

İSTANBUL'DA ÇOCUK HASTALARDAN İZOLE EDİLEN STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE SUŞLARINDA PENİSİLİN DİRENCİ ARANMASI*

Betigül ÖNGEN, Arif KAYGUSUZ, Müge ÖZALP,
Nezahat GÜRLER, Kurtuluş TÖRECİ

ÖZET

Çocuk hastalardan izole edilen 49 *S.pneumoniae* suşunda penisilin direnci 1 µg oksasiline diski ile araştırılmıştır. Oksasiline dirençli olan 21 suş için penisilin minimal inhibitör konsantrasyonu *Haemophilus* Test Medium'da tüpte dilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Ondört suş (% 29) penisiline rölatif dirençli olarak bulunmuş, gerçek dirençli suşa rastlanmamıştır.

SUMMARY

Search for penicillin resistance in Streptococcus pneumoniae strains isolated from pediatric patients in Istanbul.

Penicillin resistance of 49 *S.pneumoniae* strains isolated from children were screened with 1 µg oxacillin disk. Minimal inhibitory concentrations of penicillin for 21 oxacillin resistant strains were determined by the tube dilution method in *Haemophilus* Test Medium. Fourteen (29 %) strains were classified as relatively resistant. Fully resistant strain was not encountered.

GİRİŞ

Streptococcus pneumoniae insanlarda önemli morbidite ve mortalite nedeni olan, bakteriyel pnömonide en sık, meninjit, bakteriyemi, sinüzit, bronşit ve otitis mediada ise sıklıkla etken olarak izole edilen önemli bir patojendir (2, 14). Penisilin klinikte kullanılmaya başlanmasından sonra uzun yıllar *S.pneumoniae* suşları penisiline duyarlı bulunurken, 1970'li yıllarda nadir de olsa penisiline dirençli pnömokok suşları bildirilmeye başlanmış ve özellikle 1980'li yıllardan itibaren giderek artan sıklıkta penisiline dirençli pnömokoklardan söz edilir olmuştur (1, 11). Penisilin direnci ile birlikte diğer antibiyotiklere direncin de giderek yaygınlaşması (11), önümüzdeki yıllarda antibiyotiklere dirençli pnömokokların giderek önemli bir sorun olacağına habercisidir ve pnömokok infeksiyonlarında yıllarca etkili ve güvenli şekilde kullanılan penisiline karşı alternatif tedavi şemalarının oluşturulması kaçınılmaz görünmektedir.

Halen penisiline dirençli pnömokok suşları İspanya'da % 44, Macaristan'da %58, İsrail ve Japonya'da % 28, Romanya'da % 25, Fransa'da % 13 (1), Brezilya (20) ve Suudi Arabistan'da (21) % 19 gibi yüksek oranlardadır. Bölgelere göre farklılık olmakla birlikte İngiltere ve Amerika Birleşik Devletleri 'nde direnç oranı halen % 5'in altındadır (1, 4).

* 9. Türkiye Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresinde sunulmuştur (19-25 Haziran 1994, Ürgüp).
İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çapa, İstanbul.

Dirençli suşların giderek yayılmaları nedeniyle infeksiyon etkeni olarak izole edilen *S.pneumoniae* suşlarında penisilin direncinin araştırılması gerekmektedir.

Bu çalışmada, ülkemizde pnömokoklarda penisilin direncini araştıran çalışmaların azlığı nedeniyle, klinik örneklerden izole edilen pnömokok suşlarında penisilin direnci araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Laboratuvarımıza 4.10.1993 - 18.11.1994 tarihleri arasında gönderilen çeşitli klinik örneklerden üretilen 49 *S.pneumoniae* suşunda, % 5 koyun kanlı triptik soy veya Mueller-Hinton agarda 1 µg oksasilin (Oxoid) diski ile penisilin direnci araştırılmıştır (4). *S.aureus* ATCC 29213 kontrol suşu olarak kullanılmıştır, 20 mm veya daha büyük inhibisyon zonu oluşturanlar, penisiline duyarlı olarak kaydedilmiştir. 20 mm'den küçük inhibisyon zonu oluşturan suşlar, minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) bakılmak üzere % 15 gliserin içeren *Brucella* buyyonunda -20 °C'de dondurularak saklanmışlardır. Bu suşlarda penisilin MİK'u kanlı jelozda iki kez pasajdan sonra elde edilen saf kültürlerinden, *Haemophilus* Test Medium (HTM)'da tüpte dilüsyon yöntemi ile saptanmıştır. *E.faecalis* ATCC 29212 (MİK: 1-4 µg/ml), oksasilin diski ile penisiline duyarlı bulunan bir pnömokok suşu (MİK ≤ 0.06 µg/ml) ve ilk çalışılan grupta MİK'u 0.12 µg/ml bulunan bir pnömokok suşu, her deney sırasında kontrol suşları olarak kullanılmışlardır. Elde edilen MİK değerleri NCCLS standartlarına göre yorumlanmıştır (4).

BULGULAR

Balgamdan 19, burun salgısından 18, beyin omurilik sıvısından 5, boğaz salgısından 3, göz salgısından 2, kandan 1 ve torasentez sıvısından 1 olmak üzere toplam 49 *S.pneumoniae* suşu izole edilmiştir.

Suşların 28'i (% 57) oksasiline duyarlı bulduklarından penisiline de duyarlı kabul edilmiştir (4). Oksasiline dirençli bulunan 21 suşun (% 43) 14'ünde penisilin MİK'u 0.12-1.0 µg/ml, diğer 7 suşta ise ≤0.06 µg/ml bulunmuştur. Buna göre rölatif penisilin direnci 14/49 (% 29) olarak saptanmıştır. Penisiline gerçek dirençli suş saptanmamıştır. Oksasilin diski ile penisiline dirençli bulunan suşların 7/21 (% 33)'i ise penisiline duyarlı bulunmuştur (Tablo).

Rölatif dirençli suşların yedisi balgamdan, üçü burun salgısından, ikisi boğaz salgısından, biri beyin omurilik sıvısından, biri de göz salgısından izole edilmiştir.

Tablo. Oksasilin diski (1 µg) ve penisilin MİK'u ile penisilin direnci.

	Sayı	(%)
Oksasilin diski ile		
Duyarlı (≥ 20 mm)	28	(57)
Dirençli (≤ 19 mm)	21	(43)
Penisilin MİK'u ile		
Duyarlı (MİK ≤ 0.06 µg/ml)	7	
Rölatif dirençli (MİK 0.12 - 1.0 µg/ml)	14	(29)
Gerçek dirençli (MİK ≥2.0 µg/ml)	0	

TARTIŞMA

Penisilinin MİK'u ≥ 0.06 $\mu\text{g/ml}$ olan pnömokok suşları penisiline duyarlı, 0.12-1.0 $\mu\text{g/ml}$ olanlar penisiline orta derecede veya rölatif dirençli, 2.0 $\mu\text{g/ml}$ veya daha yüksek olan suşlar ise yüksek derecede veya gerçek dirençli suş olarak tanımlanmaktadır (2, 4). Direncin bu şekilde tanımlanması tedavide seçilecek stratejiyi belirler. Orta derecede dirençli suşlara meninjit dışındaki infeksiyonlarda yüksek dozda (parenteral) penisilin uygulaması etkili olurken, beyin omurilik sıvısında antibiyotik konsantrasyonunun rölatif olarak düşük olması nedeniyle, bu suşlarla oluşan meninjit olgularında penisilinle tedavi sağlanamamaktadır. Gerçek dirençli suşlarla oluşan tüm infeksiyonlarda penisilin etkisizdir ve penisilin türevi antibiyotikler (ampisilin, azlosilin, mezlosilin, piperasilin, oksasilin), 1. ve 2. kuşak sefalosporinlerin tümü, 3. kuşak sefalosporinlerden sefotaksim, seftriakson gibi bazıları dışındakilerin çoğu in-vitro koşullarda artmış MİK değerleri gösterdiklerinden tedavide önerilmezler (2, 4, 12, 19, 24).

Pnömokoklarda beta-laktamaz aktivitesi gösterilmemiştir ve penisilin direnci bakteri hücre duvarı sentezinde rol alan penisilin bağlayan proteinlerdeki (PBP) değişiklik sonucu penisilinin bu proteinlere afinitesinin azalması ile oluşmaktadır. Pnömokoklardaki penisilin direncinin yakın streptokok cinslerinden transformasyon ve rekombinasyon sonucu ortaya çıktığı sanılmaktadır (5, 11, 12, 23). İn-vitro koşullarda streptokok türlerinin pnömokoklara penisilin direncini aktarabileceği gösterilmiştir (3, 5). Penisiline dirençli suşlarda, duyarlı suşlarda genellikle saptanan altı değişik PBP'den (PBP 1a, PBP 1b, PBP 2x, PBP 2a, PBP 2b ve PBP 3) PBP 1a, PBP 2b ve PBP 2x'de sıklıkla değişiklik saptanmaktadır ve sadece PBP 2x'de değişiklik saptanan suşlar, oksasiline dirençli iken penisiline duyarlı olabilmektedirler (5, 22).

Mason ve ark (16) oksasilin diski ile *S.pneumoniae* suşlarının % 44 oranında yanlış şekilde penisiline dirençli bulunabileceğini bildirmişlerdir. Tunçkanat ve ark (27) metisilin diski ile suşların % 21 - 25 kadarının yanlış şekilde penisiline dirençli saptanabileceğini belirtmişlerdir. Penisilin direncinin düşük olduğu yerlerde oksasilin diski ile tarama testlerinin pozitif tahmin gücü (positive predictive value) oldukça düşer. Örneğin penisilin direncinin % 3 dolayında olduğu Amerika'da oksasilin diski ile dirençli bulunan suşların ancak % 25'i penisiline dirençli bulunmuştur (4). Bundan başka oksasilin diski dirençli suşlarda direncin derecesini de saptayamamaktadır (4). Bu eksikliklerine karşın oksasiline duyarlı bulunan suşların tümünün penisiline duyarlı bulunması testin daha az sayıda suşta MİK bakılmasını sağlayan yararlı yanını oluşturmaktadır (4). Çalışmamız, oksasilin diski ile suşların % 33'ünün yanlış şekilde penisiline dirençli bildirilebileceğini göstermektedir. Bu nedenle oksasiline dirençli bulunan suşlarda, penisilin direnci ve derecesi dilüsyon testleri ile araştırılmalıdır.

MİK saptanmasında % 5 koyun kanlı Mueller-Hinton besiyeri ile agar dilüsyonu, katyonu ayarlı Mueller-Hinton buyyonuna % 2 - 5 oranında hemoliz edilmiş at kanı ilavesi ile hazırlanan besiyeri veya *Haemophilus* Test Medium ile dilüsyon testleri yapılmaktadır (4, 14). Önceleri NCCLS tarafından da önerilen HTM ile MİK saptanmasında bazı problemler oluşabilmektedir. Örneğin Marshall

ve ark (14) hemoliz edilmiş at kanlı besiyerinde üreyen suşların % 14'ünün bulanıklık oluşturacak kadar ürememeleri nedeniyle HTM besiyerinde MİK'lerinin saptanamadığını, ayrıca HTM besiyerinde bazı penisiline yüksek düzeyde dirençli suşların orta derecede dirençli veya orta derecede dirençli suşların duyarlı olarak saptandığını bildirmişlerdir. Çalışmamızda 4 suşun MİK'u üreme olmaması nedeniyle tekrarlanarak ve inkübasyon süresi 24 saate tamamlanarak saptanabilmiştir. NCCLS'in son önerisi pnömokoklarda tüm antibiyotiklerin MİK'unun sadece hemolizli at kanı içeren besiyerinde mikrodilüsyon yöntemi ile bakılması şeklindedir (25). Ticari olarak sağlanan kitlerin penisilin ve sefalosporin direncini saptamada yetersiz kalabileceği belirtilmektedir (8). Bazı antibiyotikler için disk diffüzyon testi ile standartlar oluşturulmuştur ve duyarlılık deneyleri bu antibiyotikler için disk diffüzyon testi ile yapılabilir (11). Üçüncü kuşak sefalosporinler için disk diffüzyon testi ile henüz standardizasyon oluşturulamamıştır (7, 26). Disk diffüzyon testi gibi uygulaması kolay ve MİK saptanmasına olanak sağlayan E testi pnömokoklarda penisilin ve sefalosporin direnci araştırılması için kullanılmaktadır (10, 13). Çalışmamızda gerçek penisilin direncine rastlanmamasına rağmen % 29 oranında rölatif direnç saptanmıştır. Ülkemizde konu ile ilgili iki çalışma bulabildik. Bu çalışmalardan birinde Tunçkanat ve ark (27) agar dilüsyon yöntemi ile Ankara'da *S.pneumoniae* suşlarında rölatif penisilin direncini % 26, gerçek direnci % 7 olarak bildirmişlerdir. Araştırmacılar erişkin hastalardan izole edilen suşlarda gerçek dirence rastlanmazken, rölatif direnci % 23 olarak, çocuk hastalardan izole edilen suşlarda ise gerçek direnci % 21, rölatif direnci ise % 33 olarak saptamışlardır. Yine Ankara'da Gür ve ark (9) pnömokok suşlarında rölatif direnci % 30, gerçek direnci % 17 olarak bulmuşlar ayrıca suşların % 7'sinin sefotaksime, % 8'inin kloramfenikole, % 11'inin eritromisine, % 27'sinin kotrimoksazole dirençli olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmalar ülkemizde izole edilen *S.pneumoniae* suşlarında penisiline direnç oranının oldukça yüksek olduğunu ve suşlarda rutin olarak penisilin direncinin araştırılması ve bu konuda çalışmalara devam edilmesinin gereğini ortaya koymaktadır.

Penisiline dirençli pnömokoklar yanında çoğul dirençli -üç veya daha fazla antibiyotik sınıfına dirençli- pnömokok suşları da giderek artmaktadır. Örneğin Güney Afrika'da izole edilen suşların % 16 - 60 kadarı çoğul dirençli bulunmaktadır (1, 2, 11). Macaristan'da penisiline dirençli suşların % 70'i aynı zamanda tetrasiklin, eritromisin ve kotrimoksazole, % 36 kadarı da kloramfenikole dirençli bulunmaktadır (15). İspanya'da da çoğul dirençli suşlar yüksek orandadır ve diğer ülkelerden de giderek artan sıklıkta çoğul dirençli suşlar bildirilmektedir. Moleküler düzeyde yapılan çalışmalar çoğul dirençli suşların ülkeler hatta kıtalar arasında yayılabileceğini göstermektedir (17, 18, 23, 29). Çoğul dirençli suşların önemli bir bölümü penisiline ve penisiline alternatif olabilecek makrolidler, tetrasiklin ve kotrimoksazole de dirençlidirler. Bu durum tedavide önemli problemler yaratmaktadır (11). Son yıllarda penisiline dirençli pnömokoklar için önemli bir seçenek haline gelen bazı 3. kuşak sefalosporinlere dirençli pnömokok suşları da bildirilmektedir (8, 9).

Bugüne dek vankomisine dirençli pnömokok bildirilmediğinden penisiline dirençli suşlarla oluşan ciddi infeksiyonlarda, vankomisin ilk seçenek olarak önerilmektedir (2, 8, 11). Meninjitte rifampisin ile kombinasyonunu önerenler de bulunmaktadır (2, 28). Vankomisinin bazen penisiline duyarlı suşlarla oluşan meninjitte etkisiz kalabileceği (28), bu nedenle duyarlı bulduklarında, daha az toksik, beyin omurilik sıvısına daha iyi geçebilen sefotaksim veya seftriaksonun meninjitte yeğlenebileceğini savunanlar da bulunmaktadır (8, 12). Duyarlı bulunduğu kloramfenikol de kullanılabilir. Kloramfenikol tedavisine yanıt vermeyen meninjit olguları da bildirilmiştir (2, 11). İn-vitro oldukça etkili bulunan bazı kinolonlar ve imipenemin tedavideki yeri konusunda klinik veriler yetersizdir (2). En uygun tedavi şeklinin bulunabilmesi için in-vitro ve klinik çalışmalar yürütülmektedir (6, 8, 12, 19, 24).

KAYNAKLAR

1. Appelbaum PC: Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: An overview. *Clin Infect Dis* 15: 77 (1992).
2. Caputo GM, Appelbaum PC, Liu HH: Infections due to penicillin-resistant pneumococci. *Arch Intern Med* 153: 1301 (1993).
3. Chalkley LJ, Koornhof NJ: Intra and inter-specific transformation of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin resistance. *J Antimicrob Chemother* 26: 21 (1990).
4. Doern GV, Jones RN: Antimicrobial susceptibility tests: Fastidious and unusual bacteria. "A Balows, WJ Hausler, K Herrmann Jr, HD Isenberg, HJ Shadomy (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, 5. baskı" kitabında s.1126, Am Soc Microbiol, Washington (1991).
5. Dowson CG, Johnson AP, Cercenado E, George RC: Genetics of oxacillin resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* that are oxacillin resistant and penicillin susceptible. *Antimicrob Agent Chemother* 38: 49 (1994).
6. Friedland IR, Paris M, Ehrett S, Hickey S, Olsen K, McCracken Jr GH: Evaluation of antimicrobial regimens for treatment of experimental penicillin- and cephalosporin-resistant pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 1630 (1993).
7. Friedland IR, Shelton S, McCracken GH: Screening for cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* with Kirby-Bauer disk susceptibility test. *J Clin Microbiol* 32: 274 (1994).
8. Friedland IR, Shelton S, Paris M, Rinderknecht S, Ehreet S, Krisher K, McCracken Jr GH: Dilemmas in diagnosis and management of cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* meningitis. *Pediatr Infect Dis J* 12: 196 (1993).
9. Gür D, Tunçkanat F, Şener B, Berkman E, Özkuyumcu C, Kanra G, Akalın HE: Resistance in *S.pneumoniae* to various antibiotics in Turkey. *Symposium on Infections due to Gram-positive Cocci*, Ankara, 25-28 August (1993).
10. Jorgensen JH, Ferraro MJ, McElmeel ML, Spargo J, Swenson JM, Tenover FC: Detection of penicillin and extended-spectrum cephalosporin resistance among *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates by use of the E test. *J Clin Microbiol* 32: 159 (1994).
11. Klugman KP: Pneumococcal resistance to antibiotics. *Clin Microbiol Rev* 3: 171 (1990).
12. Linares J, Alonso T, Pérez JL, Ayats J, Dominigucz MA, Pallarés R, Martín R: Decreased susceptibility of penicillin-resistant pneumococci to twenty-four beta-lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 30: 279 (1992).

13. Macias EA, Mason Jr EO, Ocera HY, LaRocco MT: Comparison of E test with standart broth microdilution for determining antibiotic susceptibilities of penicillin-resistant strains of *Streptococcus pneumoniae*, *J Clin Microbiol* 32: 430 (1994).
14. Marshall KJ, Musher DM, Watson D, Mason Jr EO: Testing of *Streptococcus pneumoniae* for resistance to penicillin, *J Clin Microbiol* 31: 1246 (1993).
15. Marton A, Gulyas M, Munoz R, Tomasz A: Extremely high incidence of antibiotic resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Hungary, *J Infect Dis* 163: 542 (1991).
16. Mason Jr EO, Kaplan SL, Lamberth LB, Tillman J: Increased rate of isolation of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in a children's hospital and in vitro susceptibilities to antibiotics of potential therapeutic use, *Antimicrob Agents Chemother* 36: 1703 (1992).
17. McDougal LK, Facklam R, Reeves M, Hunter S, Swenson JM, Hill BC, Tenover FC: Analysis of multiply antimicrobial-resistant isolates of *Streptococcus pneumoniae* from the United States, *Antimicrob Agents Chemother* 36: 2176 (1992).
18. Munoz R, Coffey TJ, Daniels M, Dowson CG, Laible G, Casal J, Hakenbeck R, Jacobs M, Musser JM, Spratt BG, Tomasz A: Intercontinental spread of multiresistant clone of serotype 23F *Streptococcus pneumoniae*, *J Infect Dis* 164: 302 (1991).
19. Neal TJ, O'Donoghue MAT, Ridgway EJ, Allen KD: In vitro activity of ten antimicrobial agents against penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*, *J Antimicrob Chemother* 30: 39 (1992).
20. Sessegolo JF, Levin ASS, Levy CE, Asensi M, Facklam RR, Teixeira LM: Distribution of serotypes and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated in Brazil from 1988 to 1992, *J Clin Microbiol* 32: 906 (1994).
21. Shibl AM, Hussein SS: Surveillance of *Streptococcus pneumoniae* serotypes in Riyadh and their susceptibility to penicillin and other commonly prescribed antibiotics, *J Antimicrob Chemother* 29: 149 (1992).
22. Smith AM, Klugman KP, Coffey TJ, Spratt BG: Genetic diversity of penicillin-binding protein 2B and 2x genes from *Streptococcus pneumoniae* in South Africa, *Antimicrob Agents Chemother* 37: 1938 (1993).
23. Soares S, Kristinsson KG, Musser JM, Tomasz A: Evidence for the introduction of a multiresistant clone of serotype 6B *Streptococcus pneumoniae* from Spain to Iceland in the late 1980s, *J Infect Dis* 168: 158 (1993).
24. Spangler SK, Jacobs MR, Pankuch GA, Appelbaum PC: Susceptibility of 170 penicillin-susceptible and penicillin-resistant pneumococci to six oral cephalosporine, four quinolones, desacetylcefotaxime, Ro 23-9424 and RP 67829, *J Antimicrob Chemother* 31: 273 (1993).
25. Temashiro L: Broth microdilution MIC testing, "HD Isenberg (ed): *Clinical Microbiology Procedures Handbook*" kitabında 1. cilt 5. bölüm (5.2.1), (Supplement 1-1994), Am Soc Microbiol, Washington (1992).
26. Tenover FC, Swenson J: Cefuroxime screening test for pneumococci, *J Clin Microbiol* 31: 3078 (1993).
27. Tunçkanat F, Akan Ö, Gür D, Akalın HE: *Streptococcus pneumoniae* suşlarında penisilin direnci, *Mikrobiyol Bült* 26: 307 (1992).
28. Viladrich PF, Gudiol F, Linares J, Pallares R, Sobate I, Rufi G, Arza J: Evaluation of vancomycin for therapy of adult pneumococcal meningitis, *Antimicrob Agents Chemother* 35: 2467 (1991).
29. Watson DA, Musher DM, Jacobson JW, Verhoef J: A brief history of the pneumococcus in biomedical research: A panoply of scientific discovery, *Clin Infect Dis* 17: 913 (1993).