahn E, Holm S E, Roos K: Penicillin tolerance in beta-streptococci isolated from patients with tonsillitis, *Scand Infect Dis* 19: 421 (1987).
- 9- Green J L, Ray S P, Charney E: Recurrence rate of streptococcal pharyngitis related to oral penicillin, *J Pediatr* 75: 292 (1969).
- 10- Howard B, Ducate M J: Streptococci "B J Howard, J Klass II, S J Rubin, A S Weissfeld, R C Tilton (eds): *Clinical and Pathogenic Microbiology*" kitabında s. 245, C V Mosby Co, St. Louis (1987).
- 11- Kaplan E, Johnson D R: Eradication of group A streptococci from the upper respiratory tract by amoxycillin with clavulanate after oral penicillin V treatment failure, *J Pediatr* 113: 400 (1988).
- 12- Kim K S: Clinical perspectives on penicillin tolerance, *J Pediatr* 112: 509 (1988).
- 13- Kim K S, Anthony B F: Use of penicillin-gradient and replicate-plates for the demonstration of tolerance to penicillin in streptococci, *J Infect Dis* 148: 488 (1983).
- 14- Kim K S, Kaplan E L: Association of penicillin tolerance with failure to eradicate group A streptococci from patients with pharyngitis, *J Pediatr* 107: 681 (1985).
- 15- National Committee for Clinical Standards: *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically: Approved Standard*, NCCLS Publication M 7-a, Villanova (1985).
- 16- Peterson L R, Denny A E, Gerding D N, Hall H W: Determination of tolerance to antibiotic bactericidal activity on Kirby-Bauer susceptibility plates, *Am J Clin Pathol* 74: 645 (1980).
- 17- Smith T D, Huskins W C, Kim K S, Kaplan E L: 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).
- 18- Türet S, Karabiber N: A grubu beta-hemolitik streptokoklarda penisilin ve eritromisin duyarlılığı, *ANKEM Derg* 4: 202 (1990).