

91962

T. C.  
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU  
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

***STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* SUŞLARININ PENİSİLİNE  
DUYARLILIK DURUMU VE SEROTİPLENDİRİLMESİ;  
PENİSİLİNE DİRENÇLİ SUŞLARIN “PULSED-FIELD GEL  
ELECTROPHORESIS” İLE KLONAL YAKINLIKLARININ  
ARAŞTIRILMASI**

Dr. DUYGU EŞEL  
UZMANLIK TEZİ

Doç. Dr. A. BÜLENT SÜMERKAN  
TEZ YÖNETİCİSİ

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu  
tarafından 99-011-6 nolu proje ile desteklenmiştir

91962

KAYSERİ - 2000

## İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	I
SUMMARY	II
KISALTMALAR	III
ŞEKİL LİSTESİ	IV
TABLO LİSTESİ	V
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2. 1. <i>Streptococcus pneumoniae</i> 'nın mikrobiyolojik özellikleri	3
2. 2. Pnömonoklarda patogenez ve virülans faktörleri	5
2. 3. Pnömonokok infeksiyonlarının epidemiyolojisi	7
2. 4. Pnömonoklarda antibiyotik direnci	8
2. 5. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)	12
2. 6. Pnömonokok infeksiyonlarından korunma	13
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	15
3. 1. Bakteri identifikasyonu	15
3. 2. Serotiplendirme	16
3. 3. Duyarlılık testleri	17
3. 4. PFGE	18
4. BULGULAR.....	20
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	27
6. KAYNAKLAR.....	38

## ÖZET

Son yıllarda birçok ülkeden penisiline orta düzey ( $MİK \geq 0.12 \mu\text{g/mL}$ ) veya yüksek düzey ( $MİK \geq 2 \mu\text{g/mL}$ ) dirençli *Streptococcus pneumoniae* suşları bildirilmektedir. Tüm dünyada bu dirençli izolatların çoğunun bulunduğu beş serogrup veya serotip 6, 9, 14, 19 ve 23'tür. Penisiline dirençli pnömokok insidansının çoğunlukla bazı dirençli klonların yayılması nedeniyle arttığı bilinmektedir. Bu çalışmada klinik örneklerden izole edilen 193 *S. pneumoniae* suşu değerlendirildi. Penisiline duyarlılık E-test ile belirlendi. Yüksek düzey penisilin direnci saptanamazken, orta düzey direnç % 23 olarak bulundu. Serotiplendirme Statens Serum Institute'den elde edilen antiserumlarla "Quellung" reaksiyonu ile yapıldı. Dirençli suşlarda, izolatların çoğunun sırasıyla serogrup 19, 23, 14 ve 1'e ait olduğu görülürken; duyarlı suşlarda en çok serogrup 19, 1, 6, 23 ve 3 saptandı. "Pulsed-field gel electrophoresis" ile penisiline dirençli suşlarda sekiz farklı ana klon saptandı. Yöremizdeki penisiline orta düzey pnömokoklarda genetik heterojenite belirlendi.

## SUMMARY

### **Penicillin Susceptibility and Serotyping of *Streptococcus pneumoniae* Strains; Investigation of Clonality in Penicillin-resistant Strains**

Isolates of *Streptococcus pneumoniae* with intermediate-level penicillin resistance ( $MIC \geq 0.12 \mu\text{g/mL}$ ) or high-level resistance ( $MIC \geq 2 \mu\text{g/mL}$ ) have been reported from many countries in recent years. The five serogroups or serotypes found most frequently in these isolates all over the world are serogroup/serotype 6, 9, 14, 19, and 23. It has been known that a major part of the increase in incidence of penicillin-resistant *S. pneumoniae* was due to the spread of some pneumococcal clones. In this study we evaluated 193 isolates of *S. pneumoniae* isolated from clinical specimens. E-test was used to evaluate susceptibility to penicillin. We found the prevalence of intermediate-level penicillin resistance as 23 %. There were no high-level resistant pneumococci. Serotyping was performed with antisera from Statens Serum Institute by "Qellung" reaction. In susceptible strains, the majority of isolates were of serogroup/serotype 19, 1, 6, 23 and 3; while the majority of penicillin-resistant strains were of serogroup/serotype 19, 23, 14, and 1, respectively. It was seen that there were eight major clones in penicillin-resistant pneumococci with "pulsed-field gel electrophoresis". It was found that there was genetic heterogeneity in intermediate-level penicillin-resistant pneumococci in our region.

## KISALTMALAR

ATCC	: American Type Culture Collection
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
mb	: megabaz
MIK	: Minimal inhibitör konsantrasyon
NCCLS	: National Committee for Clinical Laboratory Standards
NTA	: Nazotrakeal aspirat
PBP	: Penisilin bağlayan protein
PFGE	: Pulsed-field gel electrophoresis
PsaA	: Pneumococcal surface adhesin A
PspA	: Pneumococcal surface protein A

## ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1: Serotiplendirmede kullanılan dama tahtası metodu	16
Şekil 2: <i>Streptococcus pneumoniae</i> 'de olumlu Quellung reaksiyonu	17
Şekil 3: <i>Streptococcus pneumoniae</i> ve penisilin için MİK dağılımları	22
Şekil 4: <i>Streptococcus pneumoniae</i> suşlarının serogrup/serotip dağılımı	24
Şekil 5: Penisiline orta düzey dirençli pnömokokların serogrup/serotip dağılımı	24
Şekil 6: Sma I ile kesilerek elde edilmiş belli başlı PFGE paternleri	25

## TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo I: PBP tipleri ve molekül ağırlıkları	9
Tablo II: <i>S. pneumoniae</i> 'da Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları	11
Tablo III: <i>Streptococcus pneumoniae</i> suşlarının izole edildiği klinik örnekler	20
Tablo IV: Yüzdoksanüç <i>Streptococcus pneumoniae</i> suşunda penisiline duyarlılık durumu	21
Tablo V: <i>Streptococcus pneumoniae</i> suşlarının penisilin için MİK aralıkları, MİK <sub>50</sub> ve MİK <sub>90</sub> değerleri	21
Tablo VI: <i>Streptococcus pneumoniae</i> ve penisilin için MİK dağılımları	22
Tablo VII: BOS'ından izole edilen <i>Streptococcus pneumoniae</i> suşlarının duyarlılık durumu	23
Tablo VIII: Penisiline orta düzey dirençli pnömokoklarda sefotaksim için MİK aralıkları, MİK <sub>50</sub> ve MİK <sub>90</sub> değerleri	23
Tablo IX: Penisiline orta düzey dirençli 44 pnömokok suşuna ait epidemiyolojik veriler, penisilin ve sefotaksim MİK değerleri, serotipleri ve PFGE tipleri	26
Tablo X: Türkiye'de pnömokoklarda penisilin direncini belirlemeye yönelik çalışmalar	28
Tablo XI: Kayseri yöresinde pnömokoklarda penisilin direncini belirlemeye yönelik çalışmalar	29
Tablo XII: Penisiline dirençli pnömokoklar ile kolonizasyon ve infeksiyon için risk faktörleri	30
Tablo XIII: Glikoprotein konjuge pnömokok aşılıarı	34

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

*Streptococcus pneumoniae* insanlarda ağır infeksiyon oluşturabilen önemli bakteriyel patojenlerden biridir. Pnömonok infeksiyonlarının tedavisinde ilk tercih edilen antibiyotik penisilindir. Ancak penisiline ve diğer antibiyotiklere giderek artan direnç, bu infeksiyonların tedavisi için problem oluşturmaktadır (1, 2). Bugün penisiline dirençli pnömokokların horizontal ve klonal olmak üzere iki yolla yayıldığı bilinmektedir (3). Özellikle klonal yayılım birbirinden çok uzak coğrafi bölgeler arasında bile yayılıma yol açması nedeniyle birçok önemli araştırmaya konu olmuştur (4, 5).

*S. pneumoniae*'nin 90 serotipi bilinmektedir (6). Ancak sınırlı sayıda serotip invaziv hastalığa neden olmaktadır. Özellikle penisiline ve/veya diğer antibiyotiklere dirençli pnömokokların serogrup/serotip 6, 9, 14, 19 ve 23'e ait olduğu belirlenmiştir (7, 8).



Pnömokok infeksiyonlarından korunma da tedavi kadar önemlidir. Bugün kullanılmakta olan konvansiyonel aşı invaziv hastalık etkeni olduğu belirlenen 23 farklı serotipten elde edilen pürüfiye kapsüler polisakaritten oluşmaktadır (9).

Bölgemizde yaygın olan serotipleri belirlemek kullanımdaki konjuge aşuların etkinliğini göstermek açısından önemlidir. Bu çalışmanın planlanmasında birinci amaç, bölgemizde *S. pneumoniae* izolatlarında penisiline direnç durumunu belirlemektir. İkinci amaç, yöremizde hangi serotiplerin yaygın olduğunu ve bunlardan hangilerinin penisiline dirençli olduğunu tespit etmektir. Üçüncü amaç ise penisiline dirençli pnömokoklarda kromozomal bir benzerliğin olup olmadığını veya başka bir deyişle bölgemizde penisiline dirençli *S. pneumoniae* suşlarının klonal yayılım gösterip göstermediğini belirlemektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

*S. pneumoniae* akut otitis media, sinüzit, konjonktivit gibi infeksiyonların yanısıra, pnömoni, menenjit gibi ağır infeksiyonların bakteriyel etkenleri arasındadır. Pnömonokok infeksiyonları, hala tüm dünyada morbidite ve mortalitenin en önemli sebeplerinden biridir (10, 11). Penisilin kullanımıyla birlikte pnömonokok infeksiyonlarına bağlı mortalite hızla azalmıştır. Penisilin, bu infeksiyonların tedavisinde hala ilk sırayı korumaktadır. Bununla birlikte ilk kez 1967'de Papua Yeni Guinea'dan bildirilen ve 1974'ten itibaren tüm dünyada artarak bildirilmeye başlanan penisilin direnci pnömonokok infeksiyonlarının tedavisinde önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (1, 2).

### 2. 1. *Streptococcus pneumoniae*'nin mikrobiyolojik özellikleri

*S. pneumoniae* ilk kez 1881'de eş zamanlı olarak, Amerika'da Steinberg tarafından, Fransa'da ise Pasteur tarafından tanımlanmıştır. Steinberg'in *Micrococcus pasteurii* adını verdiği mikroorganizma, Pasteur tarafından *Microbe septicemique du*

*salive* olarak isimlendirilmiştir. 1880’li yılların sonundan itibaren, lobar pnömoninin en yaygın sebebi olması nedeniyle bu bakteri için *Pneumococcus* terimi kullanılmaya başlanmış, 1926’da balgam gram boyamasındaki görüntüsü nedeniyle *Diplococcus* ismi verilmiştir. Son olarak 1974’te sıvı besiyerinde üreme sırasındaki görünümü nedeniyle *Streptococcus pneumoniae* olarak adlandırılmıştır (10).

*S. pneumoniae* tipik olarak birbirlerine bakan yüzleri düz, diğer uçları sivri, boyları enlerinden az uzun, mum alevi ya da lanset biçiminde 0.5-1.2 µm büyüklüğünde gram olumlu ikili duran koklar halinde görülmekle birlikte, sıvı besiyerlerinde zincir de oluşturabilir. Fakültatif anaeroptur. %5-10 CO<sub>2</sub> içeren ortamlarda daha iyi ürer. Hareketsiz ve sporsuzdur. Organizma dışında dayanıksızdır ve kültürlerinde çabuk otolize olur (12, 13).

Rutin mikrobiyoloji laboratuvarında beş önemli özelliği ile tanımlanır:

1. Kanlı agarda alfa-hemoliz yapması (Anaerop ortamda pnömolizin O aktivasyonu sonucu beta-hemoliz görülebilir)
2. Katalaz negatif olması
3. Safrada erime (Safra veya safra tuzları otolitik amidazı aktive eder. Bu enzim peptidoglikandaki alanin ve muramik asit arasındaki köprüleri keser ve organizma erir)
4. Ethyl hydrocuprein (optokin)’e duyarlılık (10-14).

Son yıllarda çok sayıda optokine dirençli kökenle karşılaşılması nedeniyle kesin tanıda safrada erimenin daha önemli olduğu iddia edilmektedir (15, 16).

Pnömokokların hücre duvarı, peptidoglikan ve kolin-ribitol teikoik asit kompleksinden oluşur. Bu duvarın dış yüzeyinde ise polisakkarit kapsül yer alır. Pnömokoklarda kapsül ve somatik antijen olmak üzere iki türlü antijen vardır. Her tip için ayrı immünojenik özellik taşıyan kapsül maddesine “spesifik solubl substans” adı

verilir (12). Konjonktivit etkeni olabilen nadir kapsülsüz kökenler dışında, klinik *S. pneumoniae* izolatlarının tamamı kapsüllüdür. Kapsüler polisakkaritlerdeki antijenik değişikliklere dayanılarak 90 serotip tanımlanmıştır (6). Kökenin tipe özgü antiserum ile karşılaştırılarak oluşan kapsüler reaksiyonun gösterilmesi esasına dayanan “Neufeld testi” ile serotiplendirme mümkündür. “Quellung reaksiyonu” olarak da bilinen “Neufeld testi”, bir kapsül şişme olayı değil, tipe özgü antiserum ile kapsül materyali arasında oluşan ve kapsülün görünür hale gelmesini sağlayan bir reaksiyondur. Reaksiyon sonunda bakteriler aglütine olur ve kapsül görülür (13). Bugün en çok kabul gören numaralandırma sisteminde antijenik benzerliklerine göre serogruplar söz konusudur. Örneğin serogrup 19, 19F, 19A, 19B ve 19C serotiplerini içerir (10, 13). *S. pneumoniae* serotip 3 kolonileri çok mukoid görüldüğünden *Streptococcus mucosus* olarak da isimlendirilirler (10).

Pnömonokok infeksiyonlarının spontan iyileşmesi sırasında IgM ve IgG yapısında serotipe özgü antikapsüler antikorlar ortaya çıkar. Agamaglobulinemi ya da disgamaglobulinemi dışında genellikle aynı kapsüler tip ile reinfeksiyon görülmez (10).

Pnömonoklarda kapsül antijeninden başka somatik antijenler de vardır. Bunlardan biri protein yapısındaki M proteini, diğeri ise karbonhidrat yapısındaki C maddesidir. Anti-M protein antikorlarının koruyucu özelliği yoktur. C maddesi ise antijeniktir ve buna karşı gelişen ve birleşince presipitasyona neden olan madde “C reaktif protein”dir (17).

## **2. 2. Pnömonoklarda patogenezi ve virülans faktörleri**

Pnömonokok infeksiyonlarının gelişiminde ilk basamak nazofaringeal kaviteye giriş ve kolonizasyondur (10). Kolonizasyon, organizmanın, konağın nazofaringeal kavitesindeki hücre yüzey yapılarından bir veya daha fazlasına bağlanabilme yeteneğine bağlıdır. Bağlanma bakteri yüzey adezinleri ve epitel hücre reseptörlerinin spesifik

etkileşimi sonucu olur. Bu adezinlerin dışında bazı glikoprotein yapısındaki moleküllerin ve bazı yüzey proteinlerinin (Psa A) bağlanmada önemli olduğundan söz edilmektedir (10, 18). Kolonizasyon süresi bazı kişilerde bir yıldan uzun olsa da ortalama altı aydır. İnfeksiyonların çoğu taşıyıcılığın ilk haftasında görülür. İnfantlarda ve çocuklarda infeksiyon, kolonize olan serotip ile korelasyon gösterir. Baskın olan serotipler 6, 14, 19F ve 23F'dir (19). Çünkü bu serotipler zayıf immünojendirler, mukozaya daha iyi yapışma gösterirler ve yavaş otolize olurlar (7).

Kolonizasyon meydana geldikten sonra, viral üst solunum yolu infeksiyonları ya da alerji gibi koruyucu mekanizmaların işlevinin bozulduğu durumlarda pnömokoklar alt solunum yoluna ulaşarak infeksiyona neden olurlar (10, 20). Pnömokokların kolonize oldukları nazofarinksden santral sinir sistemine ulaşmaları ise hücre duvarı ve pnömolizin etkisiyle daha geçirgen hale gelen hücre aralıkları ya da nazofarinks ile santral sinir sistemini birleştiren anatomik bir hasar nedeniyle olur (18).

Pnömokok infeksiyonlarının patogenezindeki en önemli iki mekanizma fagositozdan kaçış ve kompleman aktivasyonudur. Fagositozdan korunmayı sağlayan polisakkarit kapsüldür. Bu mekanizma şu üç hipotezle açıklanmaktadır:

- a. Spesifik antikapsüler antikorlar opsonizasyonda hücre duvarı polisakkaritlerine karşı gelişen antikorlardan daha etkilidir. Bu antikorların yokluğunda fagositoz gerçekleşemez.
- b. Kapsül fagositik hücreleri itebilen bir elektrokimyasal işleve sahiptir.
- c. İnsan serumunda bulunan bazı antikor ve komplemanlar bakteri hücre duvarına birikir ve bu durum fagositik hücrelerin antijeni tanımasını engeller (10, 18, 21).

Hostetter (22), virulan pnömokoklardaki serotiplerin fagositoz ve antikor üretimi ile ilişkisini araştırmış, serotip 3 ve 4'ün fagositoza daha dirençli olduğunu ve bu

serotiplerin C3d opsoninleri sayesinde B-lenfositleri uyararak daha çok antikor sentezlettiğini göstermiştir. Aynı çalışmada serotip 6A ve 14'ün fagositoya serotip 3 ve 4'den daha duyarlı ve antikor üretiminin daha az olduğu bulunmuştur.

Patogeneizde önemli diğer virülans faktörleri, pnömolizin, otolizin, alfa-hemolizin, yüzey proteinleri, nöraminidazlar, hyaluronidaz, serin proteaz ve IgA1'e spesifik proteazdır. Pnömolizin hem sitotoksiktir, hem de komplemanı aktive eder. Otolizin pnömokok hücre duvarını parçalayan katabolik bir enzimdir. Bu parçalanma sonrası ortaya çıkan solubl maddeler proinflamatuardır. Nörominidazlar vücut sıvılarındaki veya hücre yüzeyindeki glikolipid, glikoprotein ve oligosakkaritlerin terminal sialik asitlerini keserek konağa zarar verirken, hyaluronidaz bağ dokusunda hasar oluşturarak invazyonu kolaylaştırır (23). Yüzey proteinleri (PspA ve PsaA) konak hücreye bağlanmada önemlidir (24). Pnömokoklarca üretilen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'nin de pnömoni sırasındaki alveoler epitel hasarına katkıda bulunduğu iddia edilmektedir (25).

### **2. 3. Pnömokok infeksiyonlarının epidemiyolojisi**

Pnömokoklar sağlıklı erişkinlerin %5-10'unda, sağlıklı çocukların ise %20-40'ında nazofarinksde kolonize olabilirler. Kolonizasyon da infeksiyon gibi kış aylarında artar. Pnömokok bakteriyemisi insidansı 2 yaş altı bebeklerde, yaşlılarda ve immünkompromize hastalarda fazladır (10, 25-27). HIV ile infekte hastalarda insidans genel popülasyona göre en az 100 kat artmaktadır (27).

Pnömokoklar insandan insana yakın temasla bulaşır. Toplu halde yaşanan kreşler, cazaevleri, bakımevleri ve askeri kamplar yayılım için uygun ortam oluşturur.

Bronkopulmoner hastalık, sigara içme, humoral immüniteyi azaltan durumlar, dalağın fonksiyonel veya anatomik yokluğu, malnütrisyon ve alkolizm gibi predispozan faktörler, kişilerin pnömokok infeksiyonlarına duyarlılığını artırır (18, 19).

İnvaziv hastalık etkeni olan pnömokoklarda serogrupların yaş, cinsiyet ve coğrafi bölge gibi değişkenlerle ilişkisi araştırılmış ve sonuçta cinsiyet ile serogrup arasında anlamlı bir ilişki gösterilemezken, yaş ve coğrafi bölgenin önemli olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmaya göre Avrupa ve Kuzey Amerika'da serogrup 19 ve 23 yaygınken, Güney Afrika'daki invaziv infeksiyonlardan daha çok serogrup 1 ve 5'in sorumlu olduğu bulunmuştur. Çocukluktan sonra serogrup/serotip 6, 14, 19, 23 ile infeksiyon riskinde azalma gözlenirken, serogrup 3 ve 8'in orta yaştan sonra arttığı, serotip 1 ile olan riskin ise yaşam boyunca giderek azaldığı gösterilmiştir (28).

#### 2. 4. Pnömokokarda antibiyotik direnci

Penisiline dirençli ilk pnömokok 1967'de Avusturalya'da izole edilmiştir (29). Bu tarihten 1980 sonlarına dek çok az sayıda dirençli izolat bildirilmiştir. Ancak 1980'den sonra özellikle İspanya, Fransa, Doğu Avrupa, Kore, Amerika Birleşik Devletleri başta olmak üzere tüm dünyada %30'lara varan penisilin direnci bildirilmeye başlanmıştır (2). Penisilin ve kloramfenikole dirençli ilk çoğul dirençli suş 1977'de bildirilmiştir (30). Bunun ardından penisilin, tetrasiklin, eritromisin, trimetoprim ve kloramfenikole çoğul direnç gösteren kökenler izole edilmeye başlanmıştır.

Diğer gram-pozitif bakterilerin aksine *S. pneumoniae*'da plazmid aracılı beta-laktamaz yoktur. Pnömokoklarda penisilin direnci, hücre duvarının sentezi veya modifikasyonunda yer alan penisilin bağlayan proteinlerde (PBP) değişiklikler sonucu meydana gelir. Bu değişim mutasyon veya gen transferi yoluyla oluşur (31). Sonuçta PBP'lerin beta-laktam affinitelerinde azalma olur ya da affinitesi düşük yeni PBP'ler sentezlenir (10). Pnömokoklarda Tablo I'de gösterildiği gibi altı tip PBP vardır (32).

Tablo I: PBP tipleri ve molekül ağırlıkları

PBP	Molekül Ağırlığı (Da)
PBP1a	98.000
PBP1b	95.000
PBP2a	81.000
PBP2b	79.000
PBP2x	85.000
PBP3	43.000

PBP'lerden penisiline affinitesi en yüksek olan PBP3'tür. Daha sonra giderek azalan sırayla PBP1a, PBP 2x, PBP 2a, PBP 1b ve PBP 2b gelir (33).

PBP2b'deki en ufak bir değişiklik bile penisilin direnci gelişimi için yeterlidir. Ancak yüksek düzey penisilin direnci için hem PBP2b hem de PBP2x'de değişiklik gereklidir (34).

Baquero (35) pnömokoklarda penisiline direnç gelişimini beş evrede incelemektedir. Buna göre, "kriptik faz" denilen ilk evrede PBP'lerde mutasyonlar sonucu penisilin minimal inhibitör konsantrasyon (MİK)'unda hafif bir yükselme olur. İkinci evrede düşük düzey dirençli kökenler görülmeye başlar. Üçüncü evre "penetrasyon fazı"dır. Bu evrede kolay kolonize olabilen kökenler, lokal antibiyotik tüketiminin de etkisiyle insandan insana, ülkeden ülkeye yayılır. Dördüncü evrede PBP'leri kodlayan *pbp* genlerinde değişiklikler meydana gelir. Değişmiş *pbp1a* ve *pbp2x* genlerini taşıyan kökenler düşük düzey dirençli iken, değişmiş *pbp2b*'nin kazanılmasıyla yüksek düzey direnç fenotipi ortaya çıkar. Son evrede ise gruba özgül bağışıklık gelişmesi ve toplumun dirençli kökenlerle saturasyonu nedeniyle penisilin direnci stabilize olur.



Serogrup/serotip 1, 3, 4, 5, 11, 18, 25'de penisiline dirençli kökenler çok nadir iken, en çok penisilin direnci görülen serogruplar 6, 9, 14, 19 ve 23'tür (7, 8).

Pnömonoklarda penisiline direnç araştırmaları sırasında penisiline tolerans da gösterilmiştir. Güney Afrika Cumhuriyeti'nde çoğul dirençli pnömonokların büyük kısmında penisiline tolerans bulunmuştur. Bu kökenlerde otolitik aktivite çok düşüktür. Otolitik enzimden yoksun mutantlar beta-laktamlarla inhibe olabilirler ancak lize olmazlar (36).

Geniş spektrumlu sefalosporinlere direnç ise ancak PBP1a ve PBP2x'deki değişikliklerle mümkün olmaktadır (37). 1989'a dek üçüncü kuşak sefalosporinlere direnç yokken bu tarihten itibaren sefotaksim ve seftriakson için MİK'u  $\geq 0.5$   $\mu\text{g/mL}$  olan kökenler bildirilmeye başlanmıştır (38). Kaliforniya'da izole edilen bir kökende PBP1b ve PBP2b'de değişiklik saptanmış ve bu kökenin hücre duvarı peptid paterninin de diğer beta-laktam dirençli kökenlerden farklı olduğu bulunmuştur. Bu çalışmaya göre bunun yeni bir beta-laktam dirençli klon olduğu iddia edilmektedir (39).

Pnömonoklarda tedavide kullanılan diğer antibiyotiklere direnç mekanizmaları Tablo II'de özetlenmiştir (40).

Dirençli pnömonokların yayılımı klonal yayılım ya da horizontal gen transferi ile olur (3). Klonal yayılım nedeniyle dirençli kökenler coğrafi olarak birbirinden çok uzak bölgeler arasında bile yayılabilir. Penisiline dirençli pnömonokların yayılması ve invaziv hastalık oluşturmasında yaş, immün yetmezlik ve beta-laktam antibiyotik kullanım hikayesi önemli rol oynar. Özellikle de antibiyotik kullanımına bağlı selektif baskı yüksek düzey dirençli suşlarla kolonizasyon ve infeksiyon için önemli risk faktörüdür (7, 41, 42).

Tablo II: *S. pneumoniae*'da Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları

Antimikrobik İlaç	Direnç Mekanizmaları
Beta-laktamlar	PBP'in ilaca affinitesinde değişiklik
Kloramfenikol	Kloramfenikol asetil transferaz yoluyla ilacın modifikasyonu
Makrolid	Makrolid, Linkozamid ve StreptograminB (MLS) tipi direnç. ermAM geni yoluyla 23S ribozomal RNA metilasyona uğrar ve ilacın bağlanması engellenir
Kanamisin	Fosfotransferazla ilacın modifikasyonu
Kinolonlar	DNA gyrase'ın azalmış affinitesi ? İlaç permeabilitesinin azalması ?
Sülfonamidler	Dihidropteroat sentazın azalmış affinitesi ?
Tetrasiklin	tetM geni yoluyla ribozomal protein sentezi ilaçtan korunur
Trimetoprim	Dihidrofolat redüktazın azalmış affinitesi ?

İzlanda'da 1989-1992 yılları arasında izole edilen ve serogrup 6B'de yer alan çoğul dirençli pnömokokların, İspanya'da izole edilen kökenlerden serotipik ve genotipik olarak farksız olduğu bulunmuştur. Bu klonun İzlanda'ya İspanya'da tatilini geçiren aileler tarafından getirilmiş olduğu düşünülmüştür (4).

*Pbp* genlerinin ve serotipi belirleyen genlerin horizontal yayılımı genetik heterojenitenin nedenidir. Aynı DNA paternini gösteren suşların farklı PBP profili göstermeleri ve farklı serotiplere ait olmaları doğaldır (43). Munoz ve ark. (5), ikisi İspanya, diğerleri Macaristan ve Alaska kökenli dört klonu incelemiş ve her bir klonda PBP profillerin, PspA tiplerinin ve multilokus enzim analizi ile genotiplerinin aynı olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmaya göre taksonomik olarak ilişkili streptokok türlerinden gen segmentlerinin alımıyla çok yüksek sıklıkta bağımsız olarak penisilin direnci ortaya çıkmaktadır. Bu genler bir kez alındıktan sonra horizontal gen aktarımı yoluyla değişik pnömokok kökenleri arasında yayılmaktadır.

Penisiline dirençli pnömokokların epidemiyolojisini anlamak için dirençli

izolatların yayılımı (klonal yayılım) ile direnç genlerinin yayılımı (horizontal yayılım) birbirinden ayırt edilmelidir. Bu da ancak moleküler yöntemlerle genetik determinantların belirlenmesi ile mümkündür. Bu amaçla kullanılan yöntemlerden biri, tüm dünyada çok popüler olan “pulsed-field gel electrophoresis” (PFGE)’dir (44). Lefevre ve ark. (45) epidemiyolojik olarak bağımsız pnömokok kökenleri arasındaki genetik benzerlik ya da farklılığın belirlenmesinde bu yöntemin mükemmel olduğunu kanıtlamışlardır. PFGE ile kromozom analizi, karşılaştırılabilir DNA pateni oluşturması, tekrarlanabilirliğinin iyi olması, organizmaya özgü olmaması ve birkaç gün gibi kısa sürede sonuçlanması nedeniyle geleneksel epidemiyolojik moleküler yöntemlere üstünlük kazanmıştır (44, 46).

### **2. 5. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)**

Elektroforez, yüklü molekülleri büyüklüklerine göre ayırmak için kullanılan bir yöntemdir. Konvansiyonel elektroforezde yürütülebilen en küçük DNA parçası 50 kilobaz iken, PFGE sayesinde 10 megabazlık (mb) parçalar bile yürütülebilir hale gelmiştir (44, 46).

Bu yöntemde jel içerisine bir sıra katod ve tek noktalı bir anod konmuştur. Bu sayede birbirine dik iki elektrik akımı oluşturulur. Düzenli aralıklarla akım uygulanır ve sonuçta “rare-cutting endonuclease” ile kesilmiş olan DNA parçaları, büyük parçalar jelin uç kısmında, küçükler uzakta olacak şekilde sıralanır. Boyama sonrası elde edilen bandlar yorumlanarak kökenlerin ne derece benzer olduğu belirlenir (44, 47).

Yöntemi etkileyen faktörler şu şekilde özetlenebilir:

1. DNA konsantrasyonu arttıkça hareket azalır ve bandlar diffüz görünür.
2. Agaroz konsantrasyonu arttıkça DNA parçalarının hareketi azalır. En iyi rezolüsyon %1.2-1.5 konsantrasyonda sağlanır.
3. En yaygın kullanılan voltaj 6V/cm’dir. 2 mb’dan büyük DNA parçalarının

hareketi akım kuvvetiyle artar, ancak bandın netliği bozulabilir.

4. Pulse sayısı artıkcça ayrılabilen DNA parçalarının büyüklüğü artar. İdeal olan, pulse zamanını kısından uzuna doğru artırmaktır.
5. Hareket sıcaklık ile artar, ancak band netliği bozulur. Optimum ısı 14°C'dir (44).

## 2. 6. Pnömonokok infeksiyonlarından korunma

Ölü bakteri aşısı olan ilk kuşak pnömonokok aşısı bundan yaklaşık 80 yıl önce Sir Almroth Wright ve ark. tarafından bulunmuştur. Bindokuzyüzkırlı yıllarla birlikte birçok pnömonokok serotipinden elde edilmiş pürüfiye kapsüler polisakkarit aşuları üzerinde çalışılmaya başlanmıştır. Ancak bu yıllarda penisiline direnç söz konusu olmadığından bu aşı klinik kullanıma girememiştir. İlk kez 1977'de 14 serotipten elde edilen aşı için lisans alınmıştır. Bindokuzyüzseksenüç yılından itibaren en çok hastalık etkeni olan 23 serotipten elde edilmiş pürüfiye kapsüler polisakkarit aşısı kullanıma girmiştir (9).

Endikasyon varlığında kullanıldığında bu aşı çok etkilidir. Ancak bağışıklığın kalıcılığı yaşla ters orantılıdır. İki yaş altında bağışıklık gösterilememişken, 55 yaş ve üzeri erişkinlerde bağışık yanıtın yüksek olduğu belirlenmiştir (48). Bebeklerde, yaşlılarda, immünkompromize, splenektomili ya da orak hücre anemili ve HIV-pozitif hastalarda bu aşı yeterince immünojen değildir (49). Risk altındakilerde aşının etkinliği %77 iken immünsüprese hastalarda %0'dır (48). Buna rağmen eğer hastayla immünsüpresyonun minimal olduğu dönemde karşılaşılırsa mutlaka aşı denenmelidir.

Aşı uygulaması önerilen diğer gruplar şöyle sıralanabilir (50):

1. Altmış beş yaş ve üzeri insanlar
2. Pnömonokok infeksiyonları için riski artıran durumlar
  - Dalagın anatomik veya fonksiyonel yokluğu

- Kardiyovasküler hastalık
- Pulmoner hastalık
- Diabetes mellitus
- Alkolizm
- Siroz

İki yaş altı çocuklar ve immünsüprese hastalar için çıplak kapsüler polisakkaritin direkt olarak taşıyıcı bir proteine bağlanmasıyla elde edilen konjuge aşılarda daha immünojen olduğu gösterilmiştir (51). Ancak faz III çalışmaları yapılan bu aşılarda taşıma kapasitesi sınırlıdır. En gelişmiş olan 11 valanlı aşıda serotip 1, 3, 4, 5, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19F, 23F'e ait kapsüler polisakkaritler vardır. Yan etkisi olmayan, iyi tolere edilebilen aşılardır. Konjuge aşılarda nazofaringeal taşıyıcılığı azaltarak toplumda pnömokokların yayılımını sınırlayacağı, düzenli aşılarla invaziv ve dirençli suşları azaltacağı iddia edilmektedir (52).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

26. 11. 1997 – 10. 1. 2000 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Gevher Nesibe Hastanesi Bakteriyoloji Laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 193 pnömokok suşu çalışmaya alındı. Duyarlılık çalışmalarında kontrol suşu olarak *S. pneumoniae* American Type Culture Collection (ATCC) 49619, PFGE’de ise kontrol suşu olarak *S. pneumoniae* ATCC 49619 ve *Staphylococcus aureus* NCTC 8325 kullanıldı.

#### 3. 1. Bakteri identifikasyonu

Bakteri identifikasyonu için koloni morfolojisi ve Gram boyama özelliklerinin yanısıra optokin ve safrada erime testlerinden yararlandı. % 5 koyun kanlı agarda 6 mm’lik optokin diski ile 14 mm veya daha fazla zon oluşturan suşlar optokine duyarlı kabul edildi. Safrada erime testi için koyun kanlı agardaki 18 saatlik kolonilerden % 0,9 serum fizyolojik içerisine 0.5 Mc Farland bulanıklığına eşdeğer bakteri süspansiyonu hazırlandı ve yarısı steril koşullarda bir başka boş tüpe aktarıldı. Tüplerden birine

1:10'luk sodyum deoksikolat solüsyonu damlatıldı. 37 °C'de 2 saatlik inkübasyondan sonra deoksikolat solüsyonu damlatılan tüp berraklaştığında safrada erime testi olumlu olarak değerlendirildi (53).

### 3. 2. Serotiplendirme

Suşların serotiplendirilmesinde ortak antijenik determinantlarına göre havuzlandırılmış 12 antiserumdan oluşan Pneumotest kiti (Statens Serum Institut, Denmark) kullanıldı. Mikroskopun 100'lük objektifinde her sahada 10 civarında mikroorganizma görülebilecek şekilde % 0,9 serum fizyolojik içerisinde bakteri süspansiyonu hazırlandı. Suşlar üretici firmanın önerdiği Şekil 1'de görülen dama tahtası metoduna göre antiserumlarla karşılaştırıldı.

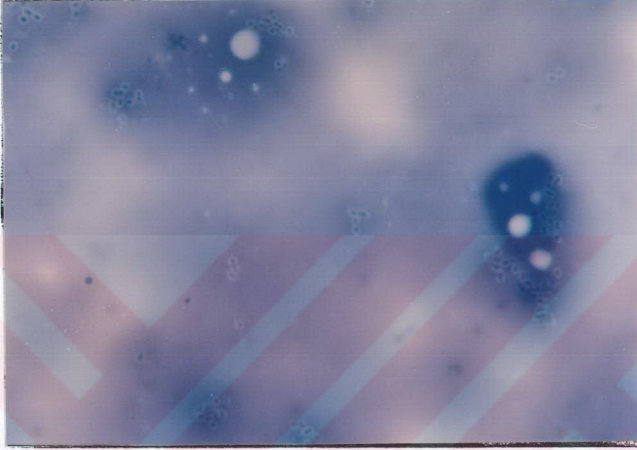
Havuzlandırılmış antiserumlar	P	Q	R	S	T
A	1	18	4	5	2
B	19	6	3	8	
C	7				20
D			9		11
E			12	10	33
F				17	22
H	14	23		15	

Şekil 1: Serotiplendirmede kullanılan dama tahtası metodu

Bakteri süspansiyonundan otomatik pipetle alınan 5 µL'lik bir damla eşit miktarda antiserumla lam üzerinde karıştırıldı. 2-3 dakika bekledikten sonra metilen mavisi damlatılarak üzeri lamelle kapatıldı. İmmersiyon objektifi ile yapılan incelemede mavi boyanmış mikroorganizma ve etrafında boyanmamış bir hale görülmesi durumunda Quellung reaksiyonu olumlu olarak değerlendirildi (Şekil 2). Önce sırasıyla B, A, C, H, D, E, F antiserumları ile kapsüller reaksiyon araştırıldı. Bunlardan herhangi biri ile olumlu reaksiyon görüldüğünde bu kez sırasıyla P, Q, R, S ve T antiserumları ile



karşılaştırıldı. Şekil 1'deki dama tahtası metoduna göre yukarıdan aşağıya ve soldan sağa olumlu kapsüller reaksiyon görülen antiserumların kesiştiği nokta serotip/serogrup olarak belirlendi. Herhangi bir antiserumla kapsüller reaksiyonun görülmediği suşların tiplendirilemediği kabul edildi.



Şekil 2: *S. pneumoniae* 'de olumlu Quellung reaksiyonu

### 3. 3. Duyarlılık testleri

Penisilin direnci National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (54) doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ile 1µg oksasilin içeren diskler kullanılarak araştırıldı. Ayrıca suşların penisilin ve sefotaksim duyarlılıkları E-test ( AB Biodisk, İsveç ) yöntemi ile belirlendi. Bakterilerin 24 saatlik saf kültürlerinin Mueller-Hinton buyyonda Mc Farland 0.5 bulanıklığına eşdeğer süspansiyonları hazırlandı. Bu süspansiyonlardan steril eküvyonlar aracılığı ile 4 mm kalınlığında dökülen %5 koyun kanlı Mueller-Hinton agar yüzeyine sürüldü ve 10-15 dakika içinde besiyerleri üzerine penisilin ve sefotaksim içeren E-test şeritleri kondu. Plaklar %5 CO<sub>2</sub> li ortamda 35°C' de 18 saatlik inkübasyona bırakıldı. E-testler için okuma sırasında üretici firmanın



önerileri doğrultusunda inhibisyon zonunun antibiyotikli şeridi kestiği noktadaki antibiyotik konsantrasyonu MİK olarak kabul edildi ve sonuçlar değerlendirildi. E-test ile penisilin MİK'i 0.06 µg/mL'ye eşit ve daha küçük olanlar duyarlı, MİK'i 0.1 µg/mL ile 1 µg/mL arasında olanlar düşük düzey dirençli, MİK'i 2 µg/mL'ye eşit ya da daha büyük olanlar yüksek düzey dirençli suşlar olarak tanımlandı. Oksasilin diski kullanılarak yapılan disk diffüzyon yönteminde inhibisyon zonu 20 mm'ye eşit ve daha büyük olan suşlar penisiline duyarlı, 19 mm'ye eşit ve daha küçük olanlar penisiline dirençli olarak belirlendi. Sefotaksim için MİK'i 0.5 µg/mL veya daha küçük olanlar duyarlı, MİK'i 2 µg/mL veya daha büyük olanlar dirençli olarak kabul edildi.

### 3. 4. PFGE

Çalışmanın bu bölümü H. Ü. T. F İnfeksiyon Hastalıkları Ünitesi'nde yapıldı. *S.pneumoniae* suşlarının DNA'ları Soares'in (4) tarif ettiği yöntemle göre agaroz bloklar şeklinde hazırlandı. Erken stasyonier faz hücreleri (OD<sub>590</sub>, 0.7-0.9) içeren 6 mL'lik kültür pellet haline getirildi ve 1 mL PIV (10mM Tris pH 8.0, 1.0 M NaCl) ile yıkandı. Daha sonra 200 µL PIV ile tekrar süspansiyon haline getirildi. Hücre süspansiyonları PIV ile OD<sub>620</sub>'de 0.05-0.15 olacak şekilde ayarlandı. Bu süspansiyon 100 µL % 1.5 "low melting agarose" ile 1:1 oranında dilüe edildi. Buradan 20 µL'lik agaroz diskler yapıldı ve -20°C'de 5 dakika donmaya bırakıldı. Hücreler 50 µL RNase içeren 1 mL EC-lizis solüsyonu (6 mM Tris pH 8.0, 1 M NaCl, 100 mM EDTA pH 8.0, % 0.2 sodyum deoksikolat, % 0.5 sarkozil) içinde 37°C'de 3 saat inkübe edildi. Diskler daha sonra proteinaz K (1 mg/mL) içeren ES-tampon (0.5 M EDTA pH 9.0 ve % 1 sarkozil) içinde 50°C'de 17 saat inkübe edildi. Agaroz diskler 13 mL 1 X TE tampon (10 mM Tris pH 7.5 ve 1mM EDTA pH 8.0) ile herbiri 1 saat sürmek üzere 5 kez yavaşça çalkalanarak yıkandı ve DNA diskleri 4-5 mL 1 X TE tampon içinde 4°C'de saklandı.

DNA'nın kesilmesi için agaroz diskler önce 250 µL restriksiyon tamponu içinde 25°C'de 1 saat inkübe edildi. Daha sonra disk başına 20 U *Sma*I restriksiyon enzimi (Promega) içeren restriksiyon tamponu konarak 25°C'de bir gece inkübe edildi ve reaksiyon 5 µL yükleme tamponu ile durduruldu. Yürütme için 0.5 X TBE tampon (50 mM Tris, 50 mM borik asit, 0.2 mM EDTA) içinde % 1.1 agaroz jel (Genaxis) hazırlandı. DNA diskleri jele yerleştirildikten sonra 10°C'de 0.5 X TBE tampon içerisinde 210 V'luk bir güç kaynağı (Gen Navigator-Pharmacia) ile 22 saat sürecek olan yürütme işlemine başlandı. Pulse zamanları ilk 5 saat için 5 s, 6 saat için 10 s, 6 saat için 30 s ve son 5 saat için 60 s olarak programlandı. Molekül ağırlık standardı olarak λ-ladder (Sigma) kullanıldı. Yürütme bittikten sonra jel etidyum bromid ile boyandı ve ultraviyole ışık altında fotoğraflandı.

*Sma*I makrorestriksiyon paternlerinin karşılaştırması yapılarak farklı PFGE paternleri harflerle isimlendirildi. Restriksiyon paterninde 3 fragmentten fazla farklılık gösteren suşlar farklı major paternler olarak belirlenirken, 3 veya daha az farklılık gösterenler major paternlerin subtipleri olarak yorumlandı (55).

## 4. BULGULAR

Çalışmaya alınan 193 *S. pneumoniae* suşunun 122 (% 63)'si erişkin 71 (% 37)'i çocuk hastalara ait klinik örneklerden izole edildi. Suşların izole edildiği klinik örnekler Tablo III'de gösterildi.

Tablo III: *Streptococcus pneumoniae* suşlarının izole edildiği klinik örnekler

Klinik Örnek	Sayı	%
Balgam	49	25.5
Beyin Omurilik Sıvısı	34	18
Kulak akıntısı	33	17
Kan	26	13.5
Göz	22	11.5
Plevra sıvısı	10	5
Yumuşak doku	8	4
Nazotrakeal aspirat	7	4
Bronkoalveoler lavaj	2	1
Periton sıvısı	1	0.5
<b>Toplam</b>	<b>193</b>	<b>100</b>

Bir  $\mu\text{g}$  oksasilin içeren disk kullanılarak yapılan duyarlılık taramasında penisiline duyarlı 124 suş bulunurken, 69 suş dirençli olarak belirlendi. E-test şeritleri ile MİK değerlerine bakıldığında 149 suş penisiline duyarlı bulunurken 44 suş penisiline orta düzey dirençli bulundu. Oksasilin yöntemi ile direnç saptanan 69 suştan 25 (%36)'inin E-test ile penisiline duyarlı olduğu belirlendi. Suşların penisiline duyarlılık durumu Tablo IV'de gösterildi.

Tablo IV: Yüzdoksanüç *Streptococcus pneumoniae* suşunda penisiline duyarlılık durumu

Duyarlılık	Sayı	%
Duyarlı (MİK < 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	149	77
Düşük düzey dirençli (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ $\geq$ MİK $\geq$ 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	44	23
Yüksek düzey dirençli (MİK > 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	0	0
<b>Toplam</b>	<b>193</b>	<b>100</b>

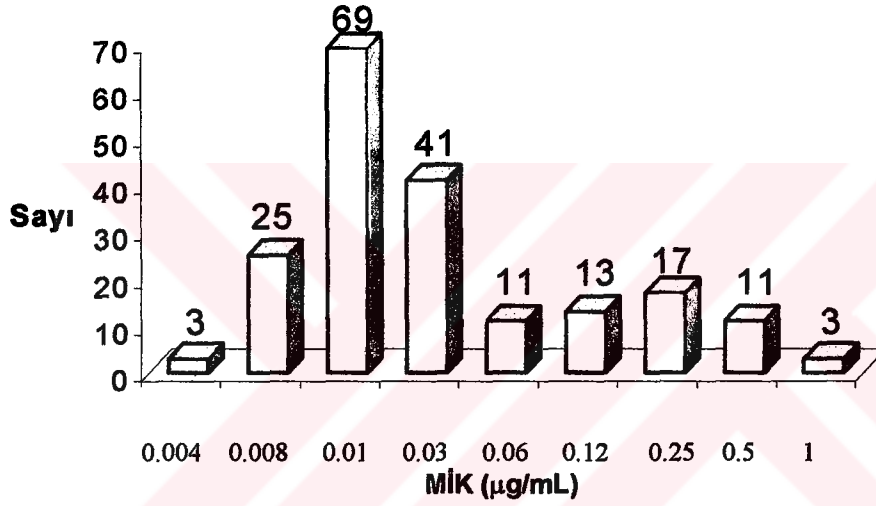
Suşların penisilin için MİK aralıkları, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri Tablo V'de, MİK dağılımları ise Tablo VI'da ve Şekil 3'te gösterildi.

Tablo V: *Streptococcus pneumoniae* suşlarının penisilin için MİK aralıkları, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri

Antibiyotik	MİK ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )		
	Aralık	MİK <sub>50</sub>	MİK <sub>90</sub>
Penisilin	0.004 - 1	0.01	0.25

Tablo VI: *Streptococcus pneumoniae* ve penisilin için MİK dağılımları (n : 193)

MİK	0.004	0.008	0.01	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1
n	3	25	69	41	11	13	17	11	3
%	1.5	13	35.5	21	6	6.5	9	6	1.5

Şekil 3: *Streptococcus pneumoniae* ve penisilin için MİK dağılımları (n : 193)

Beyin omurilik sıvısı izolatlarının çocuk ve erişkin hastalardaki duyarlılık durumları incelendi ve bulgular Tablo VII’de özetlendi. Erişkin hastalara ait BOS örneklerinden izole edilen suşlarda penisilin direnci gözlenmez iken, çocuk hastalarda suşların % 33’ü penisiline orta düzey dirençli olarak bulundu.

Tablo VII: BOS'ından izole edilen *Streptococcus pneumoniae* suşlarının duyarlılık durumu

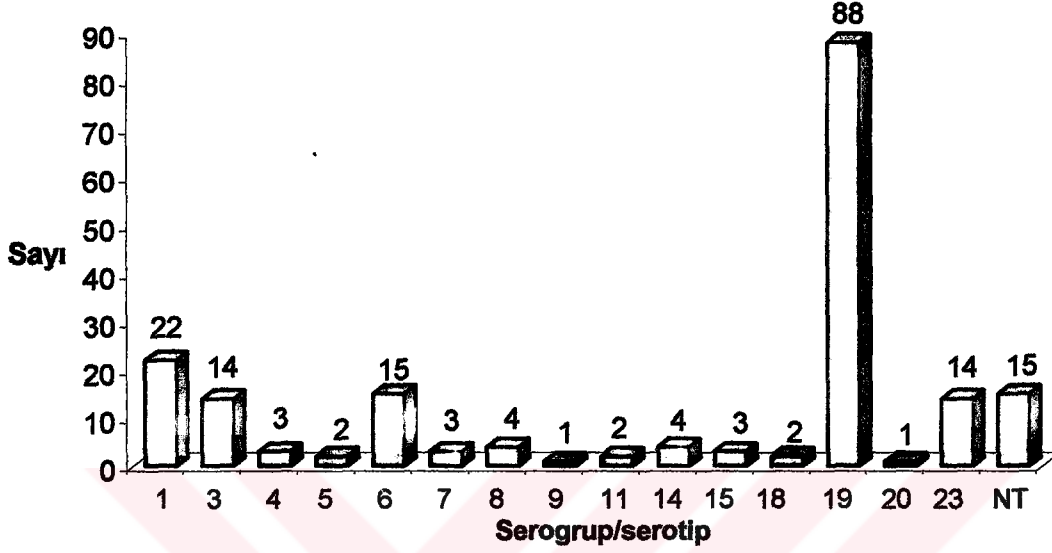
	Duyarlı		Dirençli		Toplam	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
<b>Erişkin</b>	12	100	0	0	12	100
<b>Çocuk</b>	14	67	7	33	21	100

Penisiline dirençli suşlarda sefotaksim için MİK aralıkları MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri Tablo VIII'de gösterildi.

Tablo VIII: Penisiline orta düzey dirençli pnömokoklarda sefotaksim için MİK aralıkları, MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri

Antibiyotik	Aralık	MİK (µg/mL)	
		MİK <sub>50</sub>	MİK <sub>90</sub>
Sefotaksim	0.01-0.5	0.12	0.5

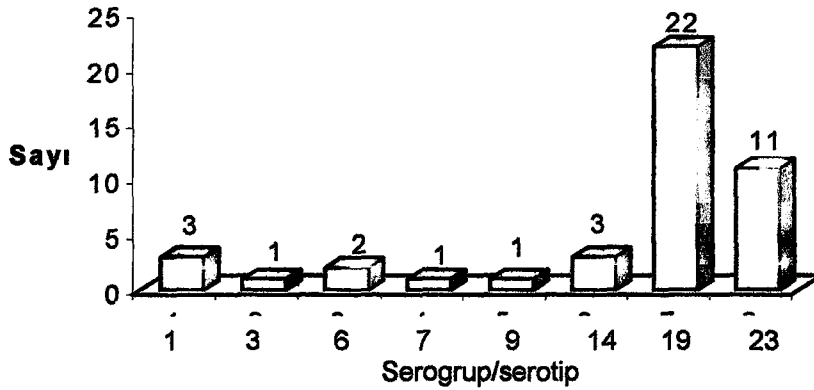
Serotiplendirme sırasında suşların sırasıyla en çok serogrup/serotip 19 (n=88), 1 (n=22) ve 6 (n=15)'ya ait olduğu gözlemlendi. Suşların 15 (% 8)'i hiçbir antiserumla reaksiyon vermedi. Suşların serogrup/serotip dağılımı Şekil 4'de gösterildi.



Şekil 4: *Streptococcus pneumoniae* suşlarının serogrup/serotip dağılımı

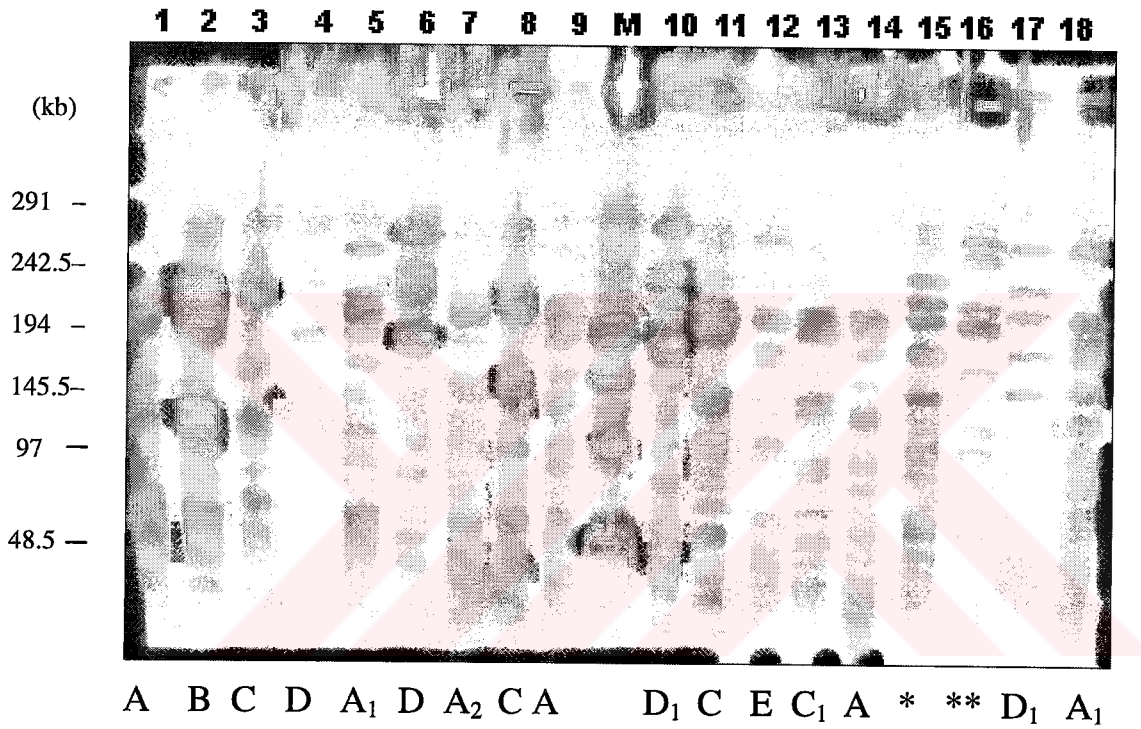
(NT: Tiplenemeyen)

Dirençli suşlarda ilk sırayı serogrup 19 (n=22) ve 23 (n=11)'ün aldığı gözlemlendi. Penisiline orta düzey dirençli suşların serogrup/serotip dağılımı Şekil 5'te gösterildi.



Şekil 5: Penisiline orta düzey dirençli pnömokokların serogrup/serotip dağılımı

Penisiline orta düzey dirençli 44 pnömokok suşunda PFGE ile 8 (A-H) farklı ana klon belirlendi. A klonunda 3 farklı subtip belirlenmekle birlikte, suşların 18 (% 41)'inin A klonuna ait olduğu görüldü. C klonuna ait 6, D klonuna ait 5, E ve F klonlarına ait 4'er, B ve G klonlarına ait 3'er, H klonuna ait 1 suş saptandı. Bu çalışmada belirlenen belli başlı klonlar Şekil 6'da gösterildi.



Şekil 6: Sma I ile kesilerek elde edilmiş belli başlı PFGE paternleri.

M: Moleküler ağırlık standardı (kb),

\*: *S.aureus* NCTC 8325, \*\*: *S. pneumoniae* ATCC 49619

Penisiline orta düzey dirençli 44 pnömokok suşuna ait epidemiyolojik veriler, penisilin ve sefotaksim MİK değerleri, serotipleri ve PFGE tipleri Tablo IX'da gösterildi.



Tablo IX: Penisiline orta düzey dirençli 44 pnömokok suşuna ait epidemiyolojik veriler, penisilin ve sefotaksim MİK değerleri, serotipleri ve PFGE tipleri

Suş no	İzolasyon tarihi	Örnek	Erişkin/çocuk	Penisilin MİK	Sefotaksim MİK	Serotip	PFGE tip
76	26.11.97	Göz	E	0.12	0.03	23	D <sub>1</sub>
79	1.12.97	Balgam	E	0.12	0.12	7	A
82	9.12.97	Kulak	Ç	0.5	0.5	14	A <sub>1</sub>
95	11.1.98	Kulak	Ç	0.25	0.25	19	A <sub>1</sub>
98	15.1.98	Kulak	Ç	0.5	0.12	14	A <sub>1</sub>
100	16.1.98	Kan	E	0.12	0.12	19	A
101	17.1.98	Kan	E	0.5	0.06	3	C
102	18.1.98	Kan	E	0.25	0.25	1	A
104	22.1.98	Balgam	E	0.25	0.06	9	A <sub>1</sub>
106	17.2.98	Göz	Ç	0.5	0.12	23	A <sub>1</sub>
112	12.3.98	Göz	Ç	0.25	0.06	19	D <sub>1</sub>
115	19.3.98	BOS	Ç	0.12	0.12	19	C
123	2.5.98	BOS	Ç	0.25	0.06	23	B <sub>1</sub>
125	8.5.98	Kulak	Ç	0.5	0.06	23	D
137	21.7.98	Göz	Ç	0.25	0.06	23	E
140	3.8.98	Balgam	E	0.25	0.25	19	A <sub>2</sub>
144	28.8.98	Kan	E	0.5	0.25	14	E <sub>1</sub>
160	3.11.98	Kan	E	0.12	0.12	6	A <sub>2</sub>
162	13.11.98	Plevra	E	0.25	0.12	19	A <sub>1</sub>
164	18.11.98	BOS	Ç	0.25	0.12	23	F
191	10.2.99	Balgam	E	0.25	0.25	19	F
193	18.2.99	Kulak	Ç	0.25	0.12	19	G
202	17.3.99	Balgam	E	0.25	0.12	19	G
205	6.4.99	BOS	Ç	0.5	0.12	19	G
206	16.4.99	NTA	Ç	0.12	0.12	6	F
207	21.4.99	Kan	E	0.5	0.25	19	A
208	20.4.99	Plevra	Ç	1	0.5	19	C
211	26.4.99	Plevra	E	0.12	0.12	19	A
213	5.5.99	BOS	Ç	0.12	0.12	19	B <sub>2</sub>
218	27.5.99	NTA	E	0.25	0.5	1	F
220	30.5.99	Balgam	E	0.12	0.03	19	B
222	17.6.99	Kan	Ç	1	0.5	19	C
233	3.8.99	Balgam	E	0.25	0.12	19	E <sub>2</sub>
234	5.8.99	BOS	Ç	0.25	0.12	19	D
237	9.8.99	NTA	E	0.25	0.12	19	A <sub>1</sub>
245	20.9.99	Kulak	Ç	0.12	0.12	19	D <sub>1</sub>
246	22.9.99	Plevra	E	0.5	0.5	19	A <sub>2</sub>
247	5.10.99	BOS	Ç	1	0.5	23	C
249	16.10.99	Kulak	Ç	0.12	0.25	19	A
261	27.11.99	NTA	E	0.5	0.12	23	H
273	4.1.00	NTA	E	0.25	0.25	1	A
275	4.1.00	Balgam	E	0.12	0.01	23	E
277	6.1.00	Kulak	Ç	1	0.5	23	C <sub>1</sub>
279	10.1.00	Balgam	E	0.12	0.12	23	A

## 5. TARTIŞMA

Bindokuzyüzaltmış'lı yıllara dek pnömokoklar penisiline duyarlı kabul edilirken, 1967'de Avustralya'da ilk penisiline dirençli pnömokok suşunun izole edilmesiyle birlikte pnömokoklarda penisilin direnci gündeme gelmiştir (29). Bu tarihten itibaren de pnömokoklarda penisiline ve diğer birinci basamak antibiyotiklere giderek artan direnç pnömokoklarla gelişen infeksiyonların tedavisinde sorun oluşturmaya başlamıştır (1, 2). Başta İspanya (56), Macaristan (57), Güney Afrika (58) ve Kore (59) olmak üzere bazı ülkelerde penisilin direncinin % 60'lara ulaştığı bildirilmektedir. Sınırlı antibiyotik kullanım politikalarının uygulandığı Hollanda, Almanya ve İskandinav ülkeleri gibi ülkelerde ise penisiline dirençli pnömokok oranı düşüktür (60). Bununla birlikte antibiyotik kullanımının sınırlanmadığı Yunanistan (61), Bangladeş (62) gibi bazı ülkelerde direncin neredeyse bu düzeylerde olması ilginçtir.

Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda da bulgular yüksek düzey penisilin direncinin % 0-17 arasında değiştiğini göstermektedir (63-72). Bu çalışmada da orta düzey penisilin direnci %23 iken, penisiline yüksek düzey dirençli suşa rastlanmamıştır. Türkiye’de pnömokoklarda penisilin direncini belirlemeye yönelik yapılan çalışmaların bulguları Tablo X’da özetlenmiştir.

Tablo X: Türkiye’de pnömokoklarda penisilin direncini belirlemeye yönelik çalışmalar

Çalışma grubu	İzolat sayısı	ODD %	YDD %	Yöntem	Yıl	Kaynak
Tunçkanat	68	26.3	7.3	Agar dilüsyon	1992	63
Gür	70	30	17	Agar dilüsyon	1994	64
Sümerkan	49	22	0	Agar dilüsyon	1992-94	65
Öngen	41	34	0	Agar dilüsyon	1994-5	66
Çavuşoğlu	84	30.8	1.2	Agar dilüsyon	1996	67
Özalp	53	40	2	E-test	1997	68
Kocagöz	86	21	3.5	E-test	1997	69
Kanra	88	31	2	E-test	1997	70
Gönüllü	80	31.3	10	E-test	1998	71

ODD: Orta düzey direnç      YDD: Yüksek düzey direnç

Kayseri ve yöresinde 1992’den beri yapılan çalışmalarda penisiline yüksek düzey dirençli pnömokok suşuna rastlanmamıştır. Kayseri yöresinde penisilin direncini belirlemeye yönelik çalışmalara ait bulgular Tablo XI’de özetlenmiştir.

Tablo XI: Kayseri yöresinde pnömokoklarda penisilin direncini belirlemeye yönelik çalışmalar

Yıl	İzolasyon sayısı	ODD %	YDD %	Yöntem	Kaynak
1992-1994	49	22	0	Agar dilüsyon	65
1996-1997	68	21	0	E-test	72
1997-2000	193	23	0	E-test	*

\*: Bu çalışma

Yüksek düzey dirençli suşların seleksiyonunun en önemli sebebi  $\beta$ -laktamlar, özellikle de aminopenisilinlerin aşırı kullanımınıdır (41-42). Çünkü  $\beta$ -laktamlar orofarinkste bulunan penisiline dirençli *S. pneumoniae* suşlarının ve pnömokoklardaki PBP değişikliklerine öncülük eden genler için rezervuar görevi yapan diğer penisiline dirençli oral streptokokların seleksiyonuna yol açarlar. Bununla birlikte serotip 6B, 23F gibi çoklu antibiyotik direnci gösteren suşlar bir kez seleksiyona uğradıktan sonra, eritromisin, ko-trimoksazol gibi  $\beta$ -laktam dışı antibiyotiklerin aşırı tüketimiyle bu suşların oranı hızla artar (73). Ko-trimoksazol ve eritromisin ile ampisiline göre penisilin dirençli pnömokok seleksiyonunun çok daha fazla olduğunu gösteren çalışmalar da vardır (7, 74).

Penisiline dirençli pnömokoklar bir kez seleksiyona uğradıktan sonra, bazı risk gruplarında kolayca kolonize olmakta ve infeksiyon oluşturmaktadır (7, 41, 75). Bu risk grupları Tablo XII'de gösterilmiştir.

Tablo XII: Penisiline dirençli pnömokoklar ile kolonizasyon ve infeksiyon için risk faktörleri

Risk Faktörleri	
1.	Son 6 ay içerisindeki antibiyotik kullanımı
-	β-laktamlar
-	Eritromisin
-	Kotrimoksazol
2.	Yaş
-	< 15: gelişmemiş immünite
-	> 70: immüno depresyon
3.	Otite eğilimli yapı
4.	Son 3 ay içerisinde hastanede yatma öyküsü
5.	Antibiyotik profilaksisi
6.	HIV infeksiyonu
7.	Nozokomiyal pnömoni
8.	Alkolizm
9.	Prevalansın yüksek olduğu bölgede yaşama

Bu risk faktörleri incelendiğinde kısıtlı antibiyotik kullanım politikalarının uygulanmadığı ülkemizde henüz pnömokoklarda penisilin direncinin çok yüksek olmaması ilgi çekicidir. Ancak ekonomik nedenlerle antibiyotik profilaksisi ya da tedavisinin sınırlı kalması, HIV infeksiyonunun ülkemizde yaygın olmaması ve belki de ülkemizin dünyada problem olan çoklu dirençli *S. pneumoniae* klonları ile henüz tanışmamış olması bu durumu açıklayabilir.

Baquero (35), pnömokoklarda penisilin direnci gelişimi ve toplumda yayılması sürecini beş evrede incelemektedir. Bu evrelerin en önemlisi, toplumda direncin ilk olarak ortaya çıktığı ve bu suşlarla kolonizasyonun başladığı “evolutive faz”dır. Bu dönemde süratle önlem alınmalıdır. Çünkü bu dönemden sonraki “penetrasyon fazı”nda yüksek düzey dirençli suşlar ortaya çıkar ve yayılır. Ancak 1992 yılından beri Kayseri yöresi’nde bu konuda yapılan çalışmalarda bulgular, bu çalışmada da olduğu gibi Baquero’nun hipotezini desteklememektedir. Çünkü 1992’den beri bu yörede penisiline

yüksek düzey dirençli pnömokok suşu saptanamadığı gibi, orta düzey dirençli suş oranı da % 20-23 arasında kalmıştır (65, 72). Türkiye'deki bulguların aksine Fransa, Macaristan, İspanya gibi birçok ülkede penisiline direncin hızla arttığını gösteren çalışmalar vardır (57, 76, 77). Örneğin İspanya'da 1979'da % 6 olan orta düzey penisilin direnci, 1996'da % 30.3'e; 1979'da % 0 olan yüksek düzey penisilin direnci % 11.7'ye çıkmıştır (77). Yine 1996-1997 yılları arasında üst solunum yolu infeksiyonu olan hastalardan izole edilen *S. pneumoniae* suşlarında yüksek düzey penisilin direnci % 37 olarak bulunmuştur (56). Amerika Birleşik Devletleri'nde 1980'lerde % 3.8 olan penisilin direnci 1992'de % 17.8'e, 1997'de ise % 43.8'e yükselmiştir (78).

Pnömokoklarda hızla artan ve tedavide problem oluşturan penisilin direnci sorunu, penisilin direncinin belirlenmesine yönelik kolay uygulanabilir yöntemleri gündeme getirmiştir. NCCLS'a göre 1µg oksasilin diski kullanılarak disk diffüzyon yöntemi ile yapılan testi rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılabilir bir testtir (54). Ancak selektif antibiyotik baskısı altında düşük affiniteli PBP2X'lerin kazanılmasıyla pnömokoklar penisiline duyarlı oldukları halde oksasiline dirençli görülebilirler. Bu da suşun yanlışlıkla penisiline dirençli rapor edilmesine neden olabilir (79). Bu çalışmada da oksasilin yöntemi ile direnç saptanan 69 suştan 25 (% 36)'inin E-test ile duyarlı bulunurken, oksasiline duyarlı olduğu halde penisiline dirençli suşa rastlanmamıştır.

Oksasilin testi duyarlı bir test olmakla birlikte yüksek düzey ve orta düzey dirençli suşların ayırımında yetersizdir. Özellikle pnömokok menenjitlerinde bu ayırımın yapılması şarttır. Çünkü menenjit dışı infeksiyonlarda eğer etken orta düzey dirençli bir pnömokok ise yüksek doz penisilinle bu infeksiyonların tedavisi mümkündür. Ancak orta düzey dirençli bir pnömokoklarla meydana gelen menenjitlerde penisilinle tedavi söz konusu olamaz (80, 81). Bu nedenle MİK

belirlenmesi gereklidir. Bu amaçla, bugün *S. pneumoniae* için kullanılan standart yöntem sıvı dilüsyon yöntemi olmakla birlikte (54), E-test de duyarlılığı ve tekrarlanabilirliği ispatlanmış, uygulaması kolay bir yöntemdir (82, 83). Bu nedenle bu çalışmada E-test tercih edilmiştir.

Azalmış penisilin duyarlılığı gösteren pnömokokların tedavisinde bugün birinci tercih üçüncü kuşak sefalosporinlerdir (80, 81). Dördüncü kuşak sefalosporinlerin özellikle de sefpiromun dirençli pnömokok infeksiyonlarında etkili olduğu gösterilmiştir (37). Çok yaygın olmamakla birlikte bu gruba da direnç bildirilmeye başlanmıştır (84, 85). Bununla birlikte penisiline yüksek düzey ve sefalosporinlere orta düzey dirençli olduğu belirlenen pnömokoklar ile meydana gelen menenjitlerin bile üçüncü kuşak sefalosporinler ile başarıyla tedavi edilebileceği iddia edilmektedir (86). Türkiye'deki birçok çalışmada sefalosporinlere tam duyarlılık gösterilmişken (67, 72), nadir de olsa direnç bildiren çalışmalar da vardır (64, 69). Çalışmamızda da sefotaksime ne orta düzey ne de yüksek düzey dirençli suş saptanmamıştır. Yöremizde pnömokoklarda sefalosporin direnci sorunu olmadığı açıktır.

Nazofaringeal kolonizasyona, infeksiyona yol açan ya da antibiyotik direnci gösteren kapsüler serotipler yaş, coğrafi bölge ve sosyoekonomik duruma göre değişmektedir (87, 88). Risk faktörlerinin azaltılabilmesi ve invaziv infeksiyon oluşturan pnömokoklara karşı etkili aşılardan hazırlanabilmesi için değişik coğrafi bölgelerdeki veya toplumlardaki baskın serotiplerin belirlenmesi gereklidir.

Pnömokokların oluşturduğu 7000 invaziv infeksiyon epizodunun incelendiği çok merkezli bir çalışmada Avrupa ve Kuzey Amerika'da serogrup 19 ve 23 yaygın iken, Güney Amerika'da daha çok 1 ve 5'in invaziv hastalık oluşturduğu gözlenmiştir (28). Aynı çalışmada serogrup riskinin belirlenmesinde yaşın önemli olduğu vurgulanmaktadır.

Bugün, penisiline dirençli ya da çoklu antibiyotik dirençli pnömokok suşlarının birkaç serogrupla sınırlı olduğu bilinmektedir. Penisiline orta düzey dirençli suşlarda ise daha geniş bir serogrup yelpazesi söz konusu olmakla birlikte, yine dirençli suşlardaki serogruplar baskındır (89). Fransa (7, 76), Kenya (90), Güney Afrika (8), İspanya (91), Şili (92) ve Yunanistan (61)'dan bildirilen birçok çalışmada penisiline dirençli pnömokokların çoğunlukla serogrup/serotip 6, 9, 14, 19 ve 23'e, çoklu direnç gösteren suşların ise daha çok serotip 23F'e ait olduğu gösterilmiştir.

Türkiye'de serotiplendirme konusunda sınırlı sayıda araştırma vardır. Bunlarda da dirençli suşların sıklıkla serogrup 6, 9, 19 ve 23'e ait olduğu gösterilmiştir (67, 69, 70). Çalışmamızda ise tüm suşlarda sırasıyla serogrup/serotip 19, 1 ve 6 baskın iken, dirençli pnömokoklarda ilk sırayı serogrup 19 ve 23'ün aldığı görülmüştür (Şekil 4 ve 5). Serotiplendirilemeyen suş oranı %8'dir. Bu yönüyle bugün kullanılmakta olan 23 valanlı polisakkarit aşısındaki serotiplerin, yöremizde izole edilen pnömokok suşlarının %92'sini kapsadığı söylenebilir. Dirençli suşlarda ise aşı dışı bir serogruba rastlanmadığından aşının yararı açıktır. Türkiye de dahil olmak üzere tüm dünyadaki çalışmalarda 23 valanlı aşının yeterliliği konusunda benzer sonuçlar elde edilmiştir (61, 69, 70, 91, 92). Bununla birlikte bu aşının bağışıklık yanıtı oluşturma etkisi özellikle bebekler ve immün yetmezlikli hastalarda tartışmalıdır (49). Normal erişkin popülasyonda bile bu 23 valanlı polisakkarit aşının koruyuculuğu % 50-70'dir ve ilk yılın sonunda antikor düzeyinde belirgin azalma gözlenmektedir (93). Kapsüler polisakkarit aşısının zayıf immünojenite oluşturmaları nedeniyle pnömolizin, otolizin, nöraminidaz, PspA, PsaA gibi protein tabiatındaki bazı virülans faktörleri ile aşı çalışmaları başlamıştır. Ancak bunlardan sadece PspA faz I/II çalışmasına geçebilmiştir. Bugün faz III çalışmasına geçebilen ve özellikle risk grupları için 23 valanlı polisakkarit



aşıdan daha immünojen olduğu bilinen tek aşı çıplak kapsüller polisakkaritin direkt olarak taşıyıcı bir proteine bağlanması ile elde edilen konjuge aşılardır (51, 52, 94).

Bu aşılar taşıyıcı olarak tetanoz toksoidi, difteri toksoidi, CRM 197 (difteri toksoidinin mutanı), meningokokal dış membran kompleksi, *Haemophilus influenzae* dış membran proteini kullanılmaktadır. Polisakkarit-protein taşıyıcı birlikteliği polisakkaride T-bağımlı protein antijenlerinin tipik antijenik özelliklerini kazandırır. Bu da T hücre cevabını artırır. Kısacası konjuge aşılar da amaç normalde T-bağımsız sakkaridi, özellikle immün yetmezlikli gruplarda daha immünojen ve etkili olan T-bağımlı antijen haline getirmektir (52).

Bugün faz III çalışmaları devam eden konjuge aşılar ve içerdiği serotipler Tablo XIII'de gösterilmiştir.

Tablo XIII: Glikoprotein konjuge pnömokok aşıları

Konjuge aşı	İçerdiği serotipler
4 valanlı	6B, 14, 19F, 23F
7 valanlı	4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F
8 valanlı	3, 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F
9 valanlı	1, 4, 5, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F
11 valanlı	1, 3, 4, 5, 6B,7F, 9V, 14, 18C, 19F, 23F

Konjuge aşılar da kullanılacak antijenlerin seçiminde, toplumda yaygın olan, en sık invaziv infeksiyon oluşturan ve antibiyotiklere dirençli serotiplerin tercih edilmesi gerekir. Bu amaçla 1978-1994 yılları arasında "Centers for Disease Controls and Prevention" tarafından 6 yaş altı çocuklar üzerinde yürütülen bir pnömokok sörveyans programında elde edilen suşlar serotiplendirilmiş ve serotip 14, 6B, 19F, 18C, 23F, 4 ve

9V'nin suşların % 78'ini oluşturduğu gözlenmiştir. Bu çalışmada bu serotipleri içeren bir konjuge pnömokok aşısının bakteriyemilerin % 86'sını, menenjitlerin %83'ünü ve orta kulak iltihaplarının % 65'ini önleyebileceği iddia edilmektedir. Aynı çalışmada bu aşının penisiline orta düzey dirençli pnömokokların % 80'ini, yüksek düzey dirençlilerin ise % 100'ünü kapsadığı saptanmıştır (95). Bu çalışmanın sonuçlarına göre ABD'nde 7 valanlı konjuge aşının yeterli olduğu görülmektedir.

Yine benzer bir epidemiyolojik çalışmada 7 valanlı konjuge aşının, ABD, Kanada, Afrika ve Avrupa'da invaziv infeksiyonlardan izole edilen pnömokokların % 70-88'ini kapsadığı; Latin Amerika ve Asya'da ise ancak 7 valanlıya ek olarak serotip I ve 5'i içeren 9 valanlı aşının invaziv infeksiyonların önlenmesi için yeterli olacağı saptanmıştır (96).

İnvaziv infeksiyon oluşturan serotiplerin toplumdaki değişimi bilinmektedir (87, 88). Bu nedenle her toplumda yaygın serotiplerin belirlenmesi, o toplumda kullanılacak aşının belirlenmesi, dolayısıyla da invaziv pnömokok infeksiyonlarının ve pnömokoklarda direncin önlenmesi için yararlı olacaktır.

Yöremizde izole edilen suşların serotip dağılımına bakıldığında, 11 valanlı aşının suşların % 87'sini, 9 valanlı aşının suşların % 78'ini, 4 valanlı aşının ise suşların % 61'ini kapsadığı görülmektedir (Şekil 4). Dirençli suşlar söz konusu olduğunda ise 11 valanlı aşının daha yararlı olacağı açıktır (Şekil 5).

Bütün dünyada pnömokoklarda, penisiline ve diğer antibiyotiklere giderek artan direnç sorunu, direncin nasıl yayıldığı sorusunu gündeme getirmiştir. Bu konuda üç hipotez vardır:

1. Viridans streptokoklardan uygun DNA parçalarının kazanılması ya da PBP'lerdeki mutasyonlar sonucu mozaik gen oluşumu (33),

2. Penisiline dirençli pnömokoklardan değişmiş PBP genlerinin penisiline duyarlı pnömokoklara horizontal transferi (97),
3. Bir ya da daha fazla dirençli klonun çoğalması ve yayılması sonucu (4) direnç gelişmektedir.

Genel olarak farklı genetik yapıya sahip olan ancak aynı değişmiş *pbp* genlerini taşıyan dirençli pnömokokların horizontal; aynı genetik yapıya sahip olanların ise klonal yayıldığı söylenebilir (3). Özellikle klonal yayılım, birbirinden çok uzak coğrafi bölgeler hatta kıtalararası yayılıma neden olması nedeniyle önemlidir (4, 5).

Serotipi 23F olan, penisilin, tetrasiklin, kloramfenikole ve bazen de eritromisine dirençli olan İspanya klonunun Avrupa'nın birçok ülkesine (4, 97-101), ABD'ne (102, 103) ve Güney Afrika'ya (104) yayıldığı gösterilmiştir. Ancak aynı klon Uzak Doğu'da saptanamamıştır. Japonya ve Kore'de izole edilen serotipi 23F olan dirençli pnömokoklarda genetik heterojenite belirlenmiştir (105-107). Fransa'daki klonun İspanya'dakinden farklı olarak tetrasikline duyarlı olduğu gösterilmiştir (98).

Birçok ülkede genetik yapısı 23F klonu ile aynı olmakla birlikte 19F serotipi taşıyan bir klon saptanmıştır (97, 98, 100, 108). Barnes ve ark. (109) daha önce 23F taşıyıcısı olduğunu belirledikleri bir çocuktan daha sonra serotipi 14 olan bir suş izole etmişler, PFGE ve PBP tiplemesi sonrasında bunun İspanya 23F klonunun bir varyantı olduğunu bulmuşlardır. Bu da kapsüler değişimin varlığını göstermektedir. Corso ve ark. (110) ABD'nde solunum yolu örneklerinden izole ettikleri penisiline dirençli pnömokokların yaklaşık % 40'ının İspanya 23F klonuna ait olduğunu saptamışlardır. Ancak Tennessee'de izole edilen ve geniş spektrumlu sefalosporinlere dirençli 23F serotipi gösteren pnömokokların bundan farklı, bölgesel bir klon olduğu bulunmuştur (111). Bundan başka Finlandiya (112), İtalya (100), İsrail (113), Bulgaristan (114) gibi pek çok ülkede o yöreye özgü 23F klonlar saptanmıştır.

23F klonu dışında 14 (101, 114), 9V (97, 100, 110), 19A (57, 108, 114) klonlarına ait olduğu belirlenen dirençli kökenlerin yayılması ile meydana gelen invaziv infeksiyonlar da bildirilmiştir.

Hall ve ark. (115) pnömokokların klonal yapısı üzerine yaptıkları bir araştırma da özellikle antibiyotiklere dirençli suşlar arasında epidemik klonların varlığını göstermiştir. Ancak penisiline orta düzey dirençli ya da duyarlı suşlarda genetik heterojenite saptanmıştır (112, 115).

Yöremizde izole edilen penisiline orta düzey dirençli suşlarda % 41'i A klonuna ait olmak üzere 8 farklı klon saptanmıştır (Şekil 6).

Sonuç olarak, yöremizde penisiline yüksek düzey dirençli pnömokok suşuna rastlanmamıştır. Penisiline orta düzey dirençli suş oranı % 23 olarak bulunmuştur. Tüm suşlarda sırasıyla serogrup/serotip 19, 1 ve 6 baskın iken, orta düzey dirençli pnömokoklarda ilk sırayı serogrup 19 ve 23'ün aldığı görülmüştür. Hiçbir klonda belli bir serotip hakimiyeti bulunamamıştır. Bu da orta düzey dirençli suşlardaki genetik heterojenite bulgusunu desteklemektedir.

## 6. KAYNAKLAR

1. Tomasz A. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. Clin Infect Dis 1997; 24 (suppl 1): 85-88.
2. Appelbaum PC. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: an overview. Clin Infect Dis 1992; 15: 77-83.
3. Doit C, Denamur E, Picard B, Geslin P, Elion J, Bingen E. Mechanisms of the spread of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* strains causing meningitis in children in France. J Infect Dis 1996; 174: 520-528.
4. 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 1993; 168: 158-163.
5. Munoz R, Musser JM, Crain M, et al. Geographic distribution of penicillin-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae*: characterization by penicillin-binding protein profile, surface protein A typing and multilocus enzyme analysis. Clin Infect Dis 1992; 15: 112-118.
6. Henrichsen J. Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. J Clin Microbiol 1995; 33: 2759-2762.
7. Bédos JP, Chevret S, Chastang C, Geslin P, Régnier B and the French Cooperative Pneumococcus Study Group. Epidemiological features of and risk factors for infection by *Streptococcus pneumoniae* strains with diminished susceptibility to penicillin: findings of a French survey. Clin Infect Dis 1996; 22: 63-72.
8. Klugman KP, Koornhof HJ. Drug resistance patterns and serogroups or serotypes of pneumococcal isolates from cerebrospinal fluid or blood, 1979-1986. J Infect Dis 1988; 158: 956-964.
9. Watson DA, Musher DM, Jacobson JW, et al. A brief history of the pneumococcus in biomedical research: a panoply of scientific discovery. Clin Infect Dis 1993; 17: 913-924.

10. Musher DM. *S. pneumoniae*. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE, Dolin R (eds), Principles and Practice of Infectious Diseases (4<sup>th</sup> ed). Churchill Livingstone Inc, New York 1995, pp 1811-1826.
11. Caputo GM, Appelbaum PC, Liu HH. Infections due to penicillin-resistant pneumococci: clinical, epidemiologic and microbiologic features. Arch Intern Med 1993; 153: 1301-1310.
12. Rotta J. Pyogenic haemolytic streptococci. In: Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG (eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore 1984, p 1052.
13. Lund E, and Henrichsen J. Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. In: Bergan T and Norris JR (eds), Methods in Microbiology, vol: 12, Academic Press, New York 1978 p: 241-262.
14. Ruoff KL, Whiley RA, Beighton R: *Streptococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (eds), Manual of Clinical Microbiology (7<sup>th</sup> ed). ASM Press, Washington DC 1999, pp 283-294.
15. Kontiainen S. pneumoniae, Sivonen A. Optochin resistance in *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from blood and middle ear fluid. Eur J Clin Microbiol 1987; 6: 420-424.
16. Munoz R, Fenoll A, Vicioso D. Optochin resistant variants of *Streptococcus pneumoniae*. Diagn Microbiol Infect Dis 1990; 13: 63-66.
17. Yenen OŞ. İnfeksiyon hastalıklarında akut faz reaktanları. Çalangu S, Eraksoy H, Özsüt H (derleyenler). İnfeksiyon Hastalıkları 90-91. Yüce yayınları 1990, ss 21-42.
18. Watson DA, Musher DM. The pneumococcus: sugar coated killer. Infections in Medicine 1998; 13: 3-13.
19. Musher DM. Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. Clin Infect Dis 1992; 14: 801-809.
20. Fainstein V, Musher DM, Cate TR. Bacterial adherence to pharyngeal cells during viral infection. J Infect Dis 1980; 141: 172-176.
21. Viðarson G, Jónsdóttir I, Jónsson S, Valdimarsson H. Opsonization and antibodies to capsular and cell wall polysaccharides of *Streptococcus pneumoniae*. J Infect Dis 1994; 170: 592- 599.
22. Hostetter KM. Serotypic variations among virulent pneumococci in deposition and degradation of covalently bound C3b: implications for phagocytosis and antibody production. J Infect Dis 1986; 153: 682-693.
23. Paton JC, Berry AM, Lock RA. Molecular analysis of putative virulence proteins. In: Tomasz A (ed), *Streptococcus pneumoniae: Molecular Biology and Mechanisms of Disease* (1<sup>st</sup> ed). Mary Ann Liebert Inc, Larchmont 2000, pp 261-270.
24. Yother J, Briles DE. Structural properties and evolutionary relationships of PspA, a surface protein of *Streptococcus pneumoniae*, as revealed by sequence analysis. J Bacteriol 1992; 174: 601-609.

25. Duane PG, Rubins JB, Weisel HR, Janoff EN. Identification of hydrogen peroxide as a *Streptococcus pneumoniae* toxin for rat alveolar epithelial cells. *Infect Immun* 1993; 61: 4392-4397.
  26. Breiman RF, Spika JS, Navarro VJ, et al. Pneumococcal bacteremia in Charleston County, South Carolina: a decade later. *Arch Intern Med* 1990; 150: 1401-1405.
  27. Redd SC, Rutherford GWIII, Sande MA, et al. The role of human immunodeficiency virus infection in pneumococcal bacteremia in San Francisco residents. *J Infect Dis* 1990; 162: 1012-1017.
  28. Scott JAG, Hall AJ, Dagan R, et al. Serogroup-specific epidemiology of *S. pneumoniae*: associations with age, sex, and geography in 7,000 episodes of invasive disease. *Clin Infect Dis* 1996; 22: 973-981.
  29. Hansman D, Bullen MM. A resistant pneumococcus. *Lancet* 1967; 2: 264-265.
  30. Appelbaum PC, Bhanjee A, Scragg JN, Halett AF, Bowen AJ, Cooper RC. *Streptococcus pneumoniae* resistant to penicillin and chloramphenicol. *Lancet* 1977; 2: 995-997.
  31. Handwerger S, Tomasz A. Alterations in penicillin-binding proteins of clinical and laboratory isolates of pathogenic *Streptococcus pneumoniae* with low levels of penicillin resistance. *J Infect Dis* 1986; 153: 83-89.
  32. Coffey TJ, Dowson CG, Daniels M, Sprath BG. Genetics and molecular biology of beta lactam resistant pneumococci. *Microbiol Drug Res* 1995; 1: 29-34.
  33. Jabes D, Nachnen S, Tomasz A. Penicillin-binding protein families: evidence for the clonal nature of penicillin resistance in clinical isolates of pneumococci. *J Infect Dis* 1989; 159: 16-25.
  34. 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* 1993; 37: 1938-1944.
  35. Baquero F. Epidemiology and management of penicillin-resistant pneumococci. *Current Opinion in Infectious Diseases* 1996; 9: 372-379.
  36. Liu HH, Tomasz A. Penicillin tolerance in multiply drug-resistant natural isolates of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 1995; 152: 365-372.
  37. Klugman K, Goldstein F, Kohno S, Baquero F. The role of fourth generation cephalosporins in the treatment of infections caused by penicillin-resistant streptococci. *Clin Microbiol Infect* 1997; 3 (suppl 1): 48-60.
  38. John CC. Treatment failure with use of a third-generation cephalosporin for penicillin-resistant pneumococcal meningitis: case report and review. *Clin Infect Dis* 1994; 18: 188-193.
  39. Figueiredo AM, Connor JD, Severin A, Pato MV, Tomasz A. A pneumococcal clinical isolate with high level resistance to cefotaxime and ceftriaxone. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 886-889.
-



40. Jacoby GA. Prevalence and resistance mechanisms of common bacterial respiratory pathogens. *Clin Infect Dis* 1994; 18: 951-957.
  41. Nava JM, Bella F, Garau J, et al. Predictive factors for invasive disease due to penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: a population based study. *Clin Infect Dis* 1994; 19: 884-890.
  42. Castillo F, Baquero F, Garcia A. Influence of recent antibiotic therapy on antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* in children with acute otitis media in Spain. *Pediatr Infect Dis J* 1998; 17: 94-97.
  43. Kell CM, Jordens JZ, Daniels M, et al. Molecular epidemiology of penicillin-resistant pneumococci isolated in Nairobi, Kenya. *Infect Immun* 1993; 61: 4382-4391.
  44. Smith AM, Klugman KP. Pneumococcal diseases. In: Woodford N, Johnson AP (eds), *Molecular Bacteriology: Protocols and Clinical Applications*. Humana Press, USA 1998, pp 139-156.
  45. Lefèvre JC, Faucon G, Sicard AM, Gasc AM. DNA fingerprinting of *Streptococcus pneumoniae* strains by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 2724-2728.
  46. Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD. Molecular epidemiology: application of contemporary techniques to the typing of microorganisms. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 153-164.
  47. Pfaller MA. Chromosomal restriction fragment analysis by pulsed-field gel electrophoresis-application to molecular epidemiology. In: section 10: Molecular biology. In: Isenberg HD (ed), *Essential Procedures for Clinical Microbiology*, ASM Press, Washington DC 1998, pp 651-657.
  48. Shapiro ED, Clemens JD. A controlled evaluation of the protective efficacy of pneumococcal vaccine for patients at high risk of serious pneumococcal infections. *Ann Intern Med* 1984; 101: 325-330.
  49. Siber GR. Pneumococcal disease: prospects for a new generation of vaccines. *Science* 1994; 265: 1385-1387.
  50. Filice GA. Pneumococcal vaccines and public health policy: consequences of missed opportunities. *Arch Intern Med* 1990; 150: 1373-1375.
  51. Steinhoff MC, Edwards K, Keyserling H, et al. A randomized comparison of three bivalent *Streptococcus pneumoniae* glycoprotein conjugate vaccines in young children: effect of polysaccharide size and linkage characteristics. *Pediatr Infect Dis J* 1994; 13: 368-372.
  52. Klein DL, Eskola J. Development and testing of *Streptococcus pneumoniae* conjugate vaccines. *Clin Microbiol Infect* 1999; 5: 4S 17-4S 28.
  53. Isenberg HD. Identification of gram-positive bacteria. In: Isenberg HD (ed), *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, ASM Press, Washington DC 1992, vol:1, pp 1.20.19-1.20.20.
-



54. National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*, 6<sup>th</sup> edition, Approved standard, NCCLS document M2-A6, NCCLS, Wayne Pa 1997.
55. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2233-2239.
56. Baquero F, García-Rodríguez JH, García de Lomas J, et al. Antimicrobial resistance of 1113 *Streptococcus pneumoniae* isolates from patients with respiratory tract infections in Spain: results of a 1-year (1996-1997) multicenter surveillance study. *Antimicrob Agent Chemother* 1999; 43: 357-359.
57. 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* 1991; 163: 542-548.
58. Klugman K. pneumococcal resistance to antibiotics. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3: 171-196.
59. Lee HJ, Park JY, Jang SH, et al. High incidence of resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* from a university hospital in Korea. *Curr Infect Dis* 1995; 20: 826-836.
60. Privitera G. Penicillin resistance among *Streptococcus pneumoniae* in Europe. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1994; 19: 157-161.
61. Kouppari G, Zaphiropoulou A, Tsofia M, et al. Serotyping and antibiotic resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolated from pediatric infections in central Greece. *Clin Microbiol Infect* 1998; 4: 695-700.
62. Saha SK, Rikitomi R, Ruhulamin M, et al. Antibiotic resistance and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* strains causing childhood infections in Bangladesh 1993 to 1997. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 798-800.
63. Tunçkanat F, Akan Ö, Gür D, Akalın HE. *Streptococcus pneumoniae* suşlarında penisilin direnci. *Mikrobiyol Bül* 1992; 26: 307-313.
64. Gür D, Tunçkanat F, Şener B, et al. Penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Turkey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13: 440-441.
65. Sümerkan B, Aygen B, Öztürk M, Doğanay M. pnömokok infeksiyonları ve penisilin direnci. *Klimik Derg* 1993; 6: 29-30.
66. Öngen B, Kaygusuz A, Özalp M, et al. Penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Istanbul, Turkey. *J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 1: 150.
67. Çavuşoğlu C. pnömokoklarda antibiyotik direnci. *Uzmanlık Tezi* 1996, Bornova, İzmir, s.22.
68. Özalp M, Anadol D, Kiper M, Gür D. *Haemophilus influenzae* ve *Streptococcus pneumoniae* suşlarında antibiyotik direnci. VIII. Türk Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi. Poster sunusu (N-52), Kongre program ve özet kitabı, s. 723. 6-10 Ekim 1997, Antalya.

69. Kocagöz S, Gür D, Ünal S. Antimicrobial resistance and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* isolates in a Turkish hospital. 8<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease. Poster no: 1175, May 25-28, 1997, Lausanne, Switzerland.
70. Kanra G, Özalp M, Gür D. Distribution of serotypes and antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* in a children's hospital. 8<sup>th</sup> International Congress on Infectious Disease. Poster no: 57. 017, May 15-18, 1998, Boston, USA.
71. Gönüllü N, Berkiten R. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Streptococcus pneumoniae* suşlarında penisilin ve sefotaksim MİK değerleri. XXVIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi. Poster sunusu (12-169), 4-9 Ekim 1998, Antalya.
72. Sümerkan B, Gökahmetoğlu S, Aygen B, Kocagöz S. Klinik örneklerden izole edilen *Streptococcus pneumoniae* suşlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları. Mikrobiyol Bült 1997, 31: 331-338.
73. Goldstein FW. Penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae* selection by both  $\beta$ -lactam and non  $\beta$ -lactam antibiotics. J Antimicrob Chemother 1999; 44: 141-144.
74. Arason VA, Kristinsson KG, Sigurdsson JA, et al. Do antimicrobials increase the carriage rate of penicillin resistant pneumococci in children? Cross sectional prevalence study. British Medical Journal 1996; 313: 387-391.
75. Kristinsson KG. Effect of antimicrobial use and other risk factors on antimicrobial resistance in pneumococci. In : Tomasz A (ed). *Streptococcus pneumoniae: Molecular Biology and Mechanisms of Disease* (1<sup>st</sup> ed). Mary Ann Liebert Inc, Larchmont 2000, pp 419-425.
76. Talon D, Mulin B, Dupont MJ, et al. Epidemiology of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolates in eastern France. Clin Microbiol Infect 1998; 4: 11-17.
77. Liñares J, Tubau F, Domínguez MA. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Spain: an overview of the 1990s. In : Tomasz A (ed), *Streptococcus pneumoniae: Molecular Biology and Mechanisms of Disease* (1<sup>st</sup> ed). Mary Ann Liebert Inc, Larchmont 2000, pp399-407.
78. Doern GV, Pfaller MA, Kugler K et al. Prevalence of antimicrobial resistance among respiratory tract isolates of *Streptococcus pneumoniae* in North America: 1997 results from the SENTRY antimicrobial surveillance program. Clin Infect Dis 1998; 27: 764-770.
79. 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 1994; 38: 49-53.
80. Friedland IR, McCracken GH. Management of infections caused by antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae*. N Engl J Med 1994; 331: 377-382.
81. Jacobs MR. Treatment and diagnosis of infections caused by drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Clin Infect Dis 1992; 15: 119-127.
82. Jacobs MR, Bajaksouzian S, Appelbaum PC, Bolmstrom A. Evaluation of the E-test for susceptibility testing of pneumococci. Diagn Microbiol Infect Dis 1992; 15: 473-478.

83. Sculnick M, Small GW, Lo P, et al. Evaluation of accuracy and reproducibility of E-test for susceptibility testing of *Streptococcus pneumoniae* to penicillin, cefotaxime, and ceftriaxone. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2334-2337.
84. John CC. Treatment failure with use of a third-generation cephalosporin for penicillin-resistant pneumococcal meningitis: case report and review. *Clin Infect Dis* 1994; 18: 188-193.
85. Figueredo AMS, Connor JD, Severin A, et al. A pneumococcal clinical isolate with high level resistance to cefotaxime and ceftriaxone. *Antimicrob Agent Chemother* 1992; 36: 886-889.
86. Tan TQ, Schutze GE, Mason EO, Kaplan SL. Antibiotic therapy and acute outcome of meningitis due to *Streptococcus pneumoniae* considered intermediately susceptible to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agent Chemother* 1994; 38: 918-923.
87. Block SI, Harrison JA, Hedrick RD, et al. Penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in acute otitis media: risk factors, susceptibility patterns and antimicrobial management. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14: 751-759.
88. Boken DJ, Chartrand SA, Moland ES, Goering RV. Colonization with penicillin – nonsusceptible *Streptococcus pneumoniae* in urban and rural child-care centers. *Pediatr Infect Dis J* 1996; 15: 667-672.
89. McGee L, Klugman KP, Tomasz A. Serotypes and clones of antibiotic-resistant pneumococci. In : Tomasz A (ed), *Streptococcus pneumoniae: Molecular Biology and Mechanisms of Disease* (1<sup>st</sup> ed). Mary Ann Liebert Inc, Larchmont 2000, pp 375-379.
90. Scott JAG, Hall AJ, Hannington A, et al. Serotype distribution and prevalence of resistance to benzylpenicillin in three representative populations of *Streptococcus pneumoniae* isolates from the coast of Kenya. *Clin Infect Dis* 1998; 27: 1442-1450.
91. Fenoll A, Jado I, Vicioso D, et al. Evolution of *Streptococcus pneumoniae* serotypes and antibiotic resistance in Spain: update (1990 to 1996). *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3447-3454.
92. Inostroza J, Trucco O, Prado V, et al. Capsular serotype and resistance of *Streptococcus pneumoniae* isolates in two Chilean cities. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998; 176-180.
93. Mufson M. *Streptococcus pneumoniae*. In: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE (eds), *Principles and Practice of Infectious Diseases*, (3<sup>rd</sup> ed). Churchill Livingstone Inc, New York 1990, pp: 1539-1550.
94. Klein DL. Pneumococcal disease and the role of conjugate vaccines. In : Tomasz A (ed), *Streptococcus pneumoniae: Molecular Biology and Mechanisms of Disease* (1<sup>st</sup> ed). Mary Ann Liebert Inc, Larchmont 2000, pp 467-477.
95. Butler JC. Epidemiology of pneumococcal serotypes and conjugate vaccine formulations. In : Tomasz A (ed), *Streptococcus pneumoniae: Molecular Biology and Mechanisms of Disease* (1<sup>st</sup> ed). Mary Ann Liebert Inc, Larchmont 2000, pp 479-484.
96. Hausdorff WP, Bryant J, Paradiso PR, Siber GR. Which pneumococcal serogroups cause the most invasive disease: implications for conjugate vaccine formulation and use, part I. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 100-121.

97. Coffey TJ, Dowson CG, Daniels M, et al. Horizontal transfer of multiple penicillin-binding protein genes and capsular biosynthetic genes in natural populations of *Streptococcus pneumoniae*. *Molecular Microbiology* 1991; 5: 2255-2260.
98. Lefèvre JC, Bertrand MA, faucon G. Molecular analysis by pulsed-field gel electrophoresis of penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae* from Toulouse, France. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14: 491-497.
99. Sluijter M, Faden H, deGroot R, et al. Molecular characterization of pneumococcal nasopharynx isolates collected from children during their first 2 years of life. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2248-2253.
100. Marchese A, Ramirez M, Schito GC, Tomasz A. Molecular epidemiology of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates recovered in Italy from 1993 to 1996. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2944-2949.
101. Carvalho C, Geslin P, Vaz Pato MV. Pulsed-field gel electrophoresis in *Streptococcus pneumoniae* isolated in France and Portugal. *Path Biol* 1996; 44: 430-434.
102. Munoz R, Coffey TJ, Daniels M, et al. Intercontinental spread of multiresistant clone of serotype 23F *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* 1991; 164: 302-306.
103. McDougal LK, Facklam R, Reeves M, et al. Analysis of multiply antimicrobial resistant isolates of *Streptococcus pneumoniae* from the United States. *Antimicrob Agent Chemother* 1992, 36: 2176-2184.
104. Klugman KP, Coffey TJ, Smith A, et al. Cluster of an erythromycin-resistant variant of the Spanish multiply resistant 23F clone of *Streptococcus pneumoniae* in South Africa. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13: 171-174.
105. Yoshida R, Hirakata Y, Kaku M, et al. Trends of genetic relationship of serotype 23F penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Japan. *Chemother* 1997; 43: 232-238.
106. Yoshida R, Hirakata Y, Kaku M, et al. Genetic analysis of serotype 23F *Streptococcus pneumoniae* isolates from several countries by penicillin-binding protein gene fingerprinting and pulsed-field gel electrophoresis. *Chemother* 1999; 45: 158-165.
107. Davies T, Goering RV, Lovgren M, et al. Molecular epidemiological survey of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* from Asia, Europa, and North America. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 34: 7-12.
108. Shi ZY, Enright MC, Wilkinson P, et al. Identification of three major clones of multiply antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Taiwanese hospitals by multilocus sequencing typing. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 3514-3519.
109. Barnes DM, Whittier S, Gilligan PH, et al. Transmission of multidrug-resistant serotype 23F *Streptococcus pneumoniae* in group day care: evidence suggesting capsular transformation of the resistant strain *in vivo*. *J Infect Dis* 1995; 171: 890-896.
110. Corso A, Severina EP, Petrok VF, et al. Molecular characterization of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates causing respiratory disease in the United States. *Microb Drug Resist* 1998; 4: 325-337.

111. McDougal LK, Rasheed JK, Biddle JW, Tenover FC. Identification of multiple clones of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in the United States. *Antimicrob Agent Chemother* 1995; 39: 2282-2288.
112. Sibold C, Wang J, Henrichsen J, Hakenbeck R. Genetic relationships of penicillin-susceptible and -resistant *Streptococcus pneumoniae* strains isolated on different continents. *Infect Immun* 1992; 60: 4119-4126.
113. Yakupsky P, Porat N, Fraser D, et al. Acquisition, carriage, and transmission of pneumococci with decreased antibiotic susceptibility in young children attending a day care facility in Southern Israel. *J Infect Dis* 1998; 177: 1003-1012.
114. Setchanova L, Tomasz A. Molecular characterization of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates from Bulgaria. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 638-648.
115. Hall LMC, Whiley RA, Duke B, et al. Genetic relatedness within and between serotypes of *Streptococcus pneumoniae* from the United Kingdom: analysis of multilocus enzyme electrophoresis, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial resistance patterns. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 853-859.

