STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE SUŞLARINDA PENİSİLİN DUYARLILIĞININ ARAŞTIRILMASI

INVESTIGATION OF PENICILLIN SUSCEPTIBILITIES OF STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE STRAINS

Cengiz ÇAVUŞOĞLU, Mine HOŞGÖR*, Alper TÜNGER**
*Mehmet Ali ÖZİNEL**

ÖZET: Çeşitli klinik örneklerden soyutlanan 84 pnömokok suşunun penisilin direnci agar dilüsyon ve disk difüzyon (1 µg'lık oksasilin diski ile); seftriakson direnci agar dilüsyon; eritromisin, kloramfenikol ve tetrasiklin direnci ise disk difüzyon yöntemi ile araştırıldı. Seftriakson ve kloramfenikole dirençli suş saptanamazken, biri (% 1.1) yüksek, 26'sı (% 30.9) düşük düzeyde olmak üzere 27 (% 32) suşta penisilin; 11 (% 13) suşta tetrasiklin, üç (% 3.6) suşta eritromisin ve üç (% 3.6) suşta da çoklu direnç (eritromisin, tetrasiklin, penisilin) belirlendi. Disk difüzyon yöntemi ile oksasiline dirençli bulunan suşların tümünde agar dilüsyon ile penisilin direnci de saptandı. Penisilin direnci saptanan 21 suşun serotip araştırması yapıldı. Beş suş serotip 6, iki suş serotip 14, üç suş serotip 19 olarak saptanırken, 11 suş tiplendirilemedi.

Anahtar kelimeler: S. pneumoniae, penisilin duyarlılığı.

SUMMARY: In this study, in vitro activities of penicillin, ceftriaxone, erythromycin, chloramphenicol and tetracycline were tested against 84 strains of Streptococcus pneumoniae isolated from various clinical specimens. In vitro penicillin and ceftriaxone susceptibilities were determined by agar dilution, while erythromycin, chloramphenicol and tetracycline susceptibilities were determined by disk diffusion techniques according to the NCCLS guidelines. Also penicillin resistance was detected by the 1 µg oxacillin screening test. Low-level resistance to penicillin was found 26 strains (30.9%) while only one isolate (1.1%) had high-level. All of oxacillin-resistant strains also were found to be resistant to penicillin, and all isolates tested were susceptible to ceftriaxone and chloramphenicol. Of 84 strains, 11 (13%) were resistant to tetracycline, 3 (3.6%) were resistant to erythromycin and 3 (3.6%) has shown multiple antibiotic resistance (resistant

* Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

Geliş Tarihi: 28.4.1997 Kabul Ediliş Tarihi: 23.7.1997

to penicillin, tetracycline and erythromycin). Twenty-one strains of 27 penicillin-resistant S. pneumoniae were serotyped and five were found serotype 6, three were serotype 19 and, two were serotype 14. Other 11 isolates of S. pneumoniae were not serotyped by the antisera used in the study.

Key words: S. pneumoniae, penicillin susceptibility.

GİRİŞ

Pnömokoklar, normalde üst solunum yolu florasının bir parçası olmamalarına karşın, sağlıklı çocuklardan % 30 - % 40, sağlıklı yetişkinlerden ise % 5 - % 10 oranında soyutlanabilmektedir[1-3]. Nazofarinkste kolonize olup, direkt yayılım ile orta kulak, sinüsler, trakea, bronşlar ve akciğerlerde; hematojen yayılım ile santral sinir sistemi, kalp kapakları, kemikler, eklemler ve periton boşluğunda enfeksiyonlara neden olurlar[2, 4].

Klinik kullanıma girdiği dönemlerde penisilin için oldukça düşük düzeylerde minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerleri saptanan pnömokoklarda penisilin direnci ilk kez 1967 yılında Avusturalya'da gösterilmiştir[4, 5]. Son yıllarda da dünyanın çeşitli bölgelerinden gittikçe artan oranlarda penisilin direnci bildirilmektedir[4]. Direnç, değişmiş penisilin bağlayan protein (PBP) kodlayan kromozomal genlerin aracılığı ile olur ve bir bakteriden diğerine transformasyon mekanizması ile aktarılır[4-6]. Direnç geninin aktarımı bir başka pnömokok suşundan olabileceği gibi penisiline dirençli başka bir bakteri türünden de olabilir[4, 7]. Pnömokoklarda sefotaksim direnci ilk kez 1989'da Asensi ve arkadaşları[8] tarafından bildirilmesine karşın, günümüzde geniş spektrumlu sefalosporin direnci için herkes tarafından kabul gören bir tanımlama yoktur[9]. Ayrıca transpozon aracılığı ile taşındığı düşünülen eritromisin, kloramfenikol ve tetrasiklin direnci uzun yıllardır bilinmektedir[5, 7]. En az üç farklı antibiyotik grubuna karşı gösterilen direnç çoklu direnç olarak tanımlanmakta ve tedavide önemli sorunlar yaratmaktadır[5, 10]. Tüm dünyada antibiyotik direnci gösteren pnömokok suşlarının hemen hepsinin serotip 6, 9, 14, 19 ve 23'e ait olduğu gösterilmiştir[11, 12]. Bu çalışmada, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda incelenen çeşitli klinik örneklerden soyutlanan pnömokok suşlarının penisilin, seftriakson, eritromisin, kloramfenikol ve tetrasiklin duyarlılıkları ve dirençli suşların kapsüler serotiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Ocak 1993-Ocak 1994 tarihleri arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda incelenen çeşitli klinik örneklerden soyutlanan 84 pnömokok suşu (36'sı balgam, yedisi BOS, altısı kulak, ikisi kan, biri göz, 32'si postnazal akıntı) çalışmaya alındı.

Klinik örneklerden üreyen α hemoliz yapan, optokine duyarlı, safrada çözünen Gram olumlu diplokok morfolojisindeki bakteriler Streptococcus pneumoniae olarak tanımlandı. Serotiplendirme için 11 antiserum içeren Pneumococcus antiserum seti (Difco) kullanıldı.

Penisilin direnci National Comittee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)[13] tarafından önerilen standartlara uyularak, agar dilüsyon yöntemi ile 4 µg/ml'den 0.06 µg/ml'ye kadar seri sulandırımlar yapılarak ve disk difüzyon metodu ile 1 µg oksasilin içeren diskler kullanılarak araştırıldı[12, 14-16]. Agar dilüsyon yönteminde MİK'i 0.1 µg/ml'den küçük olanlar duyarlı, MİK'i 0.1 µg/ml ile 1 µg/ml arasında olanlar düşük düzey dirençli, MİK'i 1 µg/ml'den büyük olan suşlar ise yüksek düzeyde dirençli olarak tanımlandı. Disk difüzyon yönteminde inhibisyon zonu 20 mm ve daha büyük olan suşlar penisiline duyarlı, 19 mm veya daha küçük olan suşlar dirençli olarak belirlendi. Seftriakson direnci NCCLS tarafından önerilen standartlara uyularak, agar dilüsyon yöntemi ile 2 µg/ml'den 0.12 µg/ml'ye kadar seri sulandırımlar yapılarak araştırıldı[13]. Agar dilüsyon yönteminde MİK'i 0.5 µg/ml'den küçük olanlar duyarlı, MİK'i 0.5 µg/ml ile 1 µg/ml arasında olanlar düşük düzey dirençli, MİK'i 1 µg/ml'den büyük olan suşlar ise dirençli olarak belirlendi. Kloramfenikol, eritromisin ve tetrasiklin direnci NCCLS tarafından kabul edilen kloramfenikol ve tetrasiklinin 30 µg'lık, eritromisinin ise 15 µg'lık diskleri kullanılarak disk difüzyon yöntemi ile araştırıldı[14]. Kloramfenikol için 12 mm ve altındaki, eritromisin için 13 mm ve altındaki, tetrasiklin için ise 14 mm altındaki zon çapları dirençli olarak kabul edildi.

Deneylerde kontrol suşu olarak S. pneumoniae ATCC 49619 kullanıldı.

BULGULAR

Bu çalışmada incelenen 84 S. pneumoniae suşundan disk difüzyon yöntemi ile (oksasilin tarama testi) penisiline duyarlı 57 suş bulunurken, 27 suş da dirençli olarak belirlendi. Daha sonra 84 S. pneumoniae suşunun penisilin direnci agar dilüsyon yöntemi ile araştırıldı. Oksasilin tarama testi ile dirençli bulunan tüm suşlar agar dilüsyon yöntemi ile de dirençli, duyarlı bulunan suşlar da aynı şekilde duyarlı olarak saptandı. Penisilin duyarlılık sonuçları Tablo I'de gösterilmiştir.

Tablo I

İncelenen 84 S. pneumoniae Suşunun Penisilin Duyarlılıkları

Duyarlılık	Sayı	%
Düşük düzey dirençli (MİK 0.1-1 µg/ml)	26	30.9
Yüksek düzey dirençli (MİK > 1 µg/ml)	1* (MİK = 2 µg/ml)	1.1
Toplam dirençli suş	27	32

* Balgamdan izole edilmiştir.

İncelenen suşların seftriakson, kloramfenikol, tetrasiklin, eritromisin ve çoklu direnç durumları Tablo II'de; penisiline dirençli olarak saptanan 21 suşun serotip dağılımları da Tablo III'de gösterilmiştir.

Tablo II

S. pneumoniae Suşlarının Seftriakson, Kloramfenikol, Eritromisin, Tetrasiklin ve Çoklu Antibiyotik Dirençleri (n = 84)

	Dirençli	
Antibiyotikler	Sayı	%
Seftriakson	0	0
Kloramfenikol	0	0
Eritromisin	3	3.6
Tetrasiklin	11	13
ÇAD*	3	3.6

* Çoklu antibiyotik direnci (eritromisin, tetrasiklin ve penisiline karşı direnç).

Tablo III

Penisilin Direnci Bulunan 21 S. pneumoniae Suşunun Serotip Dağılımı

Serotip	Sayı
6	5
14	2
19	3
Tiplendirilemeyen	11
Toplam	21

TARTIŞMA

Penisilin direncinin giderek yaygınlaşması, pnömokoklarla oluşan enfeksiyonların tedavisinde önemli bir sorundur. Bu nedenle pnömokoklarla oluşan ciddi enfeksiyonlarda, özellikle de menenjitlerde penisilin duyarlılığı ve duyarlılık düzeyinin belirlenmesi zorunludur. Çünkü duyarlı ve düşük düzey direnç gösteren suşların neden olduğu otit, sinüzit ve ağır olmayan pnömoni olguları penisilin ile başarıyla tedavi edilebilirken, menenjitli olgular penisilin tedavisine yeterli klinik yanıt vermemektedir. Ayrıca, yüksek düzey direnç gösteren suşlarla oluşan hiçbir pnömokoksik enfeksiyonda da penisilin kullanılamamaktadır[4].

Penisilin direnci araştırılırken tarama testi olarak 1 µg'lık oksasilin diski kullanılabilir. Son yıllarda sıkça bildirilen oksasiline dirençli, penisiline duyarlı suşların olması ve penisilin direncinin düzeyinin saptanamaması bu yöntemin oldukça önemli iki sorunudur[4]. Bu çalışmada oksasiline dirençli penisiline duyarlı suş bulunmamakla birlikte, Öngen ve arkadaşları[15], disk difüzyon yöntemi ile oksasiline dirençli buldukları 18 pnömokok suşundan dördünün agar dilüsyon yöntemi ile penisiline duyarlı olduklarını göstermişlerdir.

Tüm dünyada penisiline dirençli pnömokok suşlarının sayısı gün geçtikçe artmaktadır. Avrupa'da İspanya, dirençli suşların odağını oluşturmaktadır[5]. Türkiye'de ise Öngen ve arkadaşları[15], 41 S. pneumoniae suşu ile yaptıkları çalışmada düşük düzey penisilin direncini (DDPD) % 34 (14 suş) olarak bulmuşlar, yüksek düzey penisilin direnci (YDPD) gösteren suş saptamamışlardır. Gür ve arkadaşları[16] ise 70 S. pneumoniae suşu ile yaptıkları çalışmada DDPD'yi % 30 (21 suş), YDPD'yi % 17 (11 suş), sonuç olarak da penisilin direncini % 47 olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada incelenen pnömokok suşlarındaki DDPD oranı Türkiye'de yapılan diğer çalışmalarda elde edilen değerlerle benzer bulunmuştur. Gür ve arkadaşlarının[16] çalışmalarında % 17 olarak bulunan YDPD ise, suşların dirençli pnömokoklar ile kolonize olmaya eğilimli immünsüpresif çocuklardan elde edilmesine bağlı olabilir[5, 15].

Dünyanın çeşitli bölgelerinden diğer antibiyotiklere de her geçen gün artan oranlarda direnç bildirilmektedir. Türkiye'de Öngen ve arkadaşları[15] eritromisin ve kloramfenikole dirençli suş saptayamazken, Gür ve arkadaşları[16] eritromisin direncini % 11, kloramfenikol direncini ise % 6 olarak saptamışlardır. Aynı çalışmada yüksek düzey penisilin direnci saptanan 11 suştan ikisinin sefotaksim için MİK'i 0.5 µg/ml, diğer dokuzunun ise 0.5 µg/ml'den daha yüksek olarak saptanmıştır. Bu çalışmada saptanan eritromisin direnci % 3.6 gibi düşük oranlarda olmasına karşın, anlamlı olarak değerlendirilebilir. Çünkü İspanya ve Fransa'da yapılan çalışmalarda 1970'lerin sonlarına kadar eritromisine dirençli suşlar saptanmazken, makrolidlerin bu ülkelerde yoğun bir şekilde kullanıma girmesiyle eritromisine dirençli suşların sayısında dramatik bir artış gözlenmiştir[17, 18]. Türkiye'de yeni makrolidlerin 1980'lerin sonunda kullanıma girmesiyle ülkemizi de böyle bir sorunun beklediğini öngörmek mümkündür.

Bu çalışmada serotiplendirmesi yapılabilen penisiline dirençli 21 suşun 10'u serotip 6, 14 ve 19 olarak belirlenmiş, 11 suş ise tiplendirilememiştir. Tiplendirilemeyen suşların oran olarak çokluğu kullanılan antiserum setinin dirençli suşlarda sıkça rastlanan 9 ve 23'ü içermemesi ile açıklanabilir. Türkiye'de daha önce serotiplendirme araştırılan bir çalışma yapılmadığı için sonuçları kıyaslamak mümkün olmamıştır.

S. pneumoniae suşlarında saptanan penisilin direnci göz önüne alındığında, bizim toplumumuz için de pnömokoksik menenjitlerin ampirik tedavisinde penisilinin yeri olmadığı görülmektedir. Günümüzde pnömokoksik menenjitlerde suşun antibiyotik duyarlılığı saptanana kadar, tedavide seftriakson veya sefotaksim kullanılmasının uygun olacağı kabul edilen bir görüştür. Hatta son yıllarda artan sefalosporin direnci nedeniyle ampirik tedaviye vankomisin ve rifampisinin de eklenmesi önerilmektedir[4].

KAYNAKLAR

1. Gray BM, Converse GM, Dillon HC Jr: Epidemiologic studies of Streptococcus pneumoniae in infants: Acquisition, carriage and infection during the first 24 month of life. J Infect Dis, 1980, 142: 930-933.

2. Musher DM: Streptococcus pneumoniae, pp: 1811-1826. In Principles and Practice of Infectious Diseases Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, Dolin R (eds). 1995 Churchill Livingstone Inc.

3. Kobayashi GS, Pfaller MA, Rosenthal KE: Streptococcus and related gram positive bacteria, pp: 180-198. In Medical Microbiology. 1994. Mosby-Year Book Inc.

4. John RL, Antone AM: The growing threat of antibiotic-resistant Streptococcus pneumoniae. Medical Clinics of North America 1995, 79: 523-535.

5. Klugman KP: Pneumococcal Resistance to Antibiotics. Clin Microbiol Rev, 171-196, 1990.

6. Abigail A, Salyers and Dixie D (Eds). Streptococcus pneumoniae, pp: 322-331. In Bacterial Pathogenesis 1994, Whitt ASM PRESS.

7. Chesney PJ: The Escalating Problem of Antimicrobial Resistance in Streptococcus pneumoniae. AJDC 1992, 146: 912-916.

8. Asensi F, Pérez-Tamarit D, Otero MC: Imipenem-cilastatin therapy in a child with meningitis caused by a multiply resistant pneumococcus. Pediatr Infect Dis J 1989, 8: 895.

9. Friedland IR: Therapy of Penicillin-and Cephalosporin-resistant Pneumococcal Infections. Ann Intern Med 1993, 25: 451-455.

10. Meers PD, Matthews RB: Multiply resistant pneumococcus. Lancet 1978, 2: 219.

11. Koornhof HJ, Wasas A, Klugman K: Antimicrobial Resistance in Streptococcus pneumoniae: A South Africa Perspective. Clin Infect Dis 1992, 15: 84-94.

12. Wüst J, Huf E, Kayser FH: Antimicrobial susceptibilities and serotypes of invasive Streptococcus pneumoniae strains in Switzerland. J Clin Microbiol 1995, 33: 3159-3163.

13. National Comittee for Clinical Laboratory Standarts. Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically. Approved standart NCCLS document M7-A3, Villanova, 1993.

14. National Comittee for Clinical Laboratory Standarts. Performance standarts for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standart NCCLS document M2-A5, Villanova, 1993.

15. Öngen B, Kaygusuz A, Özalp M, ve ark. Penicillin resistance in Streptococcus pneumoniae in İstanbul, Turkey. J Clin Microbiol 1995, 1: 150.

16. Gür D, Tunçkanat F, Şener B, ve ark. Penicillin resistance in Streptococcus pneumoniae in Turkey. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1994, 13: 440-441.

17. Geslin P, Buu-Hoi A, Frémaux A: Antimicrobial resistance in Streptococcus pneumoniae: An epidemiological survey in France, 1970-1990. Clin Infect Dis 1992, 15: 95.

18. Linares J, Pallares R, Alonso T: Trends in antimicrobial resistance of clinical isolates Streptococcus pneumoniae in Bellvigate Hospital, Barcelona, Spain (1970-1990). Clin Infect Dis 1992, 15: 99.