

Penisiline Duyarlı ve Dirençli *Streptococcus pneumoniae* İzolatlarında Penisilin Bağlayan Protein Genotiplerinin Değerlendirilmesi*

Evaluation of Penicillin-Binding Protein Genotypes in Penicillin Susceptible and Resistant *Streptococcus pneumoniae* Isolates

Gönül ASLAN¹, Seda TEZCAN¹, Nuran DELİALIOĞLU¹, Fatma Esin AYDIN¹,
Necdet KUYUCU², Gürol EMEKDAŞ¹

¹ Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

¹ Mersin University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Mersin, Turkey.

² Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Mersin.

² Mersin University Faculty of Medicine, Department of Pediatrics, Mersin, Turkey.

* Bu çalışma Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
(Proje no: BAP-TF TTB (GA) 2006-1) desteklenmiştir.

Geliş Tarihi (Received): 11.08.2011 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 14.11.2011

ÖZET

Penisilin bağlayan proteinler (PBP), beta-laktam grubu antibiyotiklerin doğal hedefidir ve PBP'leri kodlayan *pbp1a*, *pbp2x* ve *pbp2b* genlerindeki mutasyonlar, *Streptococcus pneumoniae*'de beta-laktamlara karşı gelişen dirençten sorumlu tutulmaktadır. Bu çalışmada, penisiline duyarlı ve dirençli *S.pneumoniae* izolatlarında, penisilin direnci ile ilişkili *pbp1a*, *pbp2x* ve *pbp2b* gen bölgelerinde yaygın olan mutasyon paternlerinin sıklığının belirlenmesi ve PBP genotip mutasyonlarının antibiyotik direnciyle ilişkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, çeşitli klinik örneklerden (32 nazofarengal sürüntü, 16 balgam, üç kan, üç yara, iki beyin omurilik sıvısı ve birer adet olmak üzere idrar, apse, bronkoalveoler lavaj, konjunktival sürüntü, trakeal aspirat ve kulak efüzyonu) izole elde edilen 62 *S.pneumoniae* suşu dahil edilmiştir. İzolatların penisilin duyarlılığı disk difüzyon ve E-test yöntemiyle belirlenmiş; suşların 23'ü penisiline duyarlı, 31'i orta düzeyde duyarlı ve sekizi dirençli olarak tanımlanmıştır. İzolatlardan DNA ekstraksiyonu, hızlı DNA izolasyon yöntemiyle yapılmış ve "wild" tip dizilerine özgül polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temelli bir yöntem kullanılarak penisilin direnciyle ilişkili *pbp1a*, *pbp2b* ve *pbp2x* gen bölgelerinde

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Gönül Aslan, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yenişehir Kampüsü, Mersin, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 324 341 2815, **E-posta (E-mail):** drgaslan@gmail.com

PBP gen mutasyonlarının dağılımı belirlenmiştir. Ayrıca, bu izolatlardaki PBP gen değişimleri, penisiline karşı duyarlılık ve dirençlilikle ilişkileri yönünden de değerlendirilmiştir. Penisiline duyarlı *S.pneumoniae* izolatlarının %95.7 (22/23)'ünde üç PBP geninde (*pbp1a*, *pbp2x* ve *pbp2b*) herhangi bir mutasyon belirlenemezken, 1 (%4.3) izolatla her üç PBP geninde mutasyon tespit edilmiştir. Penisiline orta düzeyde duyarlı 31 *S.pneumoniae* izolatında ise PBP gen mutasyonlarının çeşitli kombinasyonları belirlenmiştir. Bu suşlardan 1 (%3.2)'inde araştırılan PBP genlerinde herhangi bir mutasyon saptanmamış; 22 (%71)'sinde her üç PBP geninde de mutasyon varlığı belirlenmiş, 8 (%25.8) izolatla ise iki PBP geninde (beşinde *pbp1a* ve *pbp2b*; ikisinde *pbp2x* ve *pbp2b*; birinde *pbp1a* ve *pbp2x*) mutasyon tespit edilmiştir. Çalışmamızda, penisiline dirençli (MİK \geq 2 μ g/ml) sekiz *S.pneumoniae* izolatının 7 (%87.5)'sinde her üç PBP geninde mutasyon tespit edilmiş olup, bir izolatla ise üç PBP geninde herhangi bir mutasyon gözlenmemiştir. Bu çalışma, bölgemizdeki *S.pneumoniae* izolatlarında penisilin direnci ile ilişkili olarak PBP geninin çeşitli bölgelerinde meydana gelen farklı mutasyon paternlerinin sıklığı konusunda önemli veriler sağlamaktadır. Verilerimiz, *pbp1a*, *pbp2x* ve *pbp2b* gen bölgelerindeki değişimlerin, esas olarak penisiline dirençli *S.pneumoniae* ile ilişkili olduğu görüşünü desteklemektedir. Çalışmada kullanılan "wild" tip dizilerine özgül PCR yönteminin, penisilin direncini MİK ile ilişkili olarak karakterize edebileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Streptococcus pneumoniae*; penisilin bağlayan protein; PBP; mutasyon; penisilin direnci; polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).

ABSTRACT

Penicillin-binding proteins (PBPs) are the natural targets of beta-lactam antibiotics and mutations in *pbp1a*, *pbp2b*, and *pbp2x* genes, which encode PBPs, are responsible for resistance to beta-lactams in *Streptococcus pneumoniae*. In the present study, we intended to determine how often the common mutation patterns occurred within the *pbp1a*, *pbp2b*, and *pbp2x* PBP gene regions and evaluate the PBP genotype mutations which were associated with penicillin resistance in several penicillin-susceptible and -resistant *S.pneumoniae* isolates in Mersin, Turkey. A total of 62 *S.pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens (32 nasopharyngeal swab, 16 sputum, 3 blood, 3 wound, 2 cerebrospinal fluids and one of each urine, abscess, bronchoalveolar lavage, conjunctival swab, tracheal aspirate, middle ear effusion) were included in the study. Penicillin susceptibilities of the isolates were searched by disc diffusion and E-test methods, and 23 of them were identified as susceptible, 31 were intermediate susceptible, and eight were resistant to penicillin. A rapid DNA extraction procedure was performed for the isolation of nucleic acids from the strains. Distribution of PBP gene mutations in *pbp1a*, *pbp2b*, and *pbp2x* gene regions related to penicillin resistance was determined by using a wild-type specific polymerase chain reaction (PCR) based technique. PBP gene alterations of those isolates were also evaluated in relation to penicillin susceptibility and resistance patterns. Twenty two (95.7%) of 23 penicillin-susceptible *S.pneumoniae* isolates exhibited no mutation in the three PBP genes (*pbp1a*, *pbp2x*, and *pbp2b*), while 1 (4.3%) of these harbored mutations in all of the three PBP genes. The penicillin-intermediate susceptible *S.pneumoniae* isolates exhibited various combinations of mutations. One (3.2%) of 31 penicillin-intermediate susceptible isolates exhibited no mutation in the three PBP genes, while 22 (71%) of them yielded mutations in all of the three PBP genes. The remaining 8 (25.8%) isolates harbored mutations for dual PBP genes (in five strains *pbp1a* and *pbp2b*; in two strains *pbp2x* and *pbp2b*; in one strain *pbp1a* and *pbp2x*). Seven (87.5%) out of eight penicillin-resistant *S.pneumoniae* isolates (MIC \geq 2 μ g/ml) revealed mutations in all of the three PBP genes and the other penicillin-resistant isolates exhibited no mutation in the PBP genes. The present study supplied important data on the frequency of different patterns of mutations occurring at various regions of PBP genes related to penicillin resistance in *S.pneumoniae* isolates in our restricted region. The results supported the notion that penicillin resistance in *S.pneumoniae* was mainly attributed to alterations in *pbp1a*, *pbp2x*, and *pbp2b* gene regions and wild-type sequence specific PCR could be applied to characterize genotypic background of penicillin resistance in *S.pneumoniae* strains.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*; penicillin-binding protein (PBP); mutation; penicillin resistance; polymerase chain reaction (PCR).

GİRİŞ

Streptococcus pneumoniae, insanlarda menenjit, akut otitis media, rinosinüzit ve toplum kökenli pnömoni ile ilişkili, oldukça önemli bir bakteriyel patojendir^{1,2}. Penisilin birçok pnömokokal enfeksiyonun tedavisinde geleneksel olarak kullanılan ilk seçenek antibiyotik olup, ülkemizde de pnömokokal enfeksiyonların ampirik tedavisinde halen uygun bir ajandır³⁻⁵. Ancak penisiline dirençli *S.pneumoniae* (PRSP) izolatlarındaki artışın hızla ortaya çıkması, geleneksel ampirik antibiyotik tedavisinde ciddi klinik problemlere sebep olmakta ve bu da çeşitli penisiline dirençli klonların dünya çapında yayılmasıyla sonuçlanmaktadır⁶⁻⁸. PRSP izolatlarının prevalans oranı, coğrafi bölgelere bağlı olarak değişmektedir⁴. Yerleşik mikrobiyal flora üyelerini barındırması nedeniyle nazofarenks, solunum yolu enfeksiyonları ve invaziv hastalıklara sebep olan *S.pneumoniae* gibi potansiyel patojenler için önemli bir rezervuardır⁶. Ciddi enfeksiyon durumunda, uygun antibiyotik tedavisine karar vermede, *S.pneumoniae*'nin penisiline karşı duyarlılık durumunun hızla belirlenmesi oldukça önemlidir⁹.

Penisilin bağlayan proteinler (PBP) beta-laktam grubu antibiyotiklerin doğal hedefidir ve PBP genlerindeki mutasyonlar, *S.pneumoniae*'de beta-laktamlara dirençten sorumlu tutulmaktadır¹⁰⁻¹². PBP'ler membranla ilişkili serin peptidazlar olup, peptidoglikan biyosentezinin son iki basamağındaki glikan zincirlerinin polimerizasyonu ve transeptidasyonunu katalizlemektedir^{3,13}. *S.pneumoniae*'de yüksek moleküler ağırlıklı PBP'ler (*1a*, *1b*, *2a*, *2b* ve *2x*) ve düşük moleküler ağırlıklı PBP-3 olmak üzere toplam altı adet PBP belirlenmiştir³. Yüksek moleküler ağırlıklı PBP'lerdeki dereceli olarak gelişen mutasyonlar, bu proteinlerin bağlanma aktivitesini azaltır ve beta-laktam grubu ajanlara duyarlı hale getirir⁶. *S.pneumoniae*'de var olan bu altı PBP'den *pbp1a*, *pbp2x* ve *pbp2b* olmak üzere en az üç tanesindeki değişikliklerin, penisilin direncinin gelişmesinde oldukça önemli olduğu bildirilmektedir^{14,15}.

Daha önceki yaptığımız bir çalışmada, Mersin'de sağlıklı çocuklarda *S.pneumoniae* taşıyıcılık oranı %13.9 olarak bulunmuş; izolatların penisiline karşı duyarlılık oranı %87.1 olarak saptanmış; izolatların %12'sinin orta düzeyde, %1'inin ise yüksek düzeyde dirençli olduğu görülmüştür¹⁶. Ayrıca, izolatların serotip dağılımı çeşitlilik göstermektedir ve dolaşımdaki bazı yaygın serotiplerin invaziv özellikte olduğu belirlenmiştir¹⁷. Bu çalışmanın amacı, Mersin ilinde penisiline duyarlı ve dirençli *S.pneumoniae* izolatlarında, penisilin direnci ile ilişkili *pbp1a*, *pbp2b* ve *pbp2x* gen bölgelerinde yaygın mutasyon paternlerinin sıklığının polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) temelli bir yöntemle belirlenmesi ve PBP genotiplerinin değerlendirilmesidir.

GEREÇ ve YÖNTEM

S. pneumoniae İzolatları

Çalışmaya, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında 2005-2009 yılları arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 62 *S.pneumoniae* suşu

dahil edildi. Suşların 32'si nazofarengeal sürüntü, 16'sı balgam, üçü kan, üçü yara, ikisi beyin omurilik sıvısı (BOS) ve birer adet olmak üzere idrar, apse, bronkoalveoler lavaj, konjunktival sürüntü, trakeal aspirat ve kulak efüzyonu örneklerinden izole edilmişti.

Klinik örnekler %5'lik koyun kanlı agara (Oxoid, UK) ekildikten sonra, optokin ve oksasilin diski yerleştirildi. Kültürler %5 CO₂'li ortamda 35°C'de bir gece inkübe edildi ve izolatlar koyun kanlı agarda alfa hemoliz ve koloni morfolojisi, Gram boyama, 5 µg'lık optokin disk duyarlılığı ve safra erime testleriyle tanımlandı¹⁸. Tek bir koloniden çoğaltılan bütün izolatlar gliserinli buyyona (%0.5 glukoz ve %10 gliserol içeren nutrient buyyon) alınarak 70°C'de saklandı. Standart ATCC 49619 kalite kontrol suşu da aynı şekilde incelendi.

Penisilin Duyarlılığı

Penisilin duyarlılığı, *S.pneumoniae* için "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" duyarlılık kriterlerine göre disk difüzyon yöntemiyle belirlendi. Pnömonokok izolatlarının oksasilin (1 µg) zon çapı ≥ 20 mm olduğunda penisiline duyarlı olarak kabul edildi. Oksasilin zon çapı ≤ 19 mm olduğunda, suş dirençli kabul edildi ve minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değeri, penisilin E-test (AB Biodisk, Sweden) yöntemiyle belirlendi.

CLSI 2008 yılında *S. pneumoniae* için penisilin duyarlılığı sınır değerlerini değiştirmiştir. 2008 yılı öncesinde penisilin MİK değeri ≥ 2 µg/ml olduğunda PRSP, 0.125-1.0 µg/ml arasında olduğunda penisiline orta düzeyde duyarlı *S. pneumoniae* (PSSP) ve ≤ 0.06 µg/ml olduğunda penisiline duyarlı *S.pneumoniae* (PSSP) olarak değerlendirilmekteydi¹⁹. 2008 yılından sonra yayınlanan CLSI dokümanlarında, BOS'tan elde edilen izolatlar için, parenteral kullanılan penisilin MİK direnç sınır değeri ≥ 0.12 µg/ml olarak değişmiş ve BOS dışındaki izolatlar için penisilin MİK değerleri, ≥ 8 µg/ml olduğunda PRSP, 4 µg/ml olduğunda POSP ve ≤ 2 µg/ml olduğunda PSSP olarak değerlendirilmeye başlamıştır. Oral kullanılan penisilin için MİK değerleri ise ≥ 2 µg/ml olduğunda PRSP, 0.12-1 µg/ml olduğunda POSP ve 0.06 ≤ 2 µg/ml olduğunda PSSP olarak değerlendirilmektedir²⁰.

Bakteriyel DNA İzolasyonu ve PBP Gen Bölgelerinin Amplifikasyonu

İzolatlardan DNA eldesi, hızlı DNA izolasyon yöntemiyle yapıldı. Bunun için, besiyerinde üreyen kolonilerden bir öze dolusu alınarak, 1.5 ml'lik plastik tüplerde 1 ml steril distile su içerisinde süspanse edildi. Tüpler, 80°C'de 20 dakika tutularak bakterilerin parçalanması sağlandı. Daha sonra ependorf tüpü 12.000 xg'de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı. Pellet üzerine 200 µl kloroform ve 200 µl steril distile su ilave edildikten sonra, karışım 12.000 xg'de 10 dakika tekrar santrifüj edildi. Süpernatant PCR reaksiyonunda kalıp olarak kullanıldı.

S.pneumoniae'nin *pbp1a*, *pbp2x* ve *pbp2b* gen bölgeleri özgül primerler kullanılarak PCR ile amplifiye edildi¹¹ (Tablo I). Kullanılan oligonükleotid primer dizileri, sadece duyarlı ("wild" tip) izolatların *pbp1a*, *pbp2x* ve *pbp2b* gen bölgelerinin amplifikasyonu için geliştirilmiş olup, duyarlı olmayan *S.pneumoniae* izolatlarında bu gen bölgeleri değişmiş

Tablo 1. PBP Genlerinin PCR Amplifikasyonunda Kullanılan Primer Dizileri¹

Gen bölgesi	Primerler	Primer dizileri (5'-3')	Nükleotidler	Ürün büyüklüğü (bp)
<i>lytA</i>	Sense: ALY-I	TGA AGC GGA TTA TCA CTG GC	694-713	273
	Antisense: ALY-II	GCT AAA CTC CCT GTA TCA AGC G	966-945	
<i>pbp1a</i>	Sense: PBP1A-I	AAA CAA GGT CCG ACT CAA CC	2256-2275	430
	Antisense: PBP1A-II	AGG TGC TAC AAA TTG AGA GG	2685-2666	
<i>pbp2x</i>	Sense: PBP2X-I	CCA GGT TCC ACT ATG AAA GTG	1003-1023	292
	Antisense: PBP2X-II	CAT CCG TCA AAC CGA AAC GG	1294-1275	
<i>pbp2b</i>	Sense: PBP2B-I	CAA TCT AGA GTC TGC TAT GGA	1636-1656	77
	Antisense: PBP2B-II	GGT CAA TTC CTG TCG CAG TA	1712-1693	

PBP: Penisilin bağlayan proteinler; PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu.

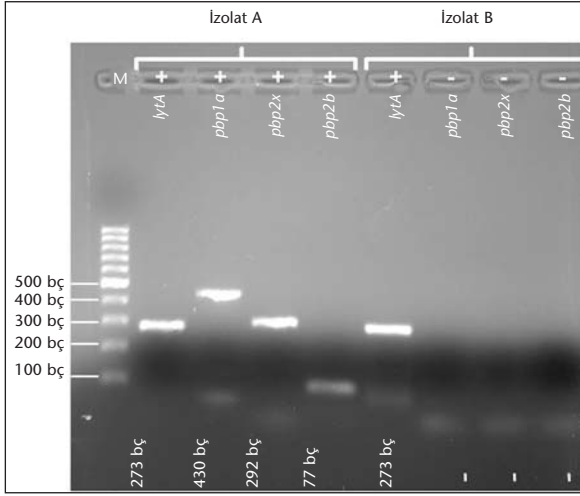
olarak bulunmaktadır. Ayrıca, *S.pneumoniae*'ya özgül otolizin genini kodlayan *lytA* gen bölgesinin 273 baz çift (bp)'lik bir parçası da, *S.pneumoniae* izolatlarının doğrulanması için PCR ile belirlendi.

Her bir gen bölgesi için standart PCR reaksiyonu 50 µL'lik toplam hacimlerde gerçekleştirildi ve karışım 3 µL *S.pneumoniae* hücre lizatından elde edilen kalıp DNA, 0.5 µM/L her bir primer dizisi (sense ve antisense), 0.2 mM nükleotid karışımı, 1X *Taq* DNA polimeraz tampon, 1.25 ünite *Taq* DNA polimeraz ve 1.5 mM MgCl₂ olacak şekilde hazırlandı. Örneklerin ısı döngü cihazında (Eppendorf, Mastercycler, Germany) PCR amplifikasyon koşulları ise, 94°C'de 10 dakika başlangıç denatürasyonundan sonra, 30 döngü 94°C'de 45 saniye denatürasyon, 52°C'de 45 saniye bağlanma ve 72°C'de 40 saniye uzama basamakları ve arkasından 72°C'de beş dakika son uzama basamaklarını içermektedir. PCR ürünleri, %1'lik agaroz jel elektroforezinden sonra 0.5 µg/ml etidyum bromür ile boyandıktan sonra ultraviyole transilüminatörde görüntüldü.

PCR sonuçlarının değerlendirilmesinde, 273 bp'lik *lytA* gen bölgesinin amplifikasyonu *S.pneumoniae* izolatlarını doğrulamaktadır. Eğer izolatların PBP genleri değişmemiş ise, bütün PBP gen reaksiyon tüplerinin agaroz jelinde bant görülmektedir; ancak PBP gen bölgelerinde değişim olan izolatlarda bu bantların bir veya daha fazlası tespit edilmektedir (Resim 1, 2). Agaroz jelde 430, 292 ve 77 bp'lik DNA fragmentlerinin değerlendirilmesi; sırasıyla *pbp1a*, *pbp2b* ve *pbp2x* gen bölgelerine karşılık gelmektedir.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 62 *S.pneumoniae* izolatının 23 (%37.1)'ü penisiline duyarlı (PSSP); 39 (%62.9)'u ise dirençli (PRSP) olarak saptanmıştır. Çalışmamızda, suşların sadece iki tanesi BOS örneğinden izole edilmiş olup, belirlenen MİK direnç sınır değerlerinin en çok 2-3 olarak saptanması ve BOS dışı dirençli olarak belirlenen *S.pneumoniae* izolatlarının da duyarlı sınır değerinde bulunması nedeniyle, dirençli-duyarlı örnek dağılımının bozulması amacıyla, değerlendirme 2008 yılı öncesindeki CLSI kriterlerine göre yapılmıştır. Pe-



Resim 1. Temsilen seçilen iki PSSP izolatının PCR temelli PBP genotipleri. M: Moleküler ağırlık standardı (GeneRuler 100 bç DNA Ladder Plus, SM0321, Fermentas); İzolat A: *lytA* geni pozitif ve *pbp1a/pbp2x/pbp2b* genlerinde mutasyon yok; İzolat B: *lytA* geni pozitif ve *pbp1a/pbp2x/pbp2b* genlerinde mutasyon var [(+): PCR amplifikasyonu pozitif, (-): PCR amplifikasyonu negatif].

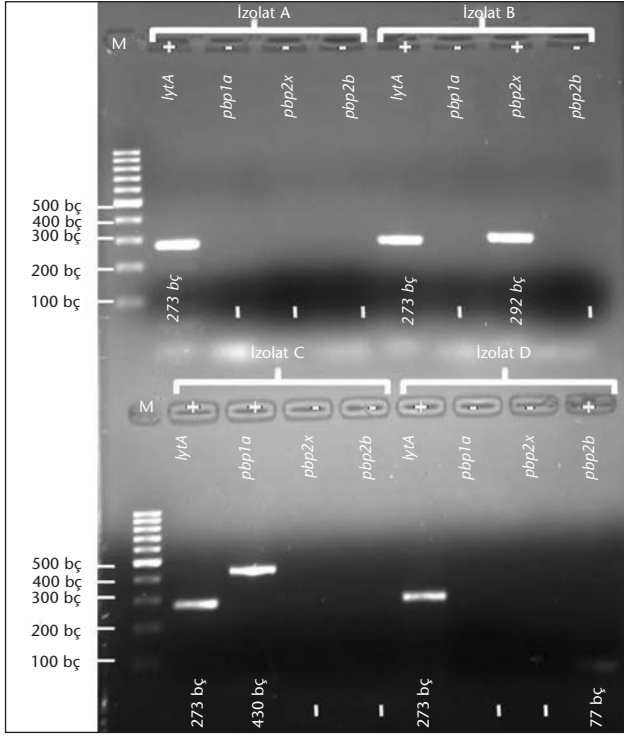
nisilin E-test sonuçlarına göre; bu izolatların 31 (%50)'i 0.125-1.0 µg/ml arasındaki MKK değeri ile penisiline orta düzeyde duyarlı (POSP), 8 (%12.9)'i ise ≥ 2 µg/ml MKK değeri ile PRSP olarak belirlenmiştir (Tablo II).

Tüm izolatlarda, "wild" tip dizilerine özgül PCR ile *pbp1a*, *pbp2x* ve *pbp2b* gen bölgeleri mutasyonlarının dağılımına göre beş farklı PBP genotip paterni izlenmiştir (Tablo II). İzolatlardan 24 (%38.7)'ünde bu üç PBP geninde herhangi bir mutasyon görülmezken; 30 (%48.3) izolatta üç PBP geninde mutasyon, 8 (%13) izolatta ise iki PBP geninde mutasyon gözlenmiştir (Tablo II). PSSP izolatları incelendiğinde; suşların %95.7 (22/23)'ünde *pbp1a*, *pbp2x* ve *pbp2b* mutasyonları saptanmazken, 1 (%4.3)'ünde her üç PBP geninde de mutasyon tespit edilmiştir.

POSP izolatlarında mutasyonların değişik kombinasyonları belirlenmiştir. POSP izolatlarının %3.2 (1/31)'inde araştırılan PBP genlerinde mutasyon gözlenmemiş; %71 (22/31)'inde her üç PBP geninde, %25.8 (8/31)'inde ise iki PBP geninde (beşinde *pbp1a* ve *pbp2b*; ikisinde *pbp2x* ve *pbp2b*; birinde *pbp1a* ve *pbp2x*) mutasyon saptanmıştır (Tablo II ve Resim 2). POSP izolatlarından sadece üç tanesinin MKK değeri üst sınırdaki (1.5 µg/ml) belirlenmiş ve bu üç izolatın PBP genlerinin genotip paterninin her üç PBP geninde mutasyona uğramış olduğu gözlenmiştir (Tablo II).

PRSP izolatları değerlendirildiğinde; sekiz izolatın yedisinde her üç PBP geninde de mutasyon varlığı izlenmiş; bir izolatta ise araştırılan hiçbir PBP geninde mutasyon gözlenmemiştir (Tablo II).

Standart *S.pneumoniae* ATCC 49619 suşunun oksasilin zon çapı < 12 mm, MKK değeri ise 1.0 µg/ml olarak tespit edilmiştir. Bu suşun mutasyon paterni incelendiğinde;



Resim 2. Temsilen seçilen dört POSP izolatının PCR temelli PBP genotipleri. M: Moleküler ağırlık standardı (GeneRuler 100 bç DNA Ladder Plus, SM0321, Fermentas); İzolat A: *lytA* geni pozitif, *pbp1a*/*pbp2x*/*pbp2b* genlerinde mutasyon var; İzolat B: *lytA* geni pozitif, *pbp2x* geninde mutasyon yok, *pbp1a*/*pbp2b* genlerinde mutasyon var; İzolat C: *lytA* geni pozitif, *pbp1a* geninde mutasyon yok, *pbp2x*/*pbp2b* genlerinde mutasyon var; İzolat D: *lytA* geni pozitif, *pbp2b* geninde mutasyon yok, *pbp1a*/*pbp2x* genlerinde mutasyon var [(+): PCR amplifikasyonu pozitif, (-): PCR amplifikasyonu negatif].

pbp1a ve *pbp2x* genlerinde mutasyon olmadığı, *pbp2b* geninde ise mutasyon olduğu saptanmıştır.

TARTIŞMA

Pnömonoklarda *pbp1a*, *pbp2x* ve *pbp2b* gen bölgelerindeki mutasyonların penisilin direncinin en önemli belirleyicisi olduğu ileri sürülmektedir^{12,21,22}. Özellikle PRSP ve POSP izolatlarındaki *pbp1a*, *pbp2x* ve *pbp2b* dizileri PSSP izolatlarından oldukça farklı bulunmuştur¹². Yaptığımız bu çalışmada, "wild" tip dizilerine özgül PCR yöntemiyle bu PBP gen bölgelerindeki mutasyonlar değerlendirilmiştir. Bu yöntemde, hedefe özgül primerler mutasyonlu suşların PBP genlerini amplifiye edememektedir. Çalışmamızda izolatların doğrulanması için *S.pneumoniae*'ya özgül otolizin genini kodlayan *lytA* geni, üç PBP geniyle birlikte eş zamanlı olarak amplifiye edilmiş; bu bölgenin amplifiye edilemediği izolatlar çalışmaya alınmamıştır⁹. Ayrıca çalışmada, aynı hastaya ait tek bir izolat kullanılmış, ancak suşlar arasındaki genetik yakınlıklar araştırılmamıştır. İncelenen 62 *S.pneumoniae* izolatının *pbp1a*, *pbp2x* ve *pbp2b* genlerine özgül oligonükleotid primer dizileri, PBP

Tablo II. *S.pneumoniae* İzolatlarında MİK Dağılımı ve PCR ile Belirlenen Direnç Genleri

İzolat profili	Örnek tipi		Oksasilin (5 µl)	E-test sonucu MİK (µg/ml)	Direnç Genleri				Toplam
					<i>lytA</i>	<i>pbp1a</i>	<i>pbp2x</i>	<i>pbp2b</i>	
PSSP (%95.7)	9	NFS	≥ 20	BM	+	+	+	+	23
	7	Balgam							
	1	İdrar							
	1	Apse							
	1	BAL							
	1	TA							
	2	Yara							
PSSP (%4.3)	1	Balgam	≥ 20	0.032	+	-	-	-	
POSP (%71)	15	NFS	≤ 19	0.125-1.5	+	-	-	-	31
	4	Balgam							
	1	Yara							
	1	BOS							
POSP (%16.1)	4	NFS	≤ 19	0.125-0.38	+	-	+	-	
	1	Kan							
POSP (%6.5)	2	NFS	≤ 19	0.32-0.75	+	+	-	-	
POSP (%3.2)	1	Balgam	≤ 19	0.125	+	-	-	+	
POSP (%3.2)	1	Balgam	≤ 19	0.125	+	+	+	+	
PRSP (%87.5)	2	Balgam	≤ 19	2	+	-	-	-	8
	2	NFS							
	1	KE							
	1	KS							
PRSP (%12.5)	1	Kan	≤ 19	2-3	+	+	+	+	

PSSP: Penisiline duyarlı *S.pneumoniae*; POSP: Penisiline orta düzeyde duyarlı *S.pneumoniae*; PRSP: Penisiline dirençli *S.pneumoniae*; BM: Belirlenmedi; NFS: Nazofarengeal sürüntü; BAL: Bronkoalveoler lavaj; BOS: Beyin omurilik sıvısı; KE: Kulak efüzyonu; KS: Konjunktival sürüntü; TA: Trakeal aspirat; (+): PCR amplifikasyonu pozitif, (-): PCR amplifikasyonu negatif; PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu; MİK: Minimum inhibitör konsantrasyonu.

gen bölgesindeki mutasyonların tespit edilmesinde kullanılmış ve bu mutasyonların antibiyotik direnci ile olan ilişkisi araştırılmıştır. PSSP izolatlarının %95.7 (22/23)'ünde, araştırılan PBP genlerinde mutasyon gözlenmemiştir. Ancak bir izolatın (%4.3) incelenen üç PBP gen bölgesinde de değişmiş nükleotid dizisine sahip olduğu ve bu izolatın pulmoner bir örneğe ait olduğu belirlenmiştir. PSSP sonuçları, geleneksel oksasilin testinin tarama alanının, değişime uğramış PBP'leri her zaman tespit edemediğini göstermektedir

(Tablo II). Bu sebeple, özellikle invaziv pnömokokal enfeksiyonlarda antibiyotik tedavisine daha fazla dikkat edilmesi gerekmektedir. PSSP ile ilgili benzer sonuçlar daha önceki çalışmalarda da bildirilmiş ve PSSP suşlarında *pbp1a*, *pbp2x* ve *pbp2b* genlerinden bir veya ikisinde saptanan mutasyon varlığı Nagai ve arkadaşları²³ tarafından 44 izolat için %13.6, Hiramatsu ve arkadaşları¹² tarafından 177 izolat için yaklaşık %45 olarak rapor edilmiştir.

Çalışmamızda, MİK değeri yüksek (≥ 2 µg/ml) PRSP izolatlarının çoğunun (7/8, %87.5) her üç PBP gen bölgesinin de değişikliğe uğramış olduğu saptanmıştır. Bu sebeple, PBP genotiplerinin belirlenmesinin, bölgemizde penisilin direnç seviyesinin tahmin edilmesinde yardımcı olacağı söylenebilir. Ancak yüksek MİK değerine (2-3 µg/ml) sahip PRSP izolatlarından 1 (%12.5)'inde PBP gen bölgesinde mutasyon tespit edilmiştir (Tablo II). Bu izolatın, DNA dizi analizi veya primer özgülüğünü artırmak için daha iyi korunmuş bir gen bölgesinin PCR ile detaylı analiz edilmesinin gerekli olduğu düşünülmüştür. POSP izolatları değerlendirildiğinde ise, 31 suşun 1 (%3.2)'inde mutasyon varlığı saptanmamış, diğer suşların beş farklı PBP genotip paterni oluşturduğu görülmüştür (Tablo II). Benzer şekilde, POSP izolatlarındaki bu çeşitlilik başka çalışmalarda²¹⁻²⁴ da bildirilmiş ve beta-laktamlara direnç gelişimiyle sonuçlanan *pbp1a*, *pbp2x* ve *pbp2b* afinitesinde azalma ile ilişkili olduğu vurgulanmıştır¹.

Ülkemizde pnömokok aşısı Kasım 2008 tarihinden itibaren uygulanmaya başlamıştır. Aşı uygulanmasından sonra direnç oranlarında değişiklik gözlenmesi beklenmektedir. Ancak çalışmamıza dahil edilen izolatlar, çalışılan tarih aralığındaki tüm dirençli ve duyarlı oranlarını yansıtmadığı için direnç paternlerindeki değişiklikleri izlemek mümkün olmamıştır. Bununla birlikte, çalışmadaki yedi izolat 2009 yılına ait olup, bunlardan bir tanesi penisiline 0.19 µg/ml, bir diğeri de 0.125 µg/ml MİK değeriyle orta duyarlı bulunmuştur.

S.pneumoniae suşlarının içerdiği çeşitli PBP gen dizileri oral streptokoklardaki PBP'lerle yüksek homoloji göstermektedir¹⁴. Yaptığımız bu çalışmada, birbirinden farklı PBP genotipine sahip POSP'ler oldukça yüksek oranda bulunmuştur. Bu çeşitliliğe sahip izolatların, insanlarda oral kommensal streptokok türleriyle genetik olarak türler arası rekombinasyonuna ve dirençli klonların nispeten yüksek yoğunluktaki popülasyonlarda kolaylıkla taşınmasına sebep olabileceği belirtilmektedir^{2,9,25}. Bununla birlikte bu homolog dirençli gen aktarımının penisiline dirençli fenotipe her zaman yansımayaacağı da ifade edilmektedir². Ayrıca bu POSP izolatlarının, duyarlı ve dirençli mikroorganizmaların karışık bir popülasyonu anlamına gelen heterojen dirençli suşları içerebileceği de söylenebilir. Genom düzeyinde penisilin direncinden sorumlu mutasyonların gösterilmesi özellikle POSP izolatlarında oldukça önemlidir. Dolayısıyla *S.pneumoniae* enfeksiyonunun tedavisi, penisiline direnç insidansının artmasına bağlı olarak güçleşmekte, ilk seçenek antibiyotik kullanımının ve aşı çalışmalarının bölgesel olarak düzenlenmesi gerekmektedir. Daha önceki çalışmalarda, özellikle *pbp2b*'deki mutasyonların, penisiline karşı afinitenin azalmasına neden olduğu belirtilmiş; oldukça heterojen yapıda olan bu bölgenin, penisilin direnci ile ilişkisinin araştırılmasında en iyi hedef gen bölgesi olabileceği vurgulan-

miştir^{9,26-28}. Bu çalışmada, bütün izolatlar içinde *pbp2b* gen mutasyonlarının sıklığı (%59.7), araştırılan diğer gen bölgelerinden (*pbp1a* %58 ve *pbp2x* %53.2) çok farklı bulunmamıştır.

Günümüzde *S.pneumoniae* izolatlarında direnç ile ilgili mutasyonların gösterilmesinde, çok lokuslu dizi tiplendirmesi, "pulsed-field" jel elektroforezi (PFGE), BOX-PCR veya DNA dizi analizi gibi moleküler epidemiyolojik teknikler kullanılmaktadır^{22,24,29}. Yapılan çalışmalarda, kullandığımız bu primere özgül PCR tekniği ile *pbp1a*, *pbp2b* ve *pbp2x* genlerinde mutasyonların araştırılmasının, *S.pneumoniae*'nin beta-laktamlara karşı genetik duyarlılığının belirlenmesinde hızlı, güvenilir ve kullanışlı olduğu belirtilmektedir^{6,11}. Çalışmamızda da, bu yöntem ile izolatların genetik duyarlılığı yönünden doğru veriler elde edilmiştir.

Ülkemizde, penisiline düşük ve yüksek düzeyde dirençli pnömokokların prevalansı sırasıyla %30.2-41.5 ve %7-9.7 arasında değişmektedir³⁰⁻³³. *S.pneumoniae* izolatlarının PBP dizilerindeki değişiklikler ilk kez Bıçmen ve arkadaşları⁸ tarafından incelenmiş; 20 izolatla (sekizi yüksek, dokuzu düşük düzeyde penisiline dirençli; üçü penisiline duyarlı) en belirgin mutasyon alanları *pbp1a*'da T371A, *pbp2b*'de E481G ile T451A ve *pbp2x*'de T338A olarak bildirilmiştir. Pınar ve arkadaşları³¹, penisiline dirençli pnömokok izolatlarının moleküler epidemiyolojisi ile ilgili yaptıkları çalışmada, PCR-RFLP ile *pbp2b* ve *pbp2x* genlerindeki heterojeniteyi ve BOX-PCR ile genotipleri analiz etmişler; *pbp2b* geninde beş, *pbp2x* geninde ise 12 farklı patern tanımlamışlardır. MİK değerleri ile PBP gen varyasyonları arasındaki ilişki değerlendirildiğinde, *pbp2x* genlerinin *pbp2b* genlerinden daha değişken olduğu bulunmuş ve *pbp2b* genlerindeki varyasyonun düşük düzeydeki penisilin direnci ile ilişkili olduğu belirtilmiştir³¹. Bizim çalışmamızda da, bütün izolatlar içinde *pbp2b* gen mutasyonlarının sıklığı (%59.7), araştırılan diğer gen bölgelerinden (*pbp1a* %58 ve *pbp2x* %53.2) biraz daha yüksek bulunmuştur.

Sonuç olarak bu çalışma, bölgemizde *S.pneumoniae* izolatlarında penisiline karşı dirençle ilişkili olan PBP genlerinin üç değişik bölgesinde ortaya çıkan farklı mutasyon paternlerinin sıklığıyla ilgili önemli veriler sağlamaktadır. Verilerimiz, *S.pneumoniae* izolatlarındaki penisilin direncinin, *pbp1a*, *pbp2x* ve *pbp2b* gen bölgelerinde mutasyonlara sebep olan nükleik asit değişiklikleri ile ilişkili olduğu kavramını desteklemektedir. MİK değerlerinin de aynı şekilde, PRSP izolatlar için *pbp1a*, *pbp2x* ve *pbp2b* gen bölgelerindeki değişikliklerden etkilendiği görünmektedir. Bu doğrultuda, "wild" tip dizilerine özgül PCR tekniğinin bölgemizde *S.pneumoniae* izolatları arasında, MİK değerleri ile uyumlu olarak penisilin direncini tanımlayabildiği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

- Hotomi M, Billal DS, Shimada J, et al. High prevalence of *Streptococcus pneumoniae* with mutations in *pbp1a*, *pbp2x*, and *pbp2b* genes of penicillin-binding proteins in the nasopharynx in children in Japan. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2006; 68(3): 139-45.
- Ohsaki Y, Tachibana M, Awaya T, Kuroki M, Itoh Y. Recovery of susceptibility to penicillin G in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* despite increased accumulation of PBP gene alterations. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32(5): 427-31.

3. Nichol KA, Zhanel GG, Hoban DJ. Penicillin-binding protein 1A, 2B, and 2X alterations in Canadian isolates of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(10): 3261-4.
4. Ohsaki Y, Tachibana M, Nakanishi K, et al. Alterations in penicillin binding protein gene of *Streptococcus pneumoniae* and their correlation with susceptibility patterns. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 22(2): 140-6.
5. Bayraktar MR, Durmaz B, Kalcioğlu MT, Durmaz R, Cizmeci Z, Aktas E. Nasopharyngeal carriage, antimicrobial susceptibility, serotype distribution and clonal relatedness of *Streptococcus pneumoniae* isolates in healthy children in Malatya, Turkey. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 26(3): 241-6.
6. Hotomi M, Yamanaka N, Faden H, et al. Nasopharyngeal carriage of drug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in children with acute otitis media evaluated by polymerase chain reaction-based genotyping of penicillin-binding proteins. *Acta Otolaryngol* 2002; 122(1): 72-7.
7. Sakata H. Bactericidal activities of parenteral antibiotics and genotype of penicillin-binding protein in *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* isolated from children's blood. *J Infect Chemother* 2006; 12(5): 338-42.
8. Bicmen M, Gulay Z, Ramaswamy SV, Musher DM, Gur D. Analysis of mutations in the PBP genes of penicillin-non-susceptible pneumococci from Turkey. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12(2): 150-5.
9. Ubukata K, Asahi Y, Yamane A, Konno M. Combinational detection of autolysin and penicillin-binding protein 2B genes of *Streptococcus pneumoniae* by PCR. *J Clin Microbiol* 1996; 34(3): 592-6.
10. Zapun A, Contreras-Martel C, Vernet T. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2008; 32(2): 361-85.
11. Ubukata K, Muraki T, Igarashi A, Asahi Y, Konno M. Identification of penicillin and other beta-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae* by polymerase chain reaction. *J Infect Chemother* 1997; 3(4): 190-7.
12. Hiramatsu K, Ohama M, Mijajima Y, et al. Antimicrobial susceptibilities and analysis of genes related to penicillin or macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24(2): 125-9.
13. Contreras-Martel C, Dahout-Gonzalez C, Martins Ados S, Kotnik M, Dessen A. PBP active site flexibility as the key mechanism for beta-lactam resistance in pneumococci. *J Mol Biol* 2009; 387(4): 899-909.
14. Sogstad MK, Høiby EA, Caugant DA. Molecular characterization of non-penicillin-susceptible *Streptococcus pneumoniae* in Norway. *J Clin Microbiol* 2006; 44(9): 3225-30.
15. Noguchi N, Tano J, Nasu Y, et al. Antimicrobial susceptibilities and distribution of resistance genes for beta-lactams and macrolides in *Streptococcus pneumoniae* isolated between 2002 and 2004 in Tokyo. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29(1): 26-33.
16. Bayer M, Aslan G, Emekdaş G, Kuyucu N, Kanik A. Nasopharyngeal carriage of *Streptococcus pneumoniae* in healthy children and multidrug resistance. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42(2): 223-30.
17. Aslan G, Emekdas G, Bayer M, Serin MS, Kuyucu N, Kanik A. Serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* strains in the nasopharynx of healthy Turkish children. *Indian J Med Res* 2007; 125(4): 582-7.
18. Winn W, Allen S, Janda W, et al (eds). Gram-positive cocci, pp: 674-6. In: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 2006, 6th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 18th Informational Supplement, 2008, M100-S18. CLSI, Wayne, PA.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 20th Informational Supplement, 2010, M100-S20. CLSI, Wayne, PA.
21. Chesnel L, Carapito R, Croizé J, Dideberg O, Vernet T, Zapun A. Identical penicillin-binding domains in penicillin-binding proteins of *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates with different levels of beta-lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(7): 2895-902.
22. Zhanel GG, Wang X, Nichol K, et al. Molecular characterisation of Canadian paediatric multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* from 1998-2004. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28(5): 465-71.
23. Nagai K, Shibasaki Y, Hasegawa K, et al. Evaluation of PCR primers to screen for *Streptococcus pneumoniae* isolates and beta-lactam resistance, and to detect common macrolide resistance determinants. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48(6): 915-8.

24. Sakai F, Chiba N, Ono A, et al. Molecular epidemiologic characteristics of *Streptococcus pneumoniae* isolates from children with meningitis in Japan from 2007 through 2009. *J Infect Chemother* 2011; 17(3): 334-40.
25. Chiba N, Kobayashi R, Hasegawa K, et al; Acute Respiratory Diseases Study Group. Antibiotic susceptibility according to genotype of penicillin-binding protein and macrolide resistance genes, and serotype of *Streptococcus pneumoniae* isolates from community-acquired pneumonia in children. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56(4): 756-60.
26. Smith AM, Klugman KP. Alterations in penicillin-binding protein 2B from penicillin-resistant wild-type strains of *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(4): 859-67.
27. Tribuddharat C, Polwichai P, Champreeda P, Srifuengfung S. The sequence of *pbp2b* from penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Thailand. *J Med Assoc Thai* 2010; 93(Suppl 5): S16-26.
28. du Plessis M, Smith AM, Klugman KP. Rapid detection of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in cerebrospinal fluid by a seminested-PCR strategy. *J Clin Microbiol* 1998; 36(2): 453-7.
29. Antonio M, Dada-Adegbola H, Biney E, et al. Molecular epidemiology of pneumococci obtained from Gambian children aged 2-29 months with invasive pneumococcal disease during a trial of a 9-valent pneumococcal conjugate vaccine. *BMC Infect Dis* 2008; 8: 81.
30. Yenisehirli G, Sener B. Antibiotic resistance and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from patients at Hacettepe University Medical Faculty. *Mikrobiyol Bul* 2003; 37(1): 1-11.
31. Pinar A, Koseoglu O, Yenisehirli G, Sener B. Molecular epidemiology of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in a university hospital, Ankara, Turkey. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10(8): 718-23.
32. Erdem H, Pahsa A. Antibiotic resistance in pathogenic *Streptococcus pneumoniae* isolates in Turkey. *J Chemother* 2005; 17(1): 25-30.
33. Ilki A, Sagiroglu P, Elgormus N, Soyletir G. Trends in antibiotic susceptibility patterns of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* isolates: four years follow up. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44(2): 169-75.