

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE'DE MAKROLİD
DİRENÇ FENOTİPLERİ VE DİRENÇ GENLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

LEYLA CAFEROĞLU

**DANIŞMAN
PROF. DR. NEVRİYE GÖNÜLLÜ**

**MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI
MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2010

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

16/04/2010



Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : MİKROBİYOLOJİ
Programın seviyesi : Yüksek Lisans Doktora
Anabilim Dalı : MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Tez Sahibi : Leyla CAFEROĞLU
Tez Başlığı : STREPTOCOCCUS PNEUMONİAE'DE MAKROLİD DİRENÇ FENOTİPLERİ VE DİRENÇ GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI
Sınav Yeri : MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
Sınav Tarihi : 12 / 03 / 2010

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı


1.Prof. Dr. Müzeyyen MAMAL TORUN İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı



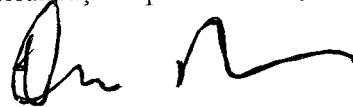
2.Prof. Dr. Nevriye GÖNÜLLÜ İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı



3.Prof. Dr. Rahmiye BERKİTEN İ.Ü.İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı



4. Prof.Dr. Ömer KÜÇÜKBASMACI İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı



5. Doç. Dr. Kenan MİDİLLİ İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Leyla CAFEROĞLU



İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, hoşgörüsünü hiç esirgemeyen Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı, değerli hocam Prof. Dr. Müzeyyen Mamal TORUN'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin fikir aşamasından sonuçlanmasına kadar olan süreçte değerli vaktini ve bilimsel desteğini sunan, tez çalışmam süresince bilgi ve tecrübeleri ile beni yönlendiren, değerli danışman hocam Prof. Dr. Nevriye GÖNÜLLÜ'ye şükran ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmam sırasında yardımını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Kenan MİDİLLİ'ye teşekkür ederim.

Yetişmemde emeği geçen değerli hocalarım; Prof. Dr. Kemal ALTAŞ, Prof. Dr. Yaşar BAĞDATLI, Prof. Dr. Mustafa SAMASTI, Prof. Dr. Bekir KOCAZEYBEK, Prof. Dr. Arif KAYGUSUZ, Prof. Dr. Ömer KÜÇÜKBASMACI, Doç. Dr. Gökhan AYGÜN, Doç. Dr. Hrisi BAHAR ve Yrd. Doç. Dr. Erdal POLAT'a ayrı ayrı teşekkürlerimi sunarım.

Her konuda desteği ve sevgisiyle hep yanımda olan, değerli arkadaşım M.Sc. Biyolog Hatice ŞEN'e teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim ve yaşamımda desteğini ve sevgisini hiçbir zaman esirgemeyen, M.Sc. Biyolog Serhat SİREKBASAN'a teşekkür ederim.

Sevgi, ilgi sonsuz destekleri ile beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, sevgili annem, babam, kardeşim ve anneanneme çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No:3357/2009

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
BEYAN.....	ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	Xİİ
ÖZET.....	Xİİİ
ABSTRACT.....	XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Tarihçe.....	2
2.2. Sınıflandırma.....	2
2.3. Morfoloji Ve Boyanma Özellikleri.....	3
2.4. Kültür Özellikleri.....	4
2.5. Pnömonokların Moleküler Yapıtaşları.....	7
2.5.1. Hücre Duvarı.....	7
2.5.2. Pnömonokok Antijenleri.....	8
2.6. <i>S. pneumoniae</i> 'de Virulans Faktörleri ve İnfeksiyonlarının Patogenezi.....	10
2.6.1. Bakteriyel Yapışma (Aderans) ve Kolonizasyon.....	10
2.6.2. Üst Solunum Yollarının Siliyer Aktivitesinden Korunma.....	11
2.6.3. Fagositozdan Korunma.....	11
2.6.4. Kompleman Aktivasyonu.....	12
2.6.5. Diğer Virülans Faktörleri.....	12
2.7. Epidemiyoloji.....	14
2.8. <i>S. pneumoniae</i> 'nin Sebep Olduğu Klinik İnfeksiyonlar.....	17
2.8.1. Pnömoni.....	17
2.8.2. Sinüzit ve Otitis media.....	17

2.8.3. Menenjit.....	18
2.8.4. Bakteriyemi	18
2.8.5. Diğer Klinik İnfeksiyonlar	18
2.9. Pnömonok İnfeksiyonlarında Laboratuvar Tanısı.....	18
2.10. Tedavi.....	20
2.11. Korunma.....	21
2.12. Makrolidlere Direnç	23
2.12.1. Makrolidler	23
2.12.2. Etki ve Direnç mekanizması.....	23
3. GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Çalışmada Kullanılan Suşlar	25
3.2. <i>S. pneumoniae</i> Tanımlanması	25
3.2.1. Optokin (etilhidrokuprein hidroklorit) Duyarlılık Testi.....	25
3.2.2. Safrada Erime Testi	25
3.3. Antibiyotik Duyarlılıkları.....	26
3.3.1. Disk Difüzyon Testi	26
3.3.2. Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) tayini.....	26
3.4. Fenotip Tayini	27
3.5. Moleküler Yöntemler	28
3.5.1. Genomik DNA ekstraksiyonu	28
3.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	28
3.5.2.1. DNA Amplifikasyonu	28
3.5.2.2. <i>S. pneumoniae</i> İçin Kullanılan Primer Dizileri	30
3.5.2.3. Çalışmada Kullanılan Kontrol Suşları.....	30
3.5.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Tampon Sıvıları.....	30
3.5.3.1. Elektroforez tamponu (10X TBE – Jel ve tanklar için tampon).....	30
3.5.3.2. Etidyum bromür (EB).....	30
3.5.3.3. Yükleme tamponu (Loading Buffer).....	30
3.5.4. Jelin hazırlanması ve PZR ürünlerinin görüntülenmesi	31
3.5.5. BOX-PZR.....	32
3.5.5.1. BOX-PZR için kullanılan primer dizisi.....	33
3.5.6. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Tampon Sıvıları.....	33
3.5.6.1. Elektroforez tamponu (10X TBE – Jel ve tanklar için tampon).....	33

3.5.6.2. Etidyum bromür (EB).....	33
3.5.6.3. Yükleme tamponu (Loading Buffer).....	33
3.5.7. Jelin hazırlanması ve BOX-PZR ürünlerinin görüntülenmesi	33
3.5.8. Klonal Yakınlığın Hesaplanması ve Dendogramın Çizilmesi	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. Disk Difüzyon Testi Sonuçları.....	37
4.2. Fenotip Sonuçları	37
4.3. Çoğul Direnç Durumu	37
4.4. E- test Sonuçları ve Fenotip-Genotip Dağılımları.....	38
4.5. PZR Sonuçları	39
4.6. BOX-PZR Sonuçları	40
5. TARTIŞMA	42
KAYNAKLAR	48
ETİK KURUL KARARI.....	59
ÖZGEÇMİŞ	60

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 4.1 Suşlara ait hasta bilgileri

Tablo 4.2 *S. pneumoniae* suşlarının disk difüzyon yöntemi ile belirlenen antibiyotik duyarlılıkları

Tablo 4-3: Makrolidlere dirençli *S. pneumoniae* suşlarının E-test MİK değerleri ve fenotip-genotip dağılımları

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1 Balgam örneğindeki *S. pneumoniae*'nin Gram görüntüsü

Şekil 2. 2 Kanlı agar plağındaki *S. pneumoniae*'nin optokin duyarlılığı

Şekil 2.3 *S. pneumoniae*'nin virülans faktörlerinin şematik düzenlenmesi

Şekil 3.1 PZR için gerekli reaktif karışımı

Şekil 3.2 BOX-PZR için gerekli reaktif karışımı

Şekil 4.1 *mef(A)/(E)* pozitif suşların jel elektroforez sonucu

Şekil 4.2 *erm(B)* pozitif suşların jel elektroforez sonucu

Şekil 4.3 Makrolidlere dirençli suşların BOX-PZR jel elektroforez sonucu

Şekil 4.4 Makrolid dirençli 18 suşun klonal yakınlık dendogramı

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

cMLSB: Yapısal MLSB direnci

CRP: C-reaktif protein

DNA: Deoksiribonükleik asit

DNaz: Deoksiribonükleaz

dNTP: Deoksiribonükleotid trifosfat

erm(B): Eritromisin ribozom metilasyon geni

Fab: Antijen bağlayan fragman

Fc: Kristalize olan fragman

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

iMLSB: İndüklenebilir MLSB direnci

KOAH: Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı

Iyt: Otolizin

mef(A): Makrolid efluks geni

MİK: Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu

MLSB: Makrolid Linkozamid Streptogramin B

MLST : Multilocus Sequence Typing

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCV: Valanlı konjuge aşı

Ply: Pnömolizin

PNL: Polimorf Nüveli Lökosit

PPV: Valanlı polisakkarit aşı

PROTEKT: Prospective Resistant Organism Tracking and Epidemiology for the Ketolide Telithromycin

PsaA: Pnökokal yüzey adezini A

Psp A: Pnökokal yüzey protein A

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RNA: Ribonükleik asit

RNaz: Ribonükleaz

SSS: Specific Solubl Substance (Spesifik Çözünebilir Madde)

ÖZET

Caferoğlu L. *Streptococcus pneumoniae*'de Makrolid Direnç Fenotipleri ve Direnç Genlerinin Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2010.

Streptococcus pneumoniae, menenjit, pnömoni ve septisemi gibi invaziv hastalıkların, otitis media ve sinüzit gibi solunum yolu infeksiyonlarının önemli bir nedenidir. Antimikrobiyal tedavideki yeni gelişmelere ve uygun izleme politikalarına rağmen pnömokoksik infeksiyonların morbidite ve mortalitesi halen yüksektir. *S. pneumoniae*'in farklı sınıf antibiyotiklere karşı duyarlılığının giderek azalması tüm dünyada problem yaratmaktadır. Buna en karakteristik örnek ise makrolidlerdir. Makrolidlerin *S. pneumoniae* ve diğer sık izole edilen respiratuar patojenlere etkili, güvenilir ve iyi tolere edilen antibiyotikler olması, alt solunum yolu infeksiyonlarının ampirik tedavisinde yaygın olarak kullanılmalarına ve bununla birlikte pnömokokal makrolid direncinin tüm dünyada giderek artmasına yol açmıştır. Çalışmamızda bölümümüzde izole edilen *S. pneumoniae* suşlarındaki makrolid direncini ve dirençli suşların fenotip ve genotiplerini belirlemeyi amaçladık. Çalışmamızda 2008–2009 tarihleri arasında 80 *S. pneumoniae* suşu toplandı. Bakterinin identifikasyonu; kanlı agardaki koloni morfolojisi, katalaz reaksiyonu, alfa hemoliz, optokin duyarlılığı ve safrada erime özelliğine dayanılarak yapıldı. Antimikrobiyal duyarlılık testi CLSI kriterlerine uygun olarak %5'lik koyun kanlı agarda disk difüzyon yöntemi ile yapıldı. *S. pneumoniae* suşlarının makrolid direnç fenotipleri için eritromisin-klindamisin çift disk difüzyon yöntemi kullanıldı. Makrolid direnç genleri, *erm(B)* ve *mef(A)/(E)* PZR yöntemi ile incelendi. 18 (%22,5) suş makrolidlere dirençli bulundu. Dirençli suşların 16'sı MLS_B fenotipine 1'i M fenotipine ve 1'inin $M^+ iMLS_B$ 'e sahip olduğu belirlendi. 8 suş *erm(B)*, 2 suş *mef(A)* ve 8 suşun her iki geni birden taşıdığı saptandı.

Anahtar Kelimeler: *Streptococcus pneumoniae*, Makrolid direnci, *erm(B)*, *mef(A)*, Polimeraz Zincir Reaksiyonu.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 3357/2009

ABSTRACT

Caferoglu L. Research of phenotypes and genotypes of macrolide resistant *Streptococcus pneumoniae*. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Microbiology and Clinical Microbiology. Master Thesis. Istanbul. 2010.

S. pneumoniae is a major cause of invasive diseases such as meningitis, pneumonia, septicaemia and respiratory tract infections like otitis media and sinusitis. Despite of the availability of excellent antimicrobial therapy and adequate health care systems, the morbidity and mortality of pneumococcal infections are still high. Decreased susceptibility of *S. pneumoniae* strains to different classes of antimicrobial agents is a worldwide problem; the most characteristic example relates to macrolides. Macrolide anti-bacterials are widely used for the empirical treatment of lower respiratory tract infections due to their activity against *S. pneumoniae* and other common respiratory pathogens and have a good safety/tolerability profile. The purpose of this study is to evaluate the level of macrolide resistance in our clinical strains of *S. pneumoniae* and to determine their resistance phenotypes and genotypes. In this study, we collected 80 *S. pneumoniae* strains from 2008 to 2009. Identification of *S. pneumoniae* species was based on colony morphology on blood agar, catalase reaction, alfa-hemolysis, optochin susceptibility and bile solubility testing. Antimicrobial susceptibility testing was performed by disc diffusion method on 5% sheep blood agar according to Clinical Laboratory Standards Institute criteria. For all erythromycin resistant *S. pneumoniae* strains, macrolide resistance phenotypes were identified using a double disc test with erythromycin and clindamycin. MIC data were used for determination of macrolide resistance phenotypes. The strains were examined by PCR for the macrolide resistance genes *erm(B)*, and *mef(A)/(E)*. In our study, macrolide resistance was observed in 22.5% (18) strains. Resistant strains were determined to belong to MLS_B phenotype (16 strains), M phenotype (one strain) and $iMLS_B+M$ (one strain). Two of the *S. pneumoniae* strains were *mef(A)*, eight *erm(B)* and eight were both *erm(B)* and *mef(A)/(E)* positive.

Key Words: *Streptococcus pneumoniae*, Macrolides resistance, *erm(B)*, *mef(A)*, Polymerase Chain Reaction.

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No.3357/2009

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Pnömonokoklar günümüze dek geliştirilen korunma yöntemlerine ve antimikrobiyal tedavi alanındaki ilerlemelere karşın, halen tüm dünyada önemli oranda morbidite ve mortalite nedeni mikroorganizmalardır (1). *Streptococcus pneumoniae* üst solunum yolu infeksiyonu ve sepsis, menenjit, pnömoni gibi invaziv infeksiyonların temel etkeni olarak görülen, tüm dünyada yaygın olarak saptanan önemli bir patojendir (2). İki yaş altı çocuklar ve 65 yaş üstü erişkinler, pnömonokokların sebep olduğu infeksiyonlar için daha yüksek risk altındadırlar. Her yıl beş yaşın altındaki yaklaşık 2,6 milyon çocuk pnömoniden hayatını kaybetmektedir (3).

S. pneumoniae suşlarının yıllarca penisiline duyarlı kalması ve yan etkilerinin az olması nedeniyle penisilin ampirik olarak yaygın bir biçimde kullanılmıştır (4). Ancak 1967 yılından itibaren penisiline dirençli *S. pneumoniae* suşları gittikçe artan oranda bildirilmeye başlanmıştır. İlk penisiline dirençli suş 1967 yılında Papua Yeni Gine ve Avustralya'dan bildirilmiştir. İlk penisiline dirençli suşun bildirilmesinden 10 yıl sonra 1977 yılında Güney Afrika'da penisilin dışında, eritromisin ve kloramfenikole dirençli, çoğul dirençli olarak tanımlanan *S.pneumoniae* suşu bildirilmiştir (5).

S. pneumoniae'in farklı sınıf antibiyotiklere karşı duyarlılığının giderek azalması tüm dünyada sorun yaratmaktadır. Buna en karakteristik örnekse makrolidlerdir. Makrolidlerin *S. pneumoniae* ve diğer sık izole edilen respiratuar patojenlere etkili, güvenilir ve iyi tolere edilen antibiyotikler olması, solunum yolu infeksiyonlarının ampirik tedavisinde yaygın olarak kullanılmalarına ve bununla birlikte pnömonokokal makrolid direncinin tüm dünyada giderek artmasına yol açmıştır (6).

Makrolid grubu antibiyotiklere karşı gelişen direnç mekanizmalarının belirlenmesi, pnömonokok infeksiyonlarının tedavi ve önlenmesinde önemli bir yere sahiptir. Çalışmamızda hastanemizde izole edilen *S. pneumoniae* suşlarındaki makrolid direncini, dirençli suşların fenotip ve genotiplerini belirlemeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tarihçe

S. pneumoniae ilk kez 1880 ve 1881’de Pasteur tarafından *Microbe septicemique du saliva* olarak isimlendirilirken, Amerika Birleşik Devletleri’nde Sternberg tarafından *Micrococcus pasteurii* olarak isimlendirilmiştir. 1882 yılında Friedlander pnömonili hastaların dokularında pnömokokları göstermiş ve *S. pneumoniae* 1880’lerin sonuna kadar olan dönemde lobar pnömoninin en genel sebebi olmasının yanı sıra otitis media, artrit, menenjit gibi ciddi infeksiyonların da en önemli etkenlerinden biri olduğu gösterilmiştir (7). 1926’da balgamın Gram boyamasındaki görünüşü ile *Diplococcus* olarak, 1974’te DNA yapısı ve sıvı besiyerindeki üremesine bakılarak *Streptococcus pneumoniae* olarak isimlendirilmiş ve *Streptococcus* cinsi içinde yer almıştır (8).

Yirminci yüzyılın başında pnömokok süspansiyonuna antiserum eklenmesiyle bakterinin hücre duvarının dışında bulunan kapsülün mikroskopik olarak şiştiği ayrıca makroskopik olarak da aglütinasyon reaksiyonu geliştiği gösterilmiştir (9). Kapsül polisakkaritinin serolojik reaksiyondan sorumlu faktör olduğu 1917 yılında belirtilmiş, sonraki yıllarda da 90 farklı serotipi tanımlanmıştır. Serotiplendirmenin yapılmasıyla birlikte epidemiyolojik veriler elde edilmiş ve aşı geliştirme, pnömokokal infeksiyonların kontrolü gibi çalışmalar başlamıştır (10).

Bir grup araştırmacı tarafından 1944 yılında pnömokokal transformasyon sırasında genetik materyal olan DNA’nın fenotipik değişimden sorumlu olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma, moleküler genetik alanının başlangıç çalışması olarak kabul edilmektedir (8).

2.2. Sınıflandırma

Pnömomokoklar *Streptococcaceae* ailesi içindeki mikroorganizmalardır. *Streptococcaceae* ailesindeki mikroorganizmalar 16S rRNA dizi analizine göre 7 gruba ayrılmışlardır. Bu sınıflamada pnömokoklar piyojenik bakteriler olmalarına ramen genetik olarak viridans streptokoklara (*S. mitis*, *S. gordonii*, *S. oralis*, *S. sanguis*, *S. parasanguis*) benzer olduklarından aynı grupta yer almaktadırlar (11).

Streptokoklar kanlı agardaki hemolizlerine ve Lancefield sistemine göre gruplandırılmaktadırlar:

1- *Beta hemolitik streptokoklar*: Kanlı agarda ürediklerinde kolonilerin etrafında şeffaf zonlar oluşur. Bunu oluşturan streptokoklara beta hemolitik streptokoklar denir.

2- *Alfa hemolitik streptokoklar*: Kanlı agarda üretildiklerinde koloni çevresinde tam olmayan, yeşilimsi bir hemoliz oluşur. Bu gruptaki streptokokların çoğunda polisakkarit bir kapsül yoktur; *S. pneumoniae* bir istisnadır.

3- *Gama hemolitik ya da non hemolitik streptokoklar*: Kanlı agarda üretildiklerinde hemoliz yapmayan streptokoklar bu gruptadır. Bu grup içerisinde yer alan streptokoklar genellikle patojen değildir.

Lancefield sistemi'ne göre yapılan sınıflamada ise *S. pneumoniae*'nin gruba özgül hücre duvarı antijenleri bulunmadığı için bu sistemle sınıflandırılmaz (12).

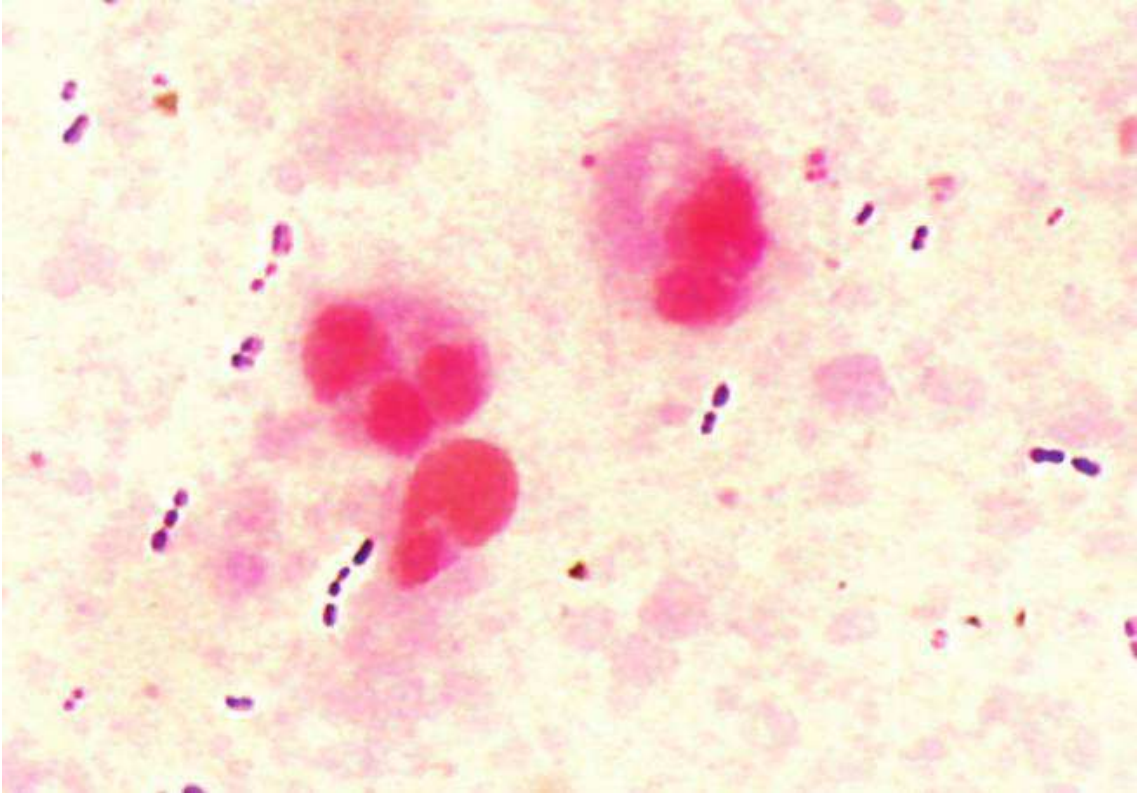
2.3. Morfoloji Ve Boyanma Özellikleri

Pnömokoklar birbirine bakan yüzleri düz diğer uçları sivri, 0,5-1,2 µm boyutlarında oval ya da lanset şekilli, kısa zincirler veya ikili koklar (diplokoklar) halinde dizilim gösteren, tipe özgül olarak kapsüllü ya da kapsülsüz bakterilerdir. Hareketsiz, sporsuz ve fakültatif anaeropturlar (13).

Balgam, irin ve seröz sıvıda kısa zincirler halinde bulunurlar. Kapsül oluşumu kan, serum, gibi proteinli besiyerlerindeki pasajlarda devam ederse de, diğer besiyerlerinde kısa sürede kaybolur. Kapsüller çoğu kez homolog serumlar kullanılarak yapılan ve kapsül yapısının daha iyi belirlenebildiği kapsül şişme reaksiyonu sonrasında boyanarak gösterilebilir (13, 14).

Sitokromlardan ve katalaz enziminden yoksundurlar. Pnömokoklar oksijenli ortamda metabolizma ürünü olarak hidrojen peroksit (H₂O₂) açığa çıkarırlar. Eğer dış kaynaklar yoluyla katalaz enzimi sağlanmazsa H₂O₂ birikimi pnömokokların üremesini inhibe eder.

Pnömokoklar aerop koşullarda kanlı agarda alfa hemoliz yaparlar. Anaerop ortamda ise pnömolizin-O'ya bağlı beta hemoliz oluştururlar (13, 15, 16).



Şekil 2.1 Balgam örneğindeki *S. pneumoniae*'nin Gram görüntüsü (17)

Pnömonokoklar gram pozitif olup bakteriyolojik boyalarla kolay boyanırlar. Ancak besiyerindeki pasajlarında yaşlı hücreler kolay dekolorize olarak gram negatif boyanma eğilimi gösterirler (13, 16).

2.4. Kültür Özellikleri

Pnömonokokların *Streptococcus* cinsinde bulunan diğer bakteriler gibi, besin gereksinimleri komplekstir, üreyebilmeleri için kan veya seruma gereksinim duyarlar. %5 koyun kanı ilave edilmiş beyin-kalp infüzyon agar, triptik soy agar veya çukulata agarda iyi ürerler. Kanlı besiyerinde ürediklerinde kolonilerin etrafında alfa-hemoliz olarak kabul edilen yeşil bir zon görülür. Bu, bakterinin oluşturduğu pnömölizin enzimi ile ilişkilidir. Bu etki, eritrositlerle ilgili olmayıp hemoglobinin parçalanması ile ilişkilidir. Çukulatalı besiyerinde üreyen bakterilerin çevresinde de yeşil bir zon görülmesi bu düşüncüyü doğrulamaktadır (18). Serum içeren katı besiyerleri yüzeyinde 37°C'de 24-36 saatlik inkübasyonun ardından yuvarlak, küçük, parlak, hafif konveks, 0,5–1,5 mm çapında koloniler meydana getirirler (19).

Pnömonokoklar için optimal üreme ısısı 35°C ve optimal pH 7,4-7,8'dir. Isının 25-42°C arasında ve pH'nın da 6,9-8,8 arasında bulunduğu koşullarda üreyebilirler (7).

Fakültatif anaerop olduklarından karbonhidratları laktik asite fermente ederek enerji kazanırlar. Açığa çıkan laktik asit ise hızlıca toksik seviyelere ulaşp bakterilerin üremelerini sınırlar (13).

Pnömonokların kültür ortamında 2 farklı koloni morfolojisi gösterdiği bilinmektedir:

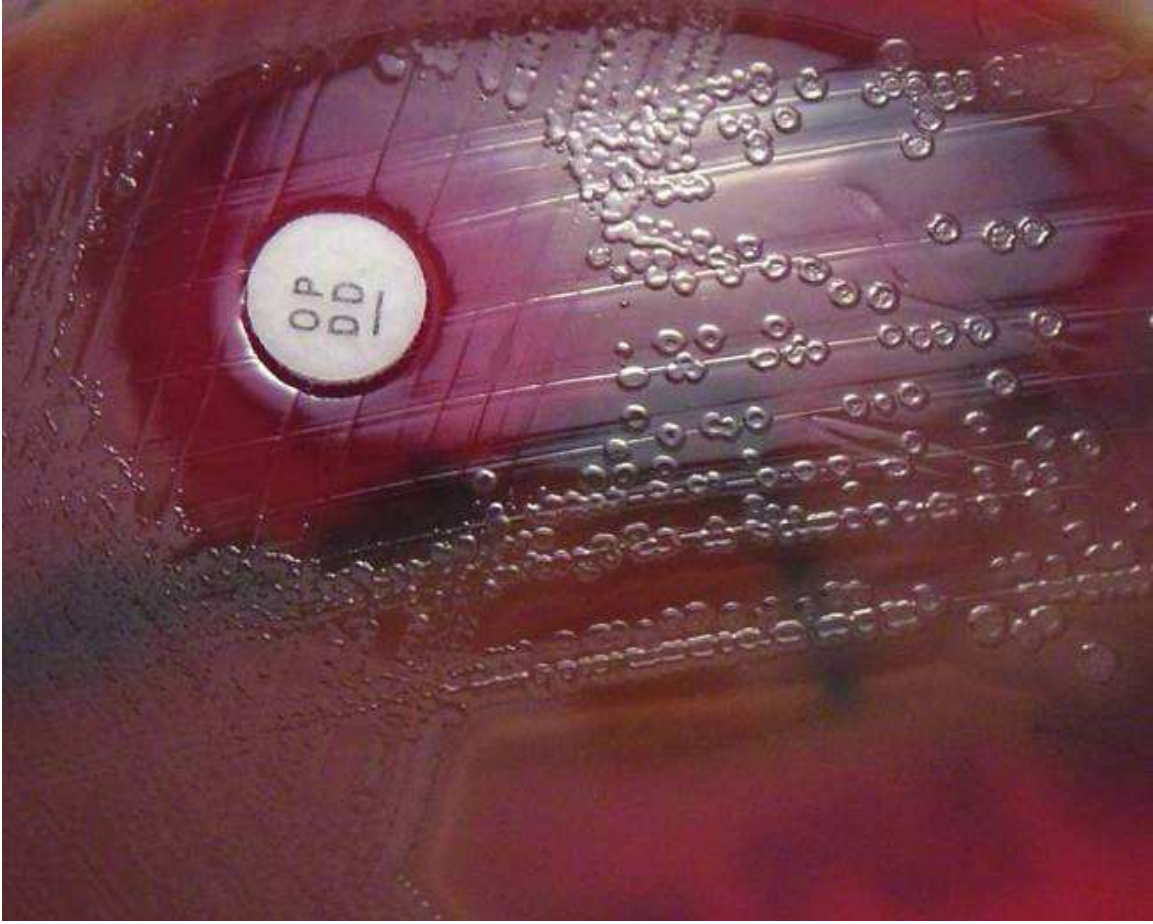
1) *S-R form değişiklikleri*: Katı besiyerinde üreyen pnömonoklar kapsüllü, düzgün S kolonileri (S: Smooth=düzgün), homolog antiserum içeren besiyerinde ise kapsülsüz, kaba ve granüllü R kolonileri (R: Rough=pürtüklü) oluştururlar. R kolonileri içeren buyyon kültürlerinin farelere inokulasyonu sonucunda bu avirulan kolonilerin, S formundaki virulan kolonilere dönüştüğü gösterilmiştir. Bunun sebebi pnömonokların kapsülünde bulunan polisakkarit yapısındaki spesifik çözünebilir maddesine (Specific Solubl Substance) bağlıdır (14). Pnömonok infeksiyonu esnasında organizmada anti SSS antikoru meydana gelir. Hastalığın ileriki günlerinde bu antikorlar karşısında organizmada, kapsülsüz ve R kolonisi yapan pnömonokların baskın hale geldiği saptanmıştır. R formuna geçen pnömonoklar, sık hayvan pasajları yapılarak yada üreme ortamına anti-R bağışık serumu eklenerek güç de olsa S formuna dönüşebilirler (20).

2) *Transformasyon*: Transformasyon R formu gösteren pnömonokların, başka bir tip pnömonok DNA'sı içeren ortamlarda üremesi sonucu S formunu almasıdır (13).

Kültür ortamında pnömonokların koloni yapıları diğer viridans streptokoklarla benzerlik göstermektedir ancak pnömonokları viridans streptokoklardan ayıran farklılıklar bulunmaktadır. Bunlar :

Optokin (etilhidrokuprein hidroklorit) duyarlılık testi

Kanlı agarda inhibisyon zon çapının 6 mm'lik diskle >14 mm, 10 mm'lik diskle >16 mm olması duyarlılığı gösterir (21). Bir kinin analogu olan optokine duyarlılık *S. pneumoniae*'nin viridans streptokoklardan ayırımında en çok aranan özelliktir. Ancak nadir de olsa dirençli suşlara rastlanmaktadır. Direnç oluşumu, yoğun antibiyotik kullanımına veya optokine etki mekanizmasında meydana gelen mutasyona bağlanmaktadır. İnvaziv infeksiyonlardan izole edilen optokine dirençli suşlara viridans streptokok tanısı konmadan önce safrada erime ve DNA prob hibridizasyon deneyi yapılmalıdır (22).



Şekil 2.2 Kanlı agar plağındaki *S. pneumoniae*'nin optokin duyarlılığı (17)

Safra ve safra tuzlarında otolize olma özelliği

%10–20 oranında sığır veya tavşan safrası ilave edildiğinde pnömokok kolonileri erirler (otoliz). Ancak viridans grubu streptokoklarda bu durum görülmez (7, 14). Pnömonokların safrada erime nedeni, safranın peptidoglikan tabakasının alanin ile muramik asit arasındaki bağı kırarak deforme eden *otolitik amidaz* isimli enzimleri aktive etmesidir (23). Günümüzde, safra yerine çoğunlukla safra tuzları kullanılmaktadır. Bunun nedeni kolay hazırlanabilmeleri ve sterilize edilebilmeleridir. Safra tuzlarının %2'lik konsantrasyonları en iyi kimyasal yapıyı teşkil etmeleri sebebi ile tercih edilmektedir (19). Safra deneyinin optokine duyarlılık deneyinden daha özgül olduğu kabul edilir. Test aktif üreme fazındaki, 18-24 saatlik katı veya daha özgül olan sıvı kültürler ile tüpte yapılır. Katı besiyeri için %2'lik, tüp testi için %10'luk sodyum deoksikolat hazırlanır. Sıvı kültürle yapılan deneyde bakteri tercihen uygun buyyon besiyerinde süspanse edilerek (0,5-1 McFarland) biri kontrol olan 2 tüpe 0,5 ml konur; birinin üzerine safra çözeltisi, diğerine fizyolojik tuzlu su aynı miktarda ilave edilerek

35°C'de 2 saat bekletilir. Tüp deneyinde bakteri süspansiyonunun pH'sı 7'e ayarlanmalıdır, çünkü safra tuzu 6,5 ve daha düşük pH'da presipite olarak etkisiz kalır (24). Kısmen erime gösterenler kapsül şişme deneyi veya moleküler yöntemlerle tekrar incelenmelidir (22).

İnülini fermante etme özellikleri: Pnömonokların hemolitik streptokoklardan ayırımında kullanılır. Pnömonoklar inülini fermante ettikleri halde; *S. salivarius* ve *S. sanguis* dışında diğer alfa hemolitik streptokoklar inülini fermante edemezler. Bununla birlikte, bazı pnömonok kökenlerinin inüline etki göstermedikleri belirlendiğinden, bu test son zamanlarda değerini kaybetmiştir (20).

Pnömonokları diğer streptokoklardan ayıran özelliklerinden bir diğeri de hayvanlara olan etkileridir. Laboratuvar hayvanlarının pnömonoklara olan duyarlılıkları değişiktir. Fare ve tavşan çok duyarlı; kobay daha az duyarlı; köpek, kedi, güvercin ve tavuk ise dirençlidir. İntratrakeal inokülasyonlarla maymunlarda lobar pnömoni oluşturulabilir. Fare ve tavşanlarda çabuk ilerleyen fatal bir septisemi gelişir ve bu hayvanlarda bronkopnömonik tipte bir akciğer infeksiyonu oluşur. Pnömonok enjekte edilmiş fareler sepsis sebebiyle 48 saat içinde öldükleri halde, diğer hemolitik streptokokların enjeksiyonu böyle bir duruma neden olmamaktadır (14, 19).

2.5. Pnömonokların Moleküler Yapıtaşları

2.5.1. Hücre Duvarı

Hücre duvarı diğer Gram pozitif bakteriler gibi, birbirlerine peptid zincirleri ile bağlanmış N-asetilglikozamin ve N-asetilmuramik asitten oluşan peptidoglikan tabakadan meydana gelir (13, 7). Hücre duvarının diğer önemli komponenti galaktozamin, fosfat ve kolinden zengin teikoik asittir. Kolin sadece *S. pneumoniae*'nin hücre duvarında bulunur ve hücre duvarının hidrolizinde düzenleyici role sahiptir (25). Teikoik asit, hücre duvar yapısında bulunan, gliserol ya da ribitolün tekrarlayan birimlerinden oluşan ve fosforikolin içeren bir karbohidrat polimeridir. Peptidoglikan, hücre duvarının en dış yüzeyinde kovalan olarak bağlanır ve kapsülün içine doğru uzanan fragmanları ile birlikte C polisakkaridi meydana getirir. Ancak bunun, Lancefield sınıflandırılmasında kullanılan streptokokların gruba özgü karbonhidratları (C maddesi) ile ilişkisi yoktur. Pnömonokların teikoik asit yapısındaki C maddesinin, bir akut faz reaktanı olan ve akut inflamatuvar hastalıklarda artan CRP ile presipite olma

özelliği vardır. Ancak bu presipitasyon özgül değildir, yani CRP pnömokokların C maddesine karşı oluşmaz (7, 25).

N-asetil müramik asit ve N-asetil glikozaminin ardı ardına sıralanmasından meydana gelen peptidoglikan yapı, pnömokoklarda bakteri hücre duvarının geniş bir bölümünü meydana getirir. Bu örgü, hücrenin iskeletini oluşturur ve antijenik yapıdan sorumludur. Bakteriye ozmotik güçlere karşı korur. Bu işlevin yerine getirilmesi yan bağlarla örülü şeker zincirleri aracılığı ile meydana gelmektedir. Hücre duvarı bütünlüğünü sağlayan bağlar karboksi ve transpeptidaz gibi enzimlerle lineer ve çaprazlama bağlanan çok sayıda şeker ve peptid zincirlerinden oluşmaktadır (26).

2.5.2. Pnömokok Antijenleri

Pnömokoklarda kapsül antijeni ve somatik antijen olmak üzere başlıca 2 tip antijen vardır. Bunlardan kapsül antijeni, hücre duvarı peptidoglikanına kovalan bağ ile bağlanmış doğrusal ya da dallanan yapılara sahip polisakkarit polimerlerinden meydana gelmiştir (7, 27). Pnömokok kapsülleri antijenik özellik gösteren, virulansı arttıran ve pnömokokların fagositozdan korunmasını sağlayan önemli yapılardır.

Kapsül, pnömokokların hücre duvar yapısındaki M protein antijenleri ile bunlara karşı oluşan antikörlerin aglutinasyonunu engeller. Kapsülsüz suşlar avirulandır ve herhangi bir antifagositik özellik göstermezler. Serumlarında kapsül polisakkarit antikoru bulunan kişiler, o tip pnömokok enfeksiyonuna karşı dayanıklılık göstermektedirler (14, 23). Suda çözünür yapıda olan bu kapsüller polisakkaritlere 'specific soluble substans' (SSS) adı verilir (16). Deneysel olarak da SSS antikörleriyle bağışıklık geliştiği gösterilmiş ve bundan dolayı SSS'in pnömokok virulansında etkin bir rol oynadığı saptanmıştır (20).

Pnömokokların serolojik tiplendirilmesi, kapsül yapılarının antijenik özelliklerine göre yapılmaktadır. İlk serotiplendirme, Dochoz ve Gillespie tarafından 1913 yılında yapılmıştır. Pnömokokların tiplendirilmesinde numaralandırma sistemi kullanılmış, sonradan birbirine yakın antijenik özellik gösteren tipler aynı serotip numarası altında harflerle gruplandırılmıştır. Danish, Eddy ve Lund, pnömokokların serotiplendirilmesi ile ilgili çok sayıda çalışma yapmışlar ve kendi isimleriyle anılan numaralandırma sistemlerini oluşturmuşlardır (7). Danish sisteminde birbirine yakın antijenik özellik gösteren suşlar subtipler olarak bir arada gruplandırılmış, Eddy sisteminde ise böyle bir durum dikkate alınmadığından, gruplandırmada farklı antijenik

özelliikli ayrı tipler birbirini takip eden numaralarla sıralanmışlardır (19). Günümüzde Amerikan sistemi olarak da bilinen Lund'un sistemi yaygın olarak kullanılmaktadır ve toplam 90 serotip tanımlanmıştır (28).

Pnömonokların belli tipleri insanlarda hastalık oluşturmaktadır. Hastalığa yol açan tiplerin sıklığı çocuk ve erişkinlerde farklılık göstermektedir. Erişkinlerde infeksiyondan sorumlu suşlar serotip 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 12, 14, 19, 23, 25, 51 ve 56'dır (29). Çocuklarda oluşan infeksiyonların yarısından çoğunda 6A, 14, 19F ve 23F serotipleri ön plandadır. İlk 6 yaşta bu serotiplerin yol açtığı infeksiyonlara ve özellikle otittis media'ya sık rastlanmaktadır. Bebek pnömonilerinde özellikle serotip 14 en sık izole edilendir. Serotiplerin dağılımı yaş dışında, ülkeler arası, hatta aynı ülkede merkezler arasında bile bir takım farklılıklar göstermektedir (30).

Pnömonoklar serolojik olarak üç şekilde tiplendirilmektedir;

- 1) Tipe özgül antiserumlarla aglutinasyon
- 2) Tipe özgül antiserumlarla SSS'in prepitasyonu
- 3) Kapsül şişme reaksiyonu

Bazı pnömonokların kapsüler polisakkaritleri, diğer pnömonok tiplerinin kapsüler antijenleriyle, ya da alfa hemolitik ve non hemolitik streptokoklar, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve bazı *Salmonella* türleri ile çapraz reaksiyonlar verebilmektedirler (13, 31). Günümüzde tip tayininde en sık kapsül şişme reaksiyonu kullanılmaktadır.

Pnömonoklarda kapsül antijenleri dışında somatik antijenlerde bulunmaktadır. Somatik bölgede iki antijenik madde bulunur. Bunlardan birisi protein yapısında olan *M proteini*, diğeri ise karbonhidrat yapısındaki *C maddesidir*. M protein yapıları, farklı pnömonok tiplerinde değişiklik göstermektedir ancak bu farklılıklar tiplendirilmede yararlanılabilecek kadar özgül değildir. Tipe özgül protein antijeni olan M proteini, *S. pyogenes*'in M proteini ile aynı yapısal özellikte olmakla birlikte, immünolojik olarak farklı etkiye sahiptir (14). Pnömonokların M proteinine karşı gelişen anti-M protein antikorları, fagositozu inhibe edemezler. Bundan dolayı koruyucu özellikleri bulunmamaktadır. Somatik bölümdeki ikinci madde, hücre duvarının asıl elemanı türe özel bir karbohidrat olan polisakkarid C dir. Teikoik asit polimeri olan C antijeni kolin, trideksidiaminohegsoz, galaktoz, ribitol, glikoz ve fosfat yapısındadır. Organizma

onunla birleştğinde presipitasyona yol açan CRP ismi verilen bir madde oluşturur. Bu protein 110.000 dalton ağırlığında ve β globulin yapısında bir pentamerdir. CRP ve C maddesince oluşturulan kompleksler kompleman aktive etmektedir (13).

Pnömonokların diğer bir somatik antijeni de, memeli hücrelerindeki Forssman yüzey antijeni ile çapraz reaksiyona girdiği için F antijeni olarak bilinen lipoteikoik asittir (13).

2.6. *S. pneumoniae*'de Virulans Faktörleri ve İnfeksiyonlarının Patogenezi

S. pneumoniae'nin patogenezinde rol oynayan virulans faktörleri hakkında bilgilerin çok fazla olmamasının en önemli nedeni bakteri DNA'sının keşfinin geç olmasıdır (32).

Pnömonok aracılığı ile oluşan hastalıklar esas olarak konağa giren mikroorganizmaların oluşturduğu inflamatuvar cevabın sonucu olarak meydana gelirler. Hastalık oluşturmada temel faktör pnömonokların özgül antikapsüller antikorlar oluşuncaya kadar fagositozdan kaçabilme yeteneklerine sahip olmalarıdır (15).

İlk yapılan fare deneylerinde polisakkarit yapıdaki kapsülün virulanstaki önemi ortaya çıkmış ancak sonrasında agranülositozlu tavşanlarda kapsülsüz mikroorganizmaların da ağır klinik tabloya yol açtığı gösterilmesiyle, kapsülün dışında peptidoglikan ve teikoik asit gibi hücre duvarı elemanları ve yüzeysel proteinler gibi hücre yapılarının da infeksiyonun farklı basamaklarında rol aldıkları ve patogenezdaki önemleri kanıtlanmıştır (33, 34, 35).

2.6.1. Bakteriyel Yapışma (Aderans) ve Kolonizasyon

Pnömonoksik infeksiyonun gelişmesinde birinci basamak bakteriyel yapışma veya aderanstır. *S. pneumoniae* yüzeyindeki protein yapıdaki adezinler ile epiteliyal hücre reseptörleri arasında özgül bir birleşme söz konusudur (7). Faringeal epiteliyal hücrelerdeki glikolipidlerin disakkarid komponenti (N-asetil heksozamin galaktoz-G1cNA β 1-4Gal) başlama yeri olarak rol oynar (34, 36). Normal konakta mukosilyer hareket ya da öksürük refleksi gibi özgül olmayan mekanizmalar aracılığıyla bakteriler kolayca temizlenerek alt solunum yoluna geçişleri engellenir. Ancak viral infeksiyon ya da alerji nedeniyle östaki borusunun ve sinüs boşluğunun konjesyona uğradığı durumlarda ya da sigara ve kronik viral infeksiyonların etkisiyle bronşiyal klirensin

bozulduğu durumlarda, akciğer dokusunda bakterilerin çoğalmalarında bir artış meydana gelir (33).

Kolonizasyonda rol oynayan diğer bakteriyel komponent ise salgısal IgA1 (sIgA) proteaz üretimidir (34, 37). Bu enzim sIgA1'in Fab ve Fc bağlantısını parçalayarak pnömokokların mukus içinde tutulmasını engeller (34).

2.6.2. Üst Solunum Yollarının Siliyer Aktivitesinden Korunma

Nazofarinks bölgesinde kolonize olan pnömokokların akciğere, sinüslere ve üstaki borusuna geçebilmeleri, üst solunum yollarının siliyer aktivitesinden korunmalarına bağlıdır (34). Bu aşamada pnömölizin önemli rol oynar. Pnömölizin, tiyol aktive eden toksin ailesine ait olan, tüm patojen klinik pnömokok suşları tarafından üretilen, 53-kDa ağırlığında sitoplazmik bir enzimdir (38, 39). Pnömölizinin, özellikle pnömokok infeksiyonları patogenezinin erken döneminde farklı işlevleri vardır. Enzim broşlarla ilgili olan sillerde sitotoksiktir. Konak hücre membranındaki kolesterole bağlanıp porlar oluşturarak membranı parçalar. Bu özelliğinden dolayı silli bronşiyal epitel hücrelerinin alt solunum yollarındaki mukusu temizleme yetenekleri azalır. Bu durum pnömokokal infeksiyonun yayılmasını kolaylaştırır (34, 39, 40). IgG'nin Fc kısmına bağlanarak yaptığı kompleman aktivasyonu yanında TNF-a (Tümör Nekroz Faktör), interlökin-1 üretimini de indükleyerek inflamasyona neden olur (7).

Akciğer dokusunda pnömokokların tutunmasını artıran diğer önemli bir faktör de fibronektinlere pnömokokların bağlanabilme özellikleridir. Doku hasarı sırasında fibronektinler ortaya çıkar ve trombosit aktive edici faktör (PAF) reseptörleri olarak ortama salınırlar. Bu reseptörlerin pnömokokal hücre duvarında bulunan fosforilkolini bağlama yetenekleri bulunmaktadır (16, 33, 34).

2.6.3. Fagositozdan Korunma

Pnömokok konağın fagositik hücrelerince sindirilme ve öldürülme süreçlerinden kaçabildiğinden hastalık oluşturabilmektedir. Esas patojenik etki konak dokularda çoğalma ve yoğun inflamatuvar cevap oluşması ile gerçekleşmektedir (7).

Siliyer aktiviteden kaçabilen ve akciğerlere ulaşan bakteriler konak direnç mekanizmasının bir sonraki basamağı olan alveoler makrofajların fagositik aktivitesiyle karşılaşılırlar (32, 33, 34).

Fagositozdan kurtulmada asıl rolü kapsül oynamaktadır. Kapsülün fagositozu önleme mekanizmaları tam olarak anlaşılammakla birlikte; fagositik hücrelerde kapsüller polisakkaritleri tanıyan reseptörlerin yokluğu, fagositik hücreleri iten elektrokimyasal bir gücün varlığı ve bakteriye yapışan antikor ve komplemanın kapsül tarafından maskelenmesi nedeniyle opsonizasyonun gerçekleşmemesi gibi olasılıklar üzerinde durulmaktadır (7, 34).

2.6.4. Kompleman Aktivasyonu

Pnömokoklar, hücre duvar yapıları ve pnömolizin enzimleriyle konakta yoğun inflamatuvar cevaba yol açarak infeksiyon tablosuna sebep olurlar.

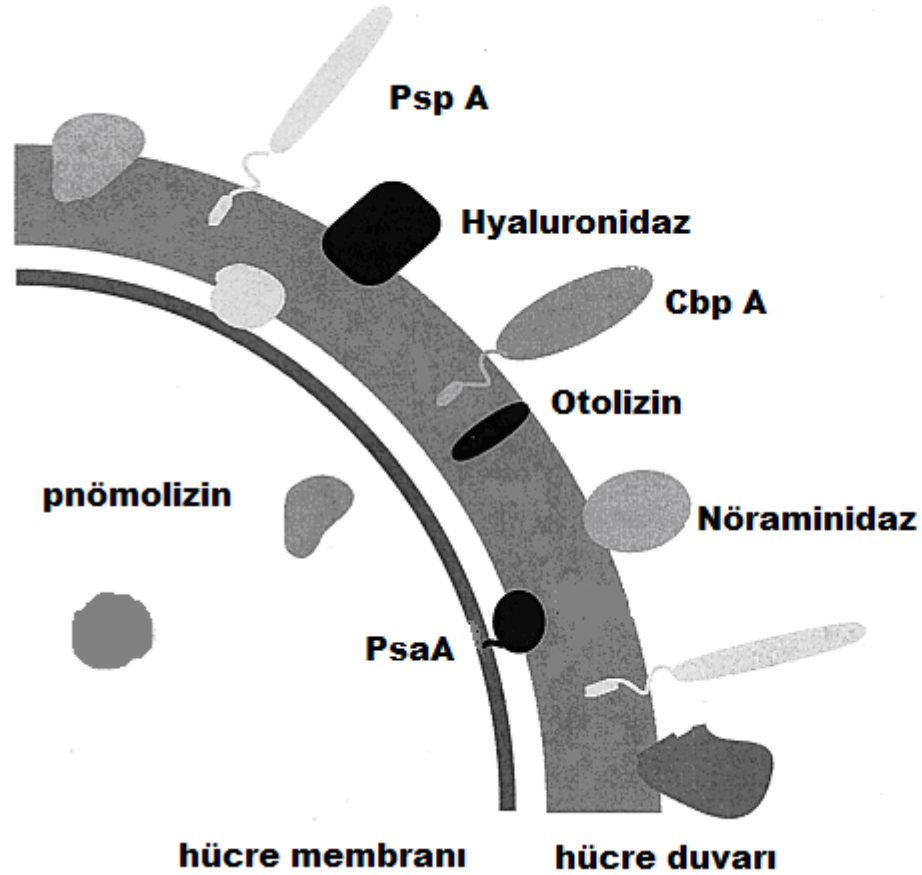
Pnömolizin enzimleri komplemanı iki şekilde aktive eder. İlki direkt olarak C_{1q}'ın pnökok kapsülüne bağlanmasını sağlayan uyarıcı etkisidir. İkincisi ise, dolaylı yoldan komplemanı aktive etmesidir ki antikorların Fc kısımlarına bağlı pnömolizinin direk değil de antikor üzerinden komplemanı uyarmasına bağlı gerçekleşmektedir (20).

Teikoik asit ve peptidoglikanı içeren pnökokların hücre duvar yapıları komplemanı alternatif yoldan aktive edebilirler. Bu yolun aktivasyonu sonucunda ortama C5a salınır (7). C5a polimorf nüveli lökositler (PNL) için kemotaktik etkilidir. Sonuç olarak bölgeye bol miktarda PNL göçü olur. Ancak hücre duvarına bağlı bulunan C3b kapsül tarafından maskelendiği için fagositik hücrelerin yüzeyinde bulunan reseptörlerle birleşemez ve fagositoz gerçekleşemez (34). Hücre duvarı polisakkaritlerine karşı oluşan antikorlar komplemanı klasik yoldan aktive edebilmektedirler. Böylece hem alternatif hem de klasik kompleman yolunun aktivasyonu sonucu oluşan yoğun inflamatuvar cevap konakta pnökokal infeksiyon tablosuna sebep olmaktadır. *S. pneumoniae*'nin hücre duvarı bileşenleri olan peptidoglikan ve lipoteikoik asitler, inflamatuvar sitokinlerinden interlökin-1, interlökin-6 ve TNF salınımına yol açarlar. Bakteriyel DNA ve pnömolizinler de inflamatuvar sitokinlerin salınımını artırır (7).

2.6.5. Diğer Virülans Faktörleri

Pnökokal yüzey protein A (Psp A): Yapılan antikor çalışmaları sonucu, Psp A'nın hücre duvarı yüzeyinde bulunan ve tüm *S. pneumoniae* suşlarında varolan bir yüzey proteini olduğu gösterilmiştir. Psp A'nın moleküler boyutu 67-99 kDa arasında değişir. Pnökok için koruyucu bir antijen olan Psp A'nın görevi konağın kompleman

sistemine karşı koruma sağlamaktır (39, 41, 43). Yapılan çalışmalarda PspA' nın yüksek polar elektrostatik yüke sahip olduğu, molekülün elektropozitif ucu sayesinde kapsüler yükün stabilize olup PspA' nın baskın olan elektronegatif kısmı sayesinde kompleman aktivasyonunu önlediği gösterilmiştir (43, 44, 45).



Şekil 2.3 *S. pneumoniae*'nin virülans faktörlerinin şematik düzenlenmesi (39)

Pnömonokokal yüzey adezini A (PsaA): 37-kDa ağırlığındaki PsaA tüm pnömokoklarda bulunur ve konak hücre yüzeyine tutunmada rol oynamaktadır. Fare modelinde yapılan bir çalışmada PsaA' ya karşı oluşan antikorların nazofarinksde pnömokokal kolonizasyonu azalttığı gösterilmiştir (7, 43).

Otolizin (lyt): Otolizinler bakterilerin hücre duvarında bulunan peptidoglikan tabakasını parçalayıp hücrenin lizisine yol açarlar. Hücre membranında bulunan bu enzimler, hücrelerin bölünmesi, hücre duvarının büyümesi gibi çeşitli fizyolojik hücre fonksiyonlarında da rol alırlar (39, 43). Yapılan çalışmalarda otolizin negatif olan mutantların, dirençli suşlara göre daha az virulan olduğu gösterilmiştir (39, 46).

Otolizinler, bazı hayvanlarda inflamatuvar etki yarattığı gösterilmiş olan hücre duvar komponentlerinin salınımına yol açmaktadır. Otolizin A (lyt A) denilen aminaz farelerin akciğerlerine inoküle edildiğinde bu hayvanlarda streptokoklara karşı koruyucu bir yanıt oluşur (39, 46, 47).

Hyaluronidaz: Tüm pnömokok suşları tarafından üretilen bu enzimin patogenezdaki rolü henüz tam bilinmemekle birlikte, hem kültürlerde hemde hücreye ait parçalarda bu enzim bulunmuştur. Konak dokuyu çevreleyen patojen tarafından infeksiyon sırasında invazyonu kolaylaştırmak için salındığı düşünülmektedir (48, 49).

Nöraminidaz: Bu enzim, müköz membran yüzeyinde bulunan sialik asidi parçalar ve bakterinin tutunduğu GlcNAc-Gal molekülünü açığa çıkararak bakteri aderansına ve kolonizasyona neden olur (7). İki tip nöraminidaz vardır. Bunlardan ilki pnömokokun nazofarenks epiteline tutunmasına sağlar. İkincisi ise serumda bulunan komplemanı aktive eden pnömokok yüzey proteinlerini örterek kompleman aktivasyonunu engeller (35). Farelerin nöraminidaz ile bağışıklanması, parenteral pnömokok uygulanması sonucu gelişen enfeksiyona karşı orta düzey bir koruma sağlar. Yani bu durum, nöraminidazın virulansa katkısı olduğunu, fakat bakteri kolonizasyonu açısından ise fazla bir etkisinin olmadığını ifade etmektedir (7). Pnömokok menenjitini geçiren hastaların beyin omurilik sıvılarında (BOS) yüksek seviyede N-asetil neuraminik asit bulunması koma ve bakteriyemi gelişiminde nöraminidazın önemli bir rolü olabileceğini akla getirmiştir (50).

Hidrojen peroksit (H₂O₂): Bakteri metabolizmasının bir yan ürünüdür. Fagositler tarafından açığa çıkarılan oksijen ara ürünlerinin yol açtığı doku hasarının oluşmasına katkıda bulunur (34).

2.7. Epidemiyoloji

S. pneumoniae insanların normal nazal mikrobiyotasının bir sakini ve sağlıklı insanların %2-65'inden izole edilebilir (30, 51). İlk nazofaringeal kolonizasyon 4 günlük ile 18 aylık çocuklarda ortaya çıkmakta ve pnömokok ile kolonize 3 yaş altı çocuklardan izole edilen suşların %65'ini 6, 14, 19 ve 23 serotipleri oluşturmaktadır (52). Kolonizasyon 3. yaşta en yüksek oranda bulunur ve 10. yaştan itibaren düşmeye başlar (18). Kreşlerde çok sayıda küçük çocuğun yakın teması pnömokok taşıyıcılığı ve kolonizasyon döngüsünü kolaylaştırmaktadır (52). Kolonizasyon ve infeksiyon görülme sıklığı mevsimsel değişiklikler gösterir ve özellikle de kış ortasında en sık görülür (53).

Pnömoni, otitis media ve bakteriyemi için hastalığın ekim-kasım ayları arasında yoğunlaştığı, şubat ayında da zirveye ulaştığı bildirilmiştir. Bu mevsimsel değişikliğin ilk döneminde artan viral solunum yolu infeksiyonları ile yakından ilişkili olabileceği ileri sürülmektedir (7).

Pnömonoklarda bulaşma, yakın temasla havadan aerosol inhalasyonu ile olmaktadır. Pnömonoklar, yakın temas dışında havada asılı kalabilen partikülleri sayesinde bir bireyden diğerine kolaylıkla yayılabilir. Yeni yürümeye başlayan çocuklar kreşlerde bu organizmaların yayılımı açısından önemli rol oynar. Yetişkinlerin toplu yaşadıkları yurtlar, askeri kamplar, cezaevleri, hastaneler, düşkünlere ve kimsesizlere ait barınaklar, pnömokok epidemiyolojisi açısından önemli risk faktörleridir (7, 35, 53).

S. pneumoniae'nin klinik belirtileri değişkendir fakat iki büyük kategoriye ayrılabilir; *invaziv infeksiyonlar* organizmaların, kan dolaşımı, merkezi sinir sistemi gibi vücudun normalde steril olan kısımlarından izole edilir, *mukozal infeksiyonlar* ise solunum yollarıyla ilgilidir.

S. pneumoniae, toplum kökenli pnömoni, menenjit, akut otitis media ve akut bakteriyel sinüzit olgularının en sık nedenidir. Pnömonokok infeksiyonlarında, piyojenik artrit, osteomyelit, piyomiyosit, nekrotizan fasiit, endokardit, perikardit, mikotik anevrizma, merkezi sinir sistemi abseleri, bakteriyel peritonit, üriner ve genital sistem infeksiyonları, kabakulak, epiglottit, bukal veya periorbital selülit, mastoidit, endoftalmis ve konjunktivit ise daha nadir belirtilerdir. Pnömonokok infeksiyonları hemolitik üremik sendrom, trombotik trombositopenik purpura, Waterhouse-Friderichsen sendromu ve rabdomiyoliz gibi diğer infeksiyon ajanları ile nadiren de olsa ilişkilendirilebilmektedir (54).

2005'te Dünya Sağlık Örgütü'nün yapmış olduğu tahminlere göre her yıl yaklaşık 1,6 milyon insan pnömokoklara bağlı hastalıklardan hayatını kaybetmektedir. Yapılan bu tahminlere göre ölümlerin 0,7-1 milyonunu geliştirmekte olan ülkelerde yaşayan 5 yaş altı çocuklar oluşturmaktadır (55).

Pnömonokoklar toplum kökenli pnömonilerin en yaygın nedenidir. Toplum kökenli pnömonilerin %20-40'ından, Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH) akut alevlenmelerinin %15-25'inden ve akut sinüzit olgularının %30-40'ından *S. pneumoniae* sorumludur (56).

Pnömokoksik pnömoninin genç erişkinlerde antibiyotik öncesi dönemdeki görülme oranı yaklaşık 100 binde 700 iken, antibiyotik sonrası dönemde yaşlılar için bu oran 280'e ve genç erişkinler için 20'e inmiştir (7).

Riskli gruplarda antibiyotik öncesi dönemde pnömokoksik pnömoniye bağlı ölüm oranı %77 iken, bu oran 1950-60'lı yıllarda %28'e 1970'li yıllarda ise %25'e gerilemiştir (57). Tedavi edilmemiş bakteriyemik hastalarda ise mortalite %80'lere kadar ulaşmaktadır (58).

Pnömokoksik menenjitler epidemiler şeklinde seyreden meningokoksik menenjitler bir yana bırakılırsa, sporadik vakaların birincil nedenini oluşturmakta ve mortalitesi %10-60 arasında değişmektedir (59).

Pnömokoklar erişkin ve çocuklarda otitis medianın en önde gelen nedenidir. Yapılan çalışmalarda çocuklarda etkenin izole edildiği otit ve sinuzit vakalarının %40-50'sinden tüm vakaların da %30-40'ından pnömokokların sorumlu olduğu ortaya konmuştur (7).

İnfeksiyonun görülme sıklığı beyaz ve zenci ırkta da farklılık göstermektedir. Kuzey Amerika'dan alınan Atlanta verilerinde ortalama infeksiyon görülme insidansı beyazlarda 100.000 de 18, zencilerde ise 48 olarak saptanmıştır. Yine 2 yaş altındaki çocuklarda insidans, zencilerde 100.000'de 300, beyazlarda ise 100'dür. Bunun dışında sosyoekonomik düzeyi düşük kesimlerde invazif pnömokok hastalığının daha yoğun olduğu bildirilmektedir (60).

Amerika Birlesik Devletleri'nde bir yılda karşılaşılan toplum kaynaklı pnömonilerin yaklaşık 500.000'i, bakteriyemik infeksiyonların 50.000'i, menenjitlerin 5000-6000'i ve otitis mediyaların ise 6 milyonuna *S. pneumoniae*'nin neden olduğu bildirilmiştir (61). İsviçre'de 1985-1994 yıllarında 17 yaş altı çocukların dahil edildiği bir çalışmada 393 olgunun %42'sini menenjit, %28'ini pnömoni ve %26'sını da bakteriyemi oluşturmuştur. Yıllık insidans 17 yaş altı çocuklarda 100.000 de 2,5 iken; 2 yaş altında 100.000'de 11 olarak belirlenmiştir. Mortalite menenjit görülen vakalarda %8,6 ve bakteriyemik hastalarda ise %8,9 bulunmuştur (62).

2.8. S. *pneumoniae*'nin Sebep Olduğu Klinik İnfeksiyonlar

2.8.1. Pnömoni

S. pneumoniae'nin alveolar boşluklarda üremesiyle pnömokoksik pnömoni gelişmektedir. Aspirasyon sonrasında pnömokoklar besince zengin olan ödem sıvısında hızlıca üremektedirler. Tıkalı olan kapillerden dışarı sızan eritrositler alveoller içinde birikmekte ve sonrasında bunu makrofajlar ve nötrofiller takip etmektedir. Mikroorganizmanın fagositozunu kolaylaştıran özgül antikapsüler antikorların oluşmasıyla rezolüsyon meydana gelmektedir (16). Pnömokoksik pnömoninin gelişimi ani başlayan bir üşüme, titremenin ardından kısa süre sonra gelişen ateş ve paslı balgam ile olmaktadır. Hastaların çoğu boğaz ağrısı, balgamsız öksürük yakınmaları ve birkaç günlük viral enfeksiyon bulgularına sahiptirler ya da devamlı öksürükle karakterize olan kronik akciğer hastalığı öyküsüyle başvururlar . Pnömoni ileri yaşlardaki hastalarda ateş ve balgam olmaksızın, hafif öksürük, halsizlik ve konfüzyonla seyredebilir (15).

En ağır seyir ise asplenik hastalarda görülür. Bu hastalarda antikor oluşumunun bozulması ve bakterinin kandan temizlenmesi zorlaştığı için hastalık çok daha ağır seyretmektedir (15).

Pnömokoksik pnömoninin diğer önemli bir semptomu da plöretik tipte yan ağrısıdır. Fizik muayenede hasta genellikle halsiz soluk ve dehidrate görünümündedir. Tutulumun olduğu tarafta göğüs duvarı hareketleri azalmış ve yardımcı solunum kasları devreye girmiştir. Mortalite hastanın yaşına, altta yatan hastalığa ve mikroorganizmanın serotipine bağlı olarak değişiklik göstermektedir. hastalarda antikor oluşumunun bozulması ve bakterinin kandan temizlenmesi zorlaştığı için hastalık çok daha ağır seyretmektedir (15).

2.8.2. Sinüzit ve Otitis media

Pnömokoklar paranazal sinüslerin ve orta kulağın akut infeksiyonlarının en yaygın görülen etkenleridir. Hastalık genellikle üst solunum yollarının viral infeksiyonundan ve sonrasında da orta kulak kanalına ve sinüslere sızan ve buraları tıkayan PNL'lerden kaynaklanmaktadır. Orta kulak iltihabı (otitis media) çoğunlukla çocuklarda görülürken bakteriyel sinüzit tüm yaşlarda görülebilmektedir (16).

Çocuklarda en sık saptanan pnömokok infeksiyonu otitis media ve sinüzittir. *S. pneumoniae*, etiyolojik ajan izole edilen akut otitis medialı olguların %30-60'ında, bakteriyel sinüzitlerin %30-50'sinde etken olarak saptanmaktadır (16, 63, 64).

2.8.3. Menenjit

Bakteriyemi, sinüslerin ya da orta kulağın infeksiyonu veya nazofarinksle subaraknoid boşluk arasında iletişim sağlayan kısımda meydana gelen kafa travmaları sonrasında pnömokoklar merkezi sinir sistemine yayılabilmektedir. Hastaların çoğu çocuk olmakla birlikte tüm yaşlarda bakteriyel menenjit görülebilmektedir. Pnömokokların sebep olduğu menenjitli hastalardaki mortalite ve ciddi nörolojik bozukluk oranı diğer organizmaların sebep olduğu menenjitli hastalardakine oranla 4-20 kat daha fazladır (7). Çocuklardaki menenjitin %15'inde ve yetişkinlerdeki menenjitin %30-50'inde etken *S. pneumoniae*'dir (10).

2.8.4. Bakteriyemi

İnfeksiyon odağı olmaksızın bakteriyemi 3-36 ay arasındaki ateşli çocukların yaklaşık %4 kadarında görülür. Gizli bakteriyemili çocukların %85'inde etken pnömokoklardır. Sinüzit ve otitis media infeksiyonlarında bakteri kanda bulunmaz (65).

2.8.5. Diğer Klinik İnfeksiyonlar

Piyojenik artrit, osteomyelit, piyomyosit, nekrotizan fasiit, endokardit, perikardit, merkezi sinir sistemi abseleri, bakteriyel peritonit, üriner ve genital sistem infeksiyonları, kabakulak, epiglottit, bukal veya periorbital selülit, mastoidit, endoftalmit ve konjunktivit ise daha nadir belirtilerdir (7).

2.9. Pnömokok İnfeksiyonlarında Laboratuvar Tanısı

Mikroskopik inceleme: Klinik örneklerden ilk olarak Gram preparatı hazırlanır. Preparatlar incelendiğinde mum alevi biçiminde, kapsüllü, PNL'ler içinde ve dışında diplokoklar görülmesi mikrobiyolojik tanı açısından önemlidir (11, 16, 43).

Kültür: Pnömokok infeksiyonlarının kesin tanısı kültür ile konulmaktadır. Şüphelenilen klinik örnekler %5 oranında koyun kanı içeren agara ekilir ve %5 CO₂'li ortamda 35°C'de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılır. Balgam kültürlerinde çok daha hızlı üreyen normal flora elemanlarını baskılamak amacıyla besiyerine 5 mg/ml gentamisin eklenebilmektedir (14).

Kanlı agar besiyerinde pnömokok kolonileri sıklıkla ortası çukur veya kaba görünüm sergileyen mukoid yapıda görünmektedir. Pnömokoklar tarafından üretilen hemolizin enzimi aracılığıyla hemoglobinin parçalanması sonucunda kolonilerin altında ve çevresinde alfa hemoliz olarak adlandırılan yeşilimsi bir zon bulunmaktadır. Pnömokoklar, kolonilerinin safrada erime özelliği, optokin duyarlılığı ve inülini parçalama özellikleri ile diğer alfa hemoliz yapan streptokoklardan ayrılmaktadır (15, 66).

Antijen aranması ve Lateks testi: İnvaziv pnömokokal infeksiyonların kesin tanısında altın standart yöntem, pnömokokların kan ya da diğer steril vücut bölgelerinden izole edilmeleridir. Ancak günümüzde kapsül komponentlerinin immunolojik tanımlanmasına yönelik aglütinasyon testleri de yaygın tanı yöntemi olarak kullanılmaktadır. Antijen aranması, menenjit olgularında bakteri elde edilemediğinde tanı açısından kolay bir yöntemdir. Biyolojik örnekler arasında idrar, insanda bakteriyemi oluşturan bakteriyel infeksiyonların antijen saptanması yoluyla tanısında yaygın olarak karşımıza çıkmaktadır (66, 67).

ELISA yöntemi ile serumda kapsüller antijenlere karşı oluşan antikorların saptandığı serolojik testlerin düşük duyarlılık ve özgüllüklerinden dolayı tanımlama amacıyla kullanılması önerilmemektedir (7).

Moleküler Tanı: Son zamanlarda açığa çıkan optokine dirençli pnömokoklar, optokine duyarlı viridans streptokoklar, safrada erimeyen pnömokoklar ya da karşılaştırmalı immuno-elektroforez, koaglütinasyon gibi serolojik testlerde çıkan olası hatalar ve yanlış pozitif sonuçların rapor edilmesiyle, araştırmacılar pnömokokları tanımlamada farklı yöntemlere yönelmişlerdir (43).

Moleküler tanıda başlıca DNA-DNA hibridizasyonu, DNA prob hibridizasyonu, 16S rRNA sekanslama ve PZR teknolojisine dayalı yöntemlerdir. MLST (multilocus sequence typing) ve LAMP (loop-mediated isothermal amplification) hata oranını azaltmak amacıyla son yıllarda geliştirilen diğer yöntemlerdir (22, 68, 69). PZR en çok uygulanandır ve bakterinin otolizin (autolysin, *lytA*), pnömolizin (pneumolysin, *ply*), pnömokok tutunma faktörü (pneumococcal adhesin A), pnömokok yüzey proteini (PspA), manganeze bağlı superoksit dismutaz (manganese-dependent superoxide dismutase, *sodA*) gibi virulans genlerini saptamaktadır (22).

Araştırmacılar diğer alfa-hemolitik streptokoklarda bulunmayan pnömokokal toksin genlerini içine alan virulans genlerinden *ply* genini hedef alan PZR yöntemi ile tipik pnömokokları saptayabildiklerini ancak atipik pnömokokları saptamada yöntemin yetersiz olduğunu göstermişlerdir (43, 70). Messmer ve ark. yaptığı çalışmada hem tipik pnömokokları saptamak hemde tiplendirilememiş pnömokokların atipik streptokoklardan kesin olarak ayırımını sağlamak amacıyla *lytA*, *psaA* ve 2 adet *ply* genini hedef alan primerler tasarlayarak dört ayrı PZR yöntemi geliştirmişlerdir. PZR sonuçları optokin duyarlılık, safrada erime, kapsül şişme reaksiyonu ve AccuProbe testi ile karşılaştırılmış ve *lytA* primerleri ile uygulanan PZR, test edilen 100 suş için %100 özgül bulunurken *psaA* primerleri ile uygulanan PZR %99 özgül bulunmuştur (71).

Günümüzde araştırmacılar pnömokokal hastalıkların tanısında daha yeni nükleik asit temelli yöntemler geliştirmektedirler. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, diğer konvansiyonel testlere oranla daha hızlı sonuç vermesi, kontaminasyon riskini en aza düşürmesi ve daha pek çok avantajından dolayı *lytA*, *ply* ve *psaA* gibi pnömokokal virulans genlerini saptamada umut vermektedir (72).

2.10. Tedavi

S. pneumoniae infeksiyonlarının tedavisinde penisilin ilk aşama olarak kullanılan antibiyotik olup son yıllarda pnömokoklarda görülen penisilin direncinden dolayı tedavi antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarına göre verilmelidir. *S. pneumoniae* infeksiyonlarının başarılı bir şekilde tedavisi, infeksiyonun yerine ve patojenin duyarlılık düzeyininin bilinmesine bağlıdır (25).

Pnömokoklarda penisiline karşı başlıca direnç mekanizması penisilin bağlayan proteinlerdeki değişiklik nedeniyle olduğundan, penisilin MİK değerlerindeki artışa paralel olarak tüm beta-laktamların da MİK değerleri artmaktadır. (73).

Pnömokoksik infeksiyonların penisilin ile tedavisi dirençteki yüksek ve düşük düzey tanımlamaları ve infeksiyon bölgesinde ulaşılabilen antibiyotik konsantrasyonu olmak üzere iki faktöre bağlıdır. Duyarlı ve düşük düzeyde direnç gösteren kökenlerin neden olduğu otit, sinüzit ve ağır olmayan pnömöni gibi infeksiyonlar penisilin ile tedavi edilebilirken (doz artırılarak), menenjit olguları penisilin tedavisine yanıt vermezler. Ayrıca, yüksek düzeyde direnç gösteren suşlarla oluşan hiçbir pnömokoksik infeksiyonda penisilin kullanılmamalıdır. Yüksek düzeyde dirençli kökenlerle oluşan infeksiyonlarda ve pnömokoksik menenjitlerde bakterinin antibiyotik duyarlılığı

belirlenene kadar tedavide seftriakson veya sefotaksim gibi üçüncü kuşak sefalosporinler kullanılmalıdır. Ancak, penisiline yüksek düzeyde direnç gösteren pnömokoklarda sefalosporinler ile çapraz direnç de olabilir ve bu durumlarda mutlaka üçüncü kuşak sefalosporin duyarlılığı da belirlenmelidir (25, 73, 74). Makrolidler pnömokokların tedavisinde uygun antibiyotikler olmakla birlikte makrolid direnci artış göstermektedir. Klindamisin, penisilin dirençli bir çok pnömokoka karşı oldukça etkilidir. Tetrasiklinler ve trimetoprim-sulfametoksazol, direnç oranlarının yüksek olması nedeni ile uygun seçenekler değildirler. Yeni florokinolonlar tedavi seçenekleri içinde yer alan antibiyotiklerdir (74).

2.11. Korunma

Pnömokok suşları arasında antimikrobiyal direnç gelişimi insidansındaki ve pnömokokların sebep olduğu infeksiyonlardaki artış, bu bakterilere karşı korunmada aşılama gibi alternatif stratejilerin geliştirilmesine yol açmıştır.

Ölü bakteri aşısı olan ilk kuşak pnömokok aşısı Sir Almroth Edward Wright ve arkadaşları tarafından bulunmuştur (9). Bu aşı ilk defa ABD askerlerinde kullanılmış ve insanlarda bağışıklık kazandırarak pnömoniden koruduğu gösterilmiştir. ABD’de 7 valanlı polisakkarit aşısı 1977 yılında kullanım ruhsatı almıştır. FDA 1992 yılında 23 valanlı polisakkarit aşısının 2 yaş üstü çocuklarda kullanımını onaylamıştır (75).

Pnömokokal aşı endikasyonları aşağıdaki şekilde belirtilmektedir:

A- Yetişkinler:

1- Atmışbeş yaş üzerindeki bireyler ya da kronik pulmoner, kardiyovasküler hastalığı, diyabeti, siroz hastalığı olanlar, alkol bağımlıları.

2- İmmün sistemi baskılanmış olanlar: Asplenikler, Hodgkin ve non-Hodgkin lenfomalılar, nefrotik sendromlu olanlar,

3- HIV infeksiyonu olanlar.

B- Çocuklar:

1- İki yaş üzerinde bulunan kronik hastalığı ya da asplenik ve orak hücreli anemisi olan çocuklar.

2- HIV infeksiyonu olan 2 yaş üzerindeki çocuklar.

Altta yatan hastalığı olan 2-64 yaş arası bireyler ve 65 yaş üstü kişiler için 1983 yılından bu yana uygulanan 23 valanlı polisakkarit aşının (PPV) kullanılması önerilmektedir. Yetişkinlerde ve yaşlılarda invaziv pnömokokal hastalıkları azaltmada PPV'nin etkili olduğu gösterilmiş olsa bile immun sistemi ciddi baskılanmış kişilerde daha az etkili olduğu belirtilmiştir (52, 53). Ayrıca 2 yaşın altındaki çocuklarda etkisiz olduğu gösterilen PPV'nin çocuklarda ve yetişkinlerdeki pnömokok taşıyıcılığı üzerine önemli bir etkisinin olmadığı da yapılan çalışmalarda belirtilmiştir (43, 76).

PPV'nin zayıf immünojenik olması ve tüm hasta gruplarında etkili olmamasından dolayı polisakkarit-protein konjuge aşı geliştirme çalışmaları başlamıştır. ABD'de 2000 yılında, Avrupa birliğinde 2001 yılında lisans alan ve 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F gibi en sık izole edilen serotipleri içeren 7 valanlı konjuge aşı (PCV7) ABD'de ve diğer pek çok ülkede çocuklarda en yaygın uygulanan aşı olarak bilinmektedir. Yedi serotipi içeren aşı, ABD'de görülen serotiplerin %80'den fazlasını, Kanada, Afrika ve Avrupa'da ise %70-88'ini kapsamaktadır. Ancak, Asya ve Latin Amerika ülkelerinde görülen invaziv pnömokok hastalıklarının %65'den azını kapsamaktadır. PCV7 aşısında bulunan 7 serotipin 5'i (6B, 9V, 14, 19F ve 23F) yüksek düzeyde antibiyotik dirençli serotiplerden olup 2'sinde (18C ve 4) direnç gelişimi nadir görülmektedir. Serotipler ve direnç arasındaki bu ilişkiden dolayı PCV7 aşısı dirençli suşların sebep olduğu hastalık insidansını ve toplumdaki dirençli pnömokokların sirkülasyonunu azaltmada önem taşımaktadır (76, 77).

Her ne kadar konjuge aşılarda etkili olduğu gösterilse de son yıllarda aşıda bulunmayan serotiplerin insidansında da artışlar gözlenmektedir. PCV7 aşılarda immunizasyon yoluyla aşıda bulunan serotiplerin nazofaringeal taşıyıcılığının azalmasına karşın aşıda bulunmayan serotiplerin ortaya çıkışı ve kolonizasyonu sonucunda pek çok olguda toplam pnömokokal kolonizasyon oranı değişmeden kalmaktadır (76).

2.12. Makrolidlere Direnç

2.12.1. Makrolidler

14, 15 veya 16 üyeli makrosiklik bir lakton halkasına (aglikon), glikozit bağlarıyla şekerlerin bağlanmasıyla oluşan bir yapı gösterirler.

Eritromisin, spiramisin, josamisin ilk bulunan makrolidlerdir. Daha sonra rokitamisin, azitromisin ve klaritromisin bulunmuştur (78).

2.12.2. Etki ve Direnç mekanizması

Makrolidler ribozomun 50S alt ünitesinin 23S ribozomal RNA'sına geri dönüşümlü bağlanarak protein sentezini inhibe eden antibiyotiklerdir. Pnömonokollarda makrolid direncine iki ana mekanizma aracılık eder:

1. Antibiyotiğin bağlanma hedefinde (ribozom) meydana gelen değişiklik:

Kromozom mutasyonu veya makrolidce indüklenen veya yapısal bir metilazla, ribozom bağlanma yerinin değişimi sonucu kazanılan direnç şeklidir. Fenotipik açıdan 'MLS_B fenotipi' olarak tanımlanan bu mekanizmada, 'eritromisin ribozom metilasyon geni' *erm*(B) tarafından kodlanan metilaz enziminin neden olduğu ribozomal değişiklik, yapıca farklı ama etki mekanizmaları benzer (ribozom bağlanma yerleri aynı) olan antimikrobiklere (klindamisin, streptogramin) karşı da çapraz dirence neden olur (makrolid-linkozamid-streptogramin direnci) (78).

2. Dışarı atım mekanizmasında meydana gelen değişiklik (efluks mekanizma):

Bir efluks pompası aracılığıyla antibiyotiğin hücre dışına atılmasıdır. Fenotipik açıdan "M fenotipi" olarak tanımlanan bu mekanizmadan "makrolid efluks geni" (*mef*) sorumludur. Bu mekanizmaya sahip pnömokok suşları, eritromisine orta düzeyde direnç (MİK:1-32mg/L) gösterirler ve hemen tamamı 16 üyeli makrolidlere (rokitamisin, josamisin, spiramisin vb), linkozamidlere ve streptograminlere duyarlıdırlar (79). Pnömonokollardaki efluks mekanizmasından *S. pyogenes* orjinli *mef*(A) geni ve *S. pneumoniae*'de tanımlanan *mef*(E) geni sorumludur. Başlangıçta bu iki gen %90 oranında sekans homolojilerinden dolayı *mef*(A) olarak tek grup altına alınmıştır. Fakat bir çok araştırmacının yaptığı çalışmalar sonucunda bu iki gen arasındaki genetik farklılıklar ortaya çıkmış ve farklı iki gen olarak kabul edilmiştir (80).

Makrolid direncini kodlayan *erm* ve *mef* genleri kromozom, plazmit veya konjugatif transpozonlar üzerinde kodlanırlar (81).

Çok az suşta (%1-3) saptanan diğer bir fenotip *erm*(B) ve *mef*(A/E) genleri bulunmadığı halde bakterinin eritromisin ve klindamisine gösterdiği yapısal dirençtir. *erm* ve *mef* bakterilerde tek tek buldukları gibi, bazı suşlarda beraber, aynı veya farklı genetik yapılar üzerinde bulunabilir (69, 82).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Suşlar

Çalışmaya İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarlarında incelenen klinik örneklerden izole edilen toplam 80 suş dahil edildi. Suşlar %5 koyun kanlı agara ekilerek 35°C'de %5-10 CO₂'li etüvde 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. Kültürden hazırlanan Gram preparatlarında Gram-pozitif kok ve diplokok görünümündeki suşlar pnömokok doğrulaması için tanımlama testlerine alındı.

3.2. *S. pneumoniae* Tanımlanması

3.2.1. Optokin (etilhidrokuprein hidroklorit) Duyarlılık Testi

Çalışmaya alınan suşların pnömokok olduğunu kesin olarak belirlemek amacı ile optokin duyarlılık testi yapıldı. Bu test için pnömokok olduğundan şüphe edilen, %5 koyun kanlı agarda saf olarak üreyen, alfa hemoliz yapan kolonilerden tek tek üreyen birkaç koloni öze yardımı ile alınarak %5 koyun kanlı besiyerine homojen olacak şekilde ekildi. Ekimi yapılan plaklar üzerine 6 mm çaplı ve 5 µg optokin içeren Taxo 'P' diski (BBL, USA) yerleştirilerek 35°C'de %5 CO₂'li etüvde 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. Diskin etrafında 14 mm'ye eşit ya da daha fazla inhibisyon zonu oluşan besiyerinde üreyen bakteriler *S. pneumoniae* olarak tanımlandı.

3.2.2. Safrada Erime Testi

Optokin duyarlılık testine ek olarak çalışmada pnömokokların tanımlanmasında safrada erime testi yapıldı. *S. pneumoniae* kolonileri %5 koyun kanlı agarda üretildikten sonra bu kolonilerin üzerine %2'lik safra solüsyonu damlatıldı ve plaklar 35°C'ye ayarlı %5 CO₂'li etüve konularak yarım saat bekletildi. Safra damlatılan kısımda bulunan bakteriler lizise uğrayıp eridiklerinde, pnömokok olarak yorumlandı.

3.3. Antibiyotik Duyarlılıkları

Suşların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde disk difüzyon ve E-test yöntemleri kullanıldı.

Çalışmamızda optokin, eritromisin, klindamisin, azitromisin, klaritromisin, kinupristin/dalfopristin, oksasilin, siprofloksasin, levofloksasin, trimetoprim-sulfametoksazol ve tetrasiklin diskleri kullanıldı. Antibiyotik disklerinin potenslerini koruyabilmek amacıyla +4°C'de saklandı ve üretici firma tarafından belirtilen son kullanma tarihini aşmamaya özen gösterildi. Disklerin potenslerini kaybetmemeleri için kapalı kutuda muhafaza edilmeleri sağlandı, nemli ortamdan korundu ve su ile temas etmelerinden kaçınıldı.

3.3.1. Disk Difüzyon Testi

Antibiyotik duyarlılık testleri CLSI kriterlerine göre Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile değerlendirildi. 24 saatlik taze kültür pasajından saf olarak elde edilen bakteri kolonileri deneylerde kullanıldı. Bu kolonilerden triptik soy buyyonda 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlandı. Süspansiyonun bulanıklığını ayarladıktan sonra en fazla 15 dakika içerisinde, içine steril bir eküvyon daldırıldı ve fazla inokulumu önlemek için tüpün sıvı üstünde kalan bölümünde eküvyonu tüp duvarında sıkıca bastırarak birkaç kez döndürüldü. Hazırlanan eküvyon ile %5 koyun kanlı agar plağının tamamına ekim yapıldı. En fazla 30 dakika içerisinde diskler yerleştirilip 35°C'ye ayarlı %5 CO₂'li etüvde 18-24 saat inkübe edildi. Çalışmamızda incelenecek suşların antibiyotik duyarlılık durumlarının araştırılması amacıyla optokin (5 µg), eritromisin (15 µg), klindamisin (2 µg), azitromisin (15 µg), klaritromisin (15 µg), kinupristin/dalfopristin (15 µg), oksasilin (1 µg), levofloksasin (5 µg), trimetoprim-sulfametoksazol (1.25/23.75 µg) ve tetrasiklin (30 µg) diskleri (BD, USA) kullanıldı. Uygulanan testin kontrolü *S. pneumoniae* ATCC 49619 suşu kullanılarak yapıldı.

3.3.2. Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) tayini

Çalışmaya alınan suşların makrolid-linkozamid-streptogramin B grubu ve oksasiline dirençli olanlarının MİK değerleri, CLSI standartlarına uyularak E-test yöntemi ile saptandı. 24 saatlik taze kültür pasajından saf olarak elde edilen bakteri kolonilerinden triptik soy buyyonda 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu

hazırlandı. Steril eküvyon yardımıyla %5 koyun kanlı agar plağının tamamına ekim yapıldı. -20°C’de muhafaza edilen E-test şeritleri oda ısısına gelmeleri için 30 dakika kadar beklendikten sonra steril edilmiş pens yardımı ile plaklara yerleştirilip 35°C’ye ayarlı %5 CO₂’li etüvde 18-24 saat inkübe edildi.

Çalışmamızda oksasilin diski kullanılarak yapılan disk difüzyon yönteminde inhibisyon zonu 20 mm’ye eşit ve daha büyük olan suşlar penisiline duyarlı olarak değerlendirildi. Oksasilin zon çapı ≤ 19 olanların penisilin MİK’leri E-test yöntemi ile belirlendi.

İnkübasyon süresinin sonunda yerleştirilen E-test şeritlerinin çevresinde oluşan üreme inhibisyon alanlarının E-test şeritlerini kestiği noktadaki en düşük antibiyotik konsantrasyonları saptandı. Uygulanan testin kontrolü *S. pneumoniae* ATCC 49619 suşu kullanılarak yapıldı.

Çalışmamızda E-test eritromisin (0,016-256 µg/ml), klindamisin (0,016-256 µg/ml), azitromisin (0,016-256 µg/ml), klaritromisin (0,016-256 µg/ml), kinupristin-dalfopristin (0,002-32 µg/ml) ve penisilin G (0,016-256 µg/ml), (AB BIODISK, Sweden E-testleri) kullanıldı.

3.4. Fenotip Tayini

Suşların fenotip tayini ‘Çift disk difüzyon yöntemi’ ile eritromisin (15 µg), klindamisin (2 µg) kullanılarak gerçekleştirildi. Bu testte incelenecek suşların 24 saatlik taze kültürlerinden birkaç koloni alınarak triptik soy buyyonda 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlandı. Steril eküvyon yardımıyla %5 koyun kanlı agar plağının tamamına ekim yapıldı.

Eritromisin (15µg) ve klindamisin (2µg) diskleri %5 koyun kanlı agarda kenardan kenara birbirinden 15 mm uzaklığa yerleştirilerek MLS_B ve M fenotipleri araştırıldı. İnkübasyondan sonra klindamisin zonunda kütleşme görülmeyen mikroorganizmalar klindamisine duyarlı, klindamisin diskinin eritromisin diskine bakan kenarındaki zonda bir kütleşme olması ‘‘D’’ zonu olarak, yani indüklenebilir (iMLS_B) klindamisin direnci gösterir olarak tanımlandı. Sadece eritromisin dirençli, klindamisin duyarlı ve klindamisin zonunun eritromisin yönünde kütleşme yoksa M fenotipi, hem eritromisin hem de klindamisin dirençli olanlar konstitütif (cMLS_B) fenotip olarak tanımlandı.

3.5. Moleküler Yöntemler

3.5.1. Genomik DNA ekstraksiyonu

Makrolidlere (eritromisin, klaritromisin, azitromisin) dirençli bulunan suşların DNA ekstraksiyonu *Roche High Pure Genomik DNA Kit*'i kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı.

Genomik DNA ekstraksiyonu yapılacak olan suşların 24 saatlik pasajlarından alınan koloniler, 1 ml PBS tamponu ile homojenize edildikten sonra, süspansiyonlar 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Üst sıvıları atıldıktan sonra kalan pellete 200 µl 'binding' solusyon ve 40 µl proteinaz K eklenip vorteksenerek 70°C'de 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra sıvılara 100 µl izopropanol eklenerek filtreli kolonlara aktarıldı. Sıvılar 10.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilip, kolonların toplayıcı tüpleri değiştirildikten sonra, üzerine 500 µl Inhibitor Removal Buffer (IRB) solusyonu koyup 1 dakika 10.000 rpm'de santrifüj edildi, kolonların toplayıcı tüpleri değiştirildikten sonra 500 µl %96-100'lük etil alkolle hazırlanan Wash Buffer eklendi. 10.000 rpm'de santrifüj edildikten sonra kolonların toplayıcı tüpleri değiştirildi ve tekrar 500 µl Wash Buffer eklenerek 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Wash Buffer'ın fazlasını almak için kolonların toplayıcı tüpleri değiştirilerek 14.000 rpm'de 1 dakikada santrifüj edildi. Toplayıcı tüpler atılarak kolonlar 1,5 mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Kolonlara 70°C'de ısıtılmış 100 µl steril nükleazsız su eklenerek oda ısısında 1 dakika bekletildi. 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra mikrosantrifüj tüplerinde genomik DNA elde edildi.

3.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

3.5.2.1. DNA Amplifikasyonu

Çalışmamızda araştırılan *S. pneumoniae* DNA'sının amplifikasyonu için tek aşamalı PZR deneyi yapıldı. Deneyde thermal cycler cihazı olarak PTC- 200 (Peltier Thermal Cycler, MJ Research, A.B.D.) kullanıldı.

PZR aşaması:

Şekil 3.1 PZR için gerekli reaktif karışımı

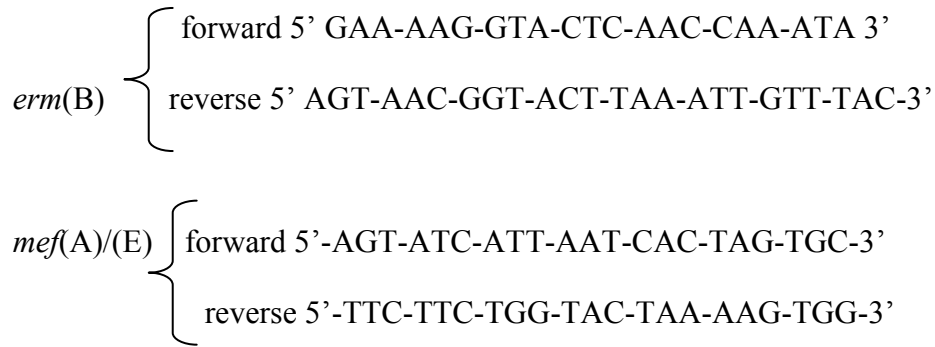
PZR Karışımı	Miktar	Son Konsantrasyon
DNaz-RNaz içermeyen deiyonize su	14,375 µl	-
10X PZR buffer*	2,5 µl	1X
MgCl ₂ * (25 mM)	1,5 µl	1,5 mM
dATP**	her 1dNTP'den 10 mM	200 mM
dCTP **		200 mM
dGTP**		200 mM
dTTP**		200 mM
Primer F	0,5 µl	0,25µM
Primer R	0,5 µl	0,25µM
Taq DNA polimeraz* (5 U/ µl)	0,125 µl	0,625 U
Toplam	20 µl	
Hedef DNA	5 µl	
TOPLAM REAKSİYON HACMI	25 µl	

* MBI fermentas (Litvanya), 10X Buffer, 100 mM Tris-HCl (pH 8.8), 500 mM KCl, MgCl₂ 25 mM.

** MBI fermentas (Litvanya)

3.5.2.2. *S. pneumoniae* İçin Kullanılan Primer Dizileri

Çalışmamızda *erm(B)* ve *mef(A)/(E)* direnç genlerini araştırmak için Sutcliffe ve arkadaşlarının belirlemiş olduğu primerler kullanıldı (83).



Primerler kullanılarak; thermal cycler'da 94°C'de 3 dakikalık başlangıç siklusu sonrası amplifikasyon için 94°C'de 60 saniye denaturasyon, 48°C'de 60 saniye bağlanma ve 72°C'de 1,5 dakikalık uzama olmak üzere 40 siklus sonunda 72 °C'de 10 dakika ekstansiyon yaptırıldı.

3.5.2.3. Çalışmada Kullanılan Kontrol Suşları

Çalışmamızda *erm(B)* direnç geni pozitif olan ATCC 700673 (Hungary^{19A}-6) ve *mef(A)/(E)* direnç geni pozitif olan ATCC 51916 (Tennessee^{23F}-4) standart suşları kullanıldı.

3.5.3. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Tampon Sıvıları

3.5.3.1. Elektroforez tamponu (10X TBE – Jel ve tanklar için tampon)

Tris base.....108 g

Borik asit.....55 g

EDTA 0,5 M, pH 8.0.....40 ml

1 litreye DEPC (diethyl pyrocarbonate) ile tamamlandı.

3.5.3.2. Etidyum bromür (EB)

10 mg/ml olarak hazırlandı. Distile suda manyetik karıştırıcı ile uzun sürede çözünmesi sağlandı. +4 °C'de ışıktan uzak muhafaza edildi.

3.5.3.3. Yükleme tamponu (Loading Buffer)

Bromfenol mavisi.....%0,25

Gliserol.....%30

Hazırlanan tampon +4 °C’de saklandı.

3.5.4. Jelin hazırlanması ve PZR ürünlerinin görüntülenmesi

Elektroforez tamponu 10 kat sulandırıldı ve içerisine %1,5 oranında agaroz karıştırılıp tampon eritildi. 40-50°C’ye soğuduktan sonra içine 1 µl etidium bromür ilave edildi. Jelin yüksekliği 6,5 mm olacak şekilde gerekli hacimler ayarlandı. Taraklar yerleştirildikten sonra jel döküldü. Jel donduktan sonra taraklar çıkartılıp tampon ilave edildi ve örnekler jele yüklendi.

Çoğaltılan PZR ürünleri yatay agaroz jel elektroforezi ile incelendi. Ürünler moleküler ağırlık belirteci (DNA 100bp ladder, Promega, A.B.D) ve *erm(B)* direnç geni pozitif olan ATCC 700673 ile *mef(A)/(E)* direnç geni pozitif olan ATCC 51916 kontrol suşları ile beraber jele yüklendikten sonra 100-150 V’da 20 dakika yürütüldü (Minnie the Gel Cicle HE33, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco). Araştırılan her bir pnömokoka özgü büyüklükteki bantlar kontrollerle karşılaştırılarak UV transilluminatörde (Model Tuv 20 Owl Scientific, A.B.D) değerlendirilerek pozitif örneklerin fotoğrafları çekildi (Kodak 1D 3.5).

3.5.5. BOX-PZR

Çalışmamızda suşlar arasındaki klonal ilişkiyi araştırmak için BOX-PZR yöntemi kullanıldı.

BOX-PZR aşaması:

Şekil 3.2 BOX-PZR için gerekli reaktif karışımı

PZR Karışımı	Miktar	Son Konsantrasyon
DNaz-RNaz içermeyen deiyonize su	12,6 µl	-
10X PZR buffer*	2,5 µl	1X
MgCl ₂ * (25 mM)	2,5 µl	1,5 mM
dATP**	her 1dNTP'den 10 mM	200 mM
dCTP **		200 mM
dGTP**		200 mM
dTTP**		200 mM
Primer	1,5 µl	0,25µM
Taq DNA polimeraz* (5 U/ µl)	0,150 µl	0,625 U
Toplam	20 µl	
Hedef DNA	5 µl	
TOPLAM REAKSİYON HACMİ	25 µl	

* MBI fermentas (Litvanya), 10X Buffer, 100 mM Tris-HCl (pH 8,8), 500 mM KCl, MgCl₂ 25 mM.

** MBI fermentas (Litvanya)

3.5.5.1. BOX-PZR için kullanılan primer dizisi

Çalışmamızda McGee tarafından belirlenen primer kullanıldı (84).

BOX AR1 primeri (5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAG G-3').

Primer kullanılarak; thermal cycler'da 95°C'de 5 dakikalık başlangıç siklusu sonrası amplifikasyon için 95°C'de 60 saniye denaturasyon, 52°C'de 60 saniye bağlanma ve 72°C'de 2 dakikalık uzama olmak üzere 30 siklus sonunda 72 °C'de 5 dakika ekstansiyon yaptırıldı.

3.5.6. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler ve Tampon Sıvıları

3.5.6.1. Elektroforez tamponu (10X TBE – Jel ve tanklar için tampon)

Tris base.....108 g

Borik asit.....55 g

EDTA 0,5 M, pH 8.0.....40 ml

1 litreye DEPC (diethyl pyrocarbonate) ile tamamlandı.

3.5.6.2. Etidyum bromür (EB)

10 mg/ml olarak hazırlandı. Distile suda manyetik karıştırıcı ile uzun sürede çözünmesi sağlandı. +4 °C'de ışıktan uzak muhafaza edildi.

3.5.6.3. Yükleme tamponu (Loading Buffer)

Bromfenol mavisi.....%0,25

Gliserol.....%30

Hazırlanan tampon +4 °C'de saklandı.

3.5.7. Jelin hazırlanması ve BOX-PZR ürünlerinin görüntülenmesi

Elektroforez tamponu 10 kat sulandırıldı ve içerisine %1,5 oranında agaroz karıştırılıp tampon eritildi. 40-50°C'ye soğuduktan sonra içine 1 µl etidium bromür ilave edildi. Jelin yüksekliği 6,5 mm olacak şekilde gerekli hacimler ayarlandı. Taraklar yerleştirildikten sonra jel döküldü. Jel donduktan sonra taraklar çıkartılıp tampon ilave edildi ve örnekler jele yüklendi.

Çoğaltılan BOX-PZR ürünleri yatay agaroz jel elektroforezi ile incelendi. Ürünler moleküler ağırlık belirteci (DNA 1000bp ladder, Promega, A.B.D) ile beraber

jele yüklendikten sonra 100-150 V'da 20 dakika yürütüldü (Minnie the Gel Cicle HE33, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco). Araştırılan bantlar UV transilluminatörde (Model Tuv 20 Owl Scientific, A.B.D) değerlendirilerek klonal ilişkiyi incelemek üzere fotoğrafları çekildi (Kodak 1D 3.5).

3.5.8. Klonal Yakınlığın Hesaplanması ve Dendogramın Çizilmesi

İncelenen kökenler arasındaki klonal benzerliği ortaya koymak için bant paternleri 1 (var)/0 (yok) formatına çevrildi ve Bioedit (85) program paketi altındaki Clustal-Wallis program paketi kullanılarak hizalandı ve fasta formatında kaydedildi.

Fasta formatındaki hizalama dosyası, Treecon (86) paketi altında yer alan Forcon (87) programı kullanılarak ardışık phylip formatına çevrildikten sonra, Treecon programı kullanılarak UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages) yöntemi ile dendogram çizildi.

4. BULGULAR

Ocak 2008–Eylül 2009 tarihleri arasında Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarları'mıza gelen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 80 *S. pneumoniae* suşu çalışmaya alınmıştır. Suşların izole edildikleri hasta bilgileri, örneklerin türü ve geldikleri bölümler Tablo 4-1'de görülmektedir.

Tablo 4-1:Suşlara ait hasta bilgileri

ÖRNEK NO	ÖRNEK	KLİNİK	DOĞUM T./CİNSİYET
1.	HEMOKÜLTÜR	ÇOCUK HASTALIKLARI	2008/E
2.	BALGAM	GÖĞÜS HASTALIKLARI.	1961/K
3.	ETA	KARDİYOLOJİ	2008/K
4.	HEMOKÜLTÜR	KARDİYOLOJİ	1927/E
5.	BALGAM	KARDİYOLOJİ	1932/E
6.	BALGAM	POLİKLİNİK	1973/E
7.	BALGAM	GÖĞÜS HASTALIKLARI	1940/E
8.	BALGAM	ACİL DAHİLİYE	1981/K
9.	BALGAM	ACİL DAHİLİYE	1938/E
10.	BALGAM	POLİKLİNİK	1952/K
11.	BALGAM	İÇ HASTALIKLARI	1953/E
12.	ETA	GÖĞÜS HASTALIKLARI	1929/E
13.	BURUN	POLİKLİNİK	1998/K
14.	BAL	POLİKLİNİK	1971/K
15.	BALGAM	İÇ HASTALIKLARI	1955/E
16.	BALGAM	POLİKLİNİK	1951/E
17.	BALGAM	ÇOCUK HASTALIKLARI	1991/K
18.	BURUN	KBB	1985/E
19.	HEMOKÜLTÜR	KARDİYOLOJİ	1960/K
20.	BURUN	POLİKLİNİK	2004/E
21.	BURUN	POLİKLİNİK	2002/E
22.	BALGAM	GÖĞÜS HASTALIKLARI	1936/E
23.	BALGAM	KBB	1954/E
24.	BALGAM	R. ONKOLOJİSİ	1973/E
25.	HEMOKÜLTÜR	GÖĞÜS HASTALIKLARI	1930/K
26.	BALGAM	GÖĞÜS HASTALIKLARI	1933/E
27.	BALGAM	İÇ HASTALIKLARI	1934/E
28.	BALGAM	POLİKLİNİK	1987/E
29.	BALGAM	ACİL DAHİLİYE	1934/E
30.	BALGAM	GENEL CERRAHİ	1960/E
31.	BAL	GÖĞÜS HASTALIKLARI	1927/E
32.	BALGAM	POLİKLİNİK	1947/K
33.	BURUN	POLİKLİNİK	1982/K
34.	BALGAM	ÇOCUK HASTALIKLARI	1995/E

ÖRNEK NO	ÖRNEK	KLİNİK	DOĞUM T./CİNSİYET
35.	BAL	GÖĞÜS HASTALIKLARI	1946/E
36.	BALGAM	ÇOCUK HASTALIKLARI	2000/E
37.	BALGAM	GÖĞÜS HASTALIKLARI	1978/K
38.	BALGAM	İÇ HASTALIKLARI	1955/E
39.	BALGAM	POLİKLİNİK	1927/E
40.	BALGAM	POLİKLİNİK	1944/E
41.	BAL	GÖĞÜS HASTALIKLARI	1954/E
42.	BALGAM	GÖĞÜS HASTALIKLARI	1928/K
43.	BALGAM	POLİKLİNİK	1946/E
44.	BALGAM	DERMOTOLOJİ	1947/E
45.	BAL	POLİKLİNİK	1949/E
46.	BALGAM	POLİKLİNİK	1976/K
47.	BALGAM	ACIL DAHİLİYE	1968/K
48.	BALGAM	FİZİK TEDAVİ	1941/E
49.	BURUN	POLİKLİNİK	2001/K
50.	BAL	GÖĞÜS HASTALIKLARI	1960/E
51.	BALGAM	POLİKLİNİK	1963/K
52.	BAL	POLİKLİNİK	1957/E
53.	BALGAM	POLİKLİNİK	1927/K
54.	BALGAM	POLİKLİNİK	1985/E
55.	BALGAM	POLİKLİNİK	1950/E
56.	BALGAM	POLİKLİNİK	1949/E
57.	BALGAM	POLİKLİNİK	1983/E
58.	BALGAM	GASTROLOJİ	1968/E
59.	BALGAM	GÖĞÜS HASTALIKLARI	1945/E
60.	BALGAM	POLİKLİNİK	1945/E
61.	HEMOKÜLTÜR	R. ONKOLOJİSİ	1974/E
62.	BALGAM	GÖĞÜS HASTALIKLARI	1946/E
63.	BALGAM	POLİKLİNİK	1978/K
64.	ETA	ANESTEZİ	1927/E
65.	BALGAM	GÖĞÜS HASTALIKLARI	1940/E
66.	ETA	R. ONKOLOJİSİ	1974/E
67.	BURUN	KBB	2004/E
68.	BAL	GÖĞÜS HASTALIKLARI	1937/E
69.	BAL	GÖĞÜS HASTALIKLARI	1939/E
70.	BALGAM	GÖĞÜS HASTALIKLARI	1946/E
71.	BALGAM	POLİKLİNİK	1956/E
72.	BALGAM	GENEL DAHİLİYE	1946/E
73.	BAL	R. ONKOLOJİSİ	1936/E
74.	BAL	POLİKLİNİK	1940/E
75.	BAL	GÖĞÜS HASTALIKLARI	1950/E
76.	ASSİT SIVISI	ACIL DAHİLİYE	1943/K
77.	HEMOKÜLTÜR	ÇOCUK HASTALIKLARI	2007/E
78.	HEMOKÜLTÜR	ÇOCUK CERRAHİSİ	2009/E
79.	HEMOKÜLTÜR	ACIL DAHİLİYE	1958/E
80.	BALGAM	POLİKLİNİK	1960/E

(E: erkek, K:kadın; BAL: bronkoalveolar lavaj sıvısı, ETA:endotrakeal aspirat, R. Onkolojisi: radyasyon onkolojisi)

Örneklerin %25'i kadın, %75'i erkek hastalardan, %12,5'i çocuk, %87,5'i ise erişkin hastalardan izole edilmiştir. Örneklerin %65'i yatan hastalardan kalan %35'i ise ayaktan tedavi edilen poliklinik hastalarından gelmiştir.

4.1. Disk Difüzyon Testi Sonuçları

S. pneumoniae suşlarının disk difüzyon testi sonuçları Tablo 4-2'de özetlenmiştir.

Tablo 4-2: *S. pneumoniae* suşlarının disk difüzyon yöntemi ile belirlenen antibiyotik duyarlılıkları.

Duyarlılık oranı (n) Antibiyotik	S (n)	I (n)	R (n)
ERİTROMİSİN	%77,5 (62)	0	%22,5 (18)
AZİTROMİSİN	%72,5 (58)	%5 (4)	%22,5 (18)
KLARİTROMİSİN	%77,5 (62)	0	%22,5 (18)
KLİNDAMİSİN	%80 (64)	0	%20 (16)
KİNUPRİSTİN- DALFOPRİSTİN	%95 (76)	%5 (4)	%0
TETRASİKLİN	%81,25 (65)	%0	%18,75 (15)
LEVOFLOKSASİN	%98,75 (79)	%0	%1,25 (1)
TRİMETOPRİM- SULFAMETOKSAZOL	%32,5 (26)	%5 (4)	%62,5 (50)

(S:duyarlı, I:orta duyarlı, R:dirençli, n:suş sayısı)

Çalışmamızda 58 suş (%72,5) penisiline duyarlı, 16 suş (%20) penisiline orta düzeyde dirençli ve 6 suş (%7,5) penisiline yüksek düzey dirençli bulundu.

4.2. Fenotip Sonuçları

Yaptığımız çalışmada 16 (%88,8) suшта cMLSB fenotipi, 1 suшта (%5,6) iMLSB+ M fenotipi ve 1 suшта (%5,6) M fenotipi saptanmıştır.

4.3. Çoğul Direnç Durumu

Makrolidlere dirençli bulunan 18 (%22,5) pnömokok suşunun 15'i (%83,3) trimetoprim-sulfametoksazole, 16'sı (%88,8) penisiline ve 11'i (%61,1) tetrasikline de dirençli bulundu.

4.4. E- test Sonuçları ve Fenotip-Genotip Dağılımları

Tablo 4-3: Dirençli *S. pneumoniae* suşlarında E-test MİK değerleri ve fenotip-genotip dağılımları.

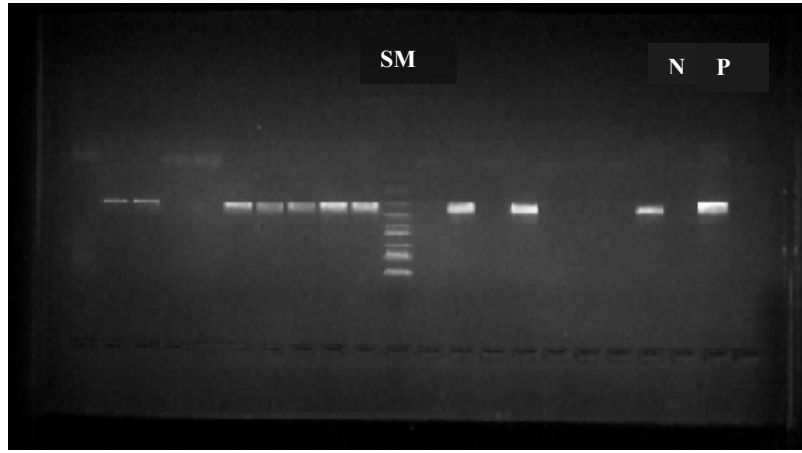
Dirençli Suş No	Eritromisin MİK değeri (µg/ml)	Klaritromisin MİK değeri (µg/ml)	Azitromisin MİK değeri (µg/ml)	Klindamisin MİK değeri (µg/ml)	Kinupristin-dalfopristin MİK değeri (µg/ml)	Fenotip	Genotip
1.	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	0,5 (S)	cMLS _B	<i>erm</i> (B)
2.	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	2 (I)	cMLS _B	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (A)/(E)
3.	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	0,50 (S)	cMLS _B	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (A)/(E)
4.	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	0,75 (S)	cMLS _B	<i>erm</i> (B)
5.	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	1 (S)	cMLS _B	<i>erm</i> (B)
6.	4 (R)	6 (R)	24 (R)	0,125 (S)	0,38 (S)	iMLS _B +M	<i>mef</i> (A)/(E)
7.	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	1,5 (S)	cMLS _B	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (A)/(E)
8.	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	2 (I)	cMLS _B	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (A)/(E)
9.	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	0,75 (S)	cMLS _B	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (A)/(E)
10.	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	1,5 (S)	cMLS _B	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (A)/(E)
11.	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	2 (I)	cMLS _B	<i>erm</i> (B)
12.	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	2 (I)	cMLS _B	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (A)/(E)
13.	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	1 (S)	cMLS _B	<i>erm</i> (B)
14.	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	1,5 (S)	cMLS _B	<i>erm</i> (B)+ <i>mef</i> (A)/(E)
15.	16 (R)	6 (R)	>256 (R)	>256 (R)	0,50 (S)	cMLS _B	<i>erm</i> (B)
16.	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	0,75 (S)	cMLS _B	<i>erm</i> (B)
17.	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	>256 (R)	0,75 (S)	cMLS _B	<i>erm</i> (B)
18.	24 (R)	24 (R)	>256 (R)	0,094 (S)	0,38 (S)	M	<i>mef</i> (A)/(E)

(cMLS_B: konstitütif (yapısal) MLS_B fenotipi, iMLS_B: indüklebilir MLS_B fenotipi, *erm*(B): eritromisin ribozom metilasyon geni, *mef*(A)/(E): makrolid efluks geni, S:duyarlı, R:dirençli, I:orta dirençli)

4.5. PZR Sonuçları

Çalışmada makrolidlere dirençli bulunan 18 (%22,5) suşun 8'i (%44,5) *erm(B)*, 2'si (%11) *mef(A)/(E)* ve 8'i (%44,5) her iki geni birden taşıdığı saptandı. Makrolid dirençli suşlar jel elektroforezinde pozitif ve negatif kontroller ile eşzamanlı yürütüldü. Jel UV transilluminatöründeki fotoğrafı Şekil 4.1 ve 4.2'de gösterilmiştir.

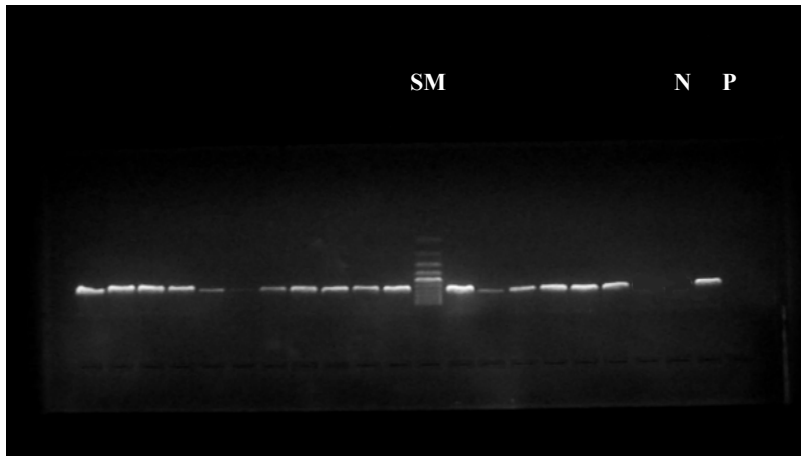
Şekil 4.1 *mef(A)/(E)* pozitif suşların jel elektroforez sonucu



(SM: Size marker, P: Pozitif kontrol, N: Negatif kontrol, DNAladder:100 kb)

* *mef(A)/(E)* için tek aşamalı PCR sonrası: 348 bp'de bantlar izlendi.

Şekil 4.2 *erm(B)* pozitif suşların jel elektroforez sonucu

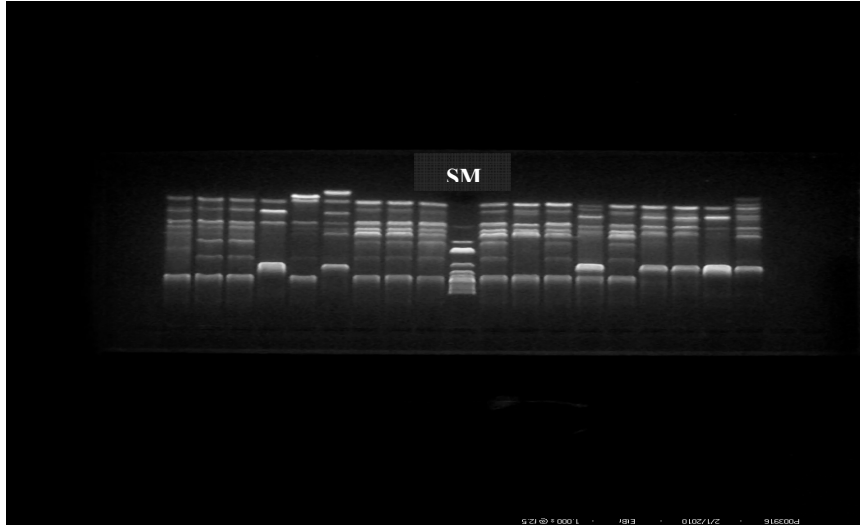


(SM: Size marker, P: Pozitif kontrol, N: Negatif kontrol, DNA ladder:100 kb)

* *erm(B)* için tek aşamalı PCR sonrası: 639 bp'de bantlar izlendi.

4.6. BOX-PZR Sonuçları

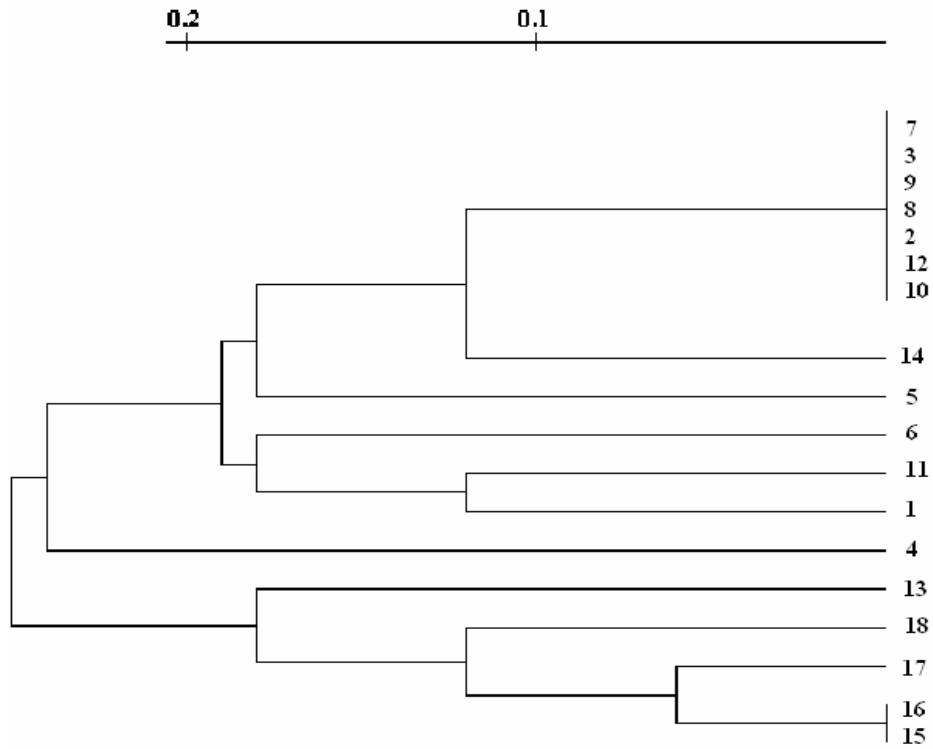
Şekil 4.3 Makrolidlere dirençli suşların BOX-PZR jel elektroforez sonucu



(SM: Size marker, DNA ladder:1000 kb)

Makrolidlere dirençli 18 pnömokok suşunun birbirine olan yakınlığı Şekil 4.4'deki dendogramda gösterilmiştir.

Şekil 4.4 Makrolid dirençli 18 suşun klonal yakınlık dendogramı



Çalışmaya dahil edilen 18 suş; 11 küme oluşturdu. *erm(B)* ve *mef(A)/(E)* ikisi birden pozitif olan kökenlerin tümü tek bir kümede gruplanırken (klon), tek başına *mef(A)/(E)* ya da *erm(B)* pozitif olan suşlar farklı kümeler altında gruplandı.

5. TARTIŞMA

S. pneumoniae insanlarda önemli mortalite ve morbidite oluşturan patojenlerden biridir. Özellikle bakteriyemi, pnömoni, menenjit ve orta kulak iltihabı başta olmak üzere çocuklar ve erişkinlerde birçok hastalığa neden olmaktadır. Günümüzde ise gelişmekte olan ülkelerde akut solunum yolu hastalıklarının en önemli etkenidir (7).

Kültürlerde suşların zor elde edilmesi ve duyarlılıkla ilgili sonuçların geç öğrenilmesinden dolayı pnömokok infeksiyonlarının çoğunda tedavi ampiriktir. Pnömomokok suşlarına karşı direnç olmadığı dönemlerde ampirik antibiyotik seçimi doğru bir yaklaşım sayılmış ve bu durum herhangi bir sorun teşkil etmemiştir. Günümüzde giderek artan penisilin direnci ve ona paralel olarak makrolidlerdeki direnç durumu tedavi ilkelerinin tekrar gözden geçirilmesini gerektirmiştir.

Çalışmamızda hastanemizde bir yıl içinde izole ettiğimiz *S. pneumoniae* suşlarının makrolid direncini ve dirençli suşların fenotip ve genotiplerini belirlemeyi amaçladık. Ayrıca suşların penisilin, kinupristin-dalfopristin, levofloksasin, tetrasiklin ve trimetoprim-sulfametoksazol'e olan direnç durumunu da araştırdık.

Günümüzde makrolid direncinin en fazla görüldüğü ülkeler Asya ülkeleridir. 1996-1997 Alexander projesinde Hong Kong'daki makrolid direnci %68,2 olarak bildirilmiştir (88). 2001 yılı Alexander Projesi verilerine göre ise Japonya'da eritromisin direnci %71,5, Hong Kong'da %74'tür (89).

2003-2004 yıllarını kapsayan PROTEKT çalışmasında eritromisin direnci Hong Kong'da %80,1, Japonya'da %81,9 olarak bulunmuştur (90). 2002-2006 yılları arasında Kore'de yapılan bir çalışmada ise eritromisine direnç oranı %80 olarak bulunmuştur (91).

Güney Afrika'da da makrolid direnci yüksek oranlarda bildirilmektedir. PROTEKT 5 çalışmasına göre pnömokoklardaki eritromisin direnci %58,7'e ulaşmıştır (90).

ABD'de 1988 yılında makrolid direnci %0 - % 0,2 iken, 2002 yılında yapılan PROTEKT çalışmasında Kuzey Amerika'da makrolid direnci %23,3, Güney Amerika'da %15,3 olarak bildirilmiştir (92). PROTEKT US'in 2000-2004 yıllarını

kapsayan çalışmasında 39.495 pnömokok suşu incelenmiş ve eritromisin direnci %29,3 olarak bulunmuştur (93).

Amerika'da yapılan PROTEKT US 6 (2005–2006) çalışmasında 6.747 *S. pneumoniae* suşunun %35,3'i makrolidlere dirençli bulunmuştur (94).

Avrupa'da makrolid direnci 1992 yılında %9,9 olarak belirlenmiş, 1996-1997 Alexander projesinde makrolid direnci Fransa'da % 43,2, Belçika'da %26,6, İspanya'da %25,7, Macaristan'da %13,4, Almanya'da %4,6 olarak bildirilmiştir. 2000 yılına kadar Hollanda, Avusturya, Norveç, Almanya ve Finlandiya'da %10'un altında saptanan eritromisin direnci 2005'de biraz artmış, Hollanda'da %11, Avusturya'da %15, Norveç'te %16, Danimarka'da %17 ve Finlandiya'da %20 olduğu bildirilmiştir (88, 95).

Almanya'da 2002-2003 yıllarını kapsayan bir çalışmada 16 yaşından küçük çocuklardan izole edilen 241 pnömokok suşu incelenmiştir. Yapılan çalışmada makrolid direnci %19,9 olarak bulunmuştur (96).

1999-2004 yılları arasında yapılan, 65 yaş ve üstü hasta örneklerinin dahil edildiği çok merkezli bir çalışmada Batı Avrupa ülkelerinden 358, Doğu Avrupa ülkelerinden 3019 pnömokok suşu incelenmiş ve eritromisin direnci sırasıyla %19,3 ve %27,7 olarak tespit edilmiştir (97).

PROTEKT 2003-2004 çalışmasında Avrupa ülkelerindeki eritromisin direnci özellikle Fransa, Macaristan, İtalya, İspanya ve Yunanistan'da yüksek oranlarda bildirilmiştir. Direnç oranları sırasıyla %53,1, %43,6, %45,6, %33,5 ve %49,4'tir. Aynı çalışmada Türkiye'deki eritromin direnci %14,5 olarak saptanmıştır (90).

Balkan ülkelerinden Bulgaristan'da 2006-2008 yılları arasında izole edilen pnömokok suşlarıyla ilgili yapılan bir çalışmada ise 413 pnömokok suşunun 150'si (%36,3) eritromisine dirençli bulunmuştur (98).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda makrolid direnç oranları farklılıklar göstermektedir. 1996-1999 yılları arasında solunum yolu örneklerinden izole edilen 735 pnömokok suşunda eritromisine direnç oranı %9,1 olarak bulunmuştur (99).

Şener ve Köseoğlu'nun 1996-2002 yılları arasında yaptığı bir çalışmada 326 pnömokok incelenmiş, eritromisin direnci %13,8 olarak bildirmiştir (100).

Kayseri’de 1998-2003 döneminde yapılan bir çalışmada 525 pnömokok suşu incelenmiş ve 17 (%3,2) suş makrolidlere dirençli bulunmuştur (101).

Mamal-Torun ve arkadaşları, İstanbul’da 1994-2000 tarihleri arasında izole edilen pnömokok suşlarında eritromisin direncini %20 olarak bulmuşlardır (102).

Gülay ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 1998-2002 tarihleri arasında Ankara, İstanbul, İzmir, Kayseri illerinden izole edilen toplam 151 pnömokok suşu arasında 40 (%26,4) suşun eritromisine dirençli olduğu saptanmıştır (103).

Azap ve arkadaşlarının 2002-2003 tarihleri arasında Ankara’da yaptığı bir çalışmada 77 pnömokok suşunda eritromisin direnci %14,3 olarak bulunmuştur (104).

Yaman ve arkadaşları 2004 yılında Adana’da yaptıkları bir çalışmada eritromisin direncini %28 olarak bulmuşlardır (105).

Çalışmamızda 80 pnömokok suşunun 18’inde (%22,5) makrolid direnci saptanmıştır. Bu oran, bir çok Avrupa ülkesi ve yurdumuzda yapılan çalışmalardaki verilerle paralellik göstermektedir.

Pnömokoklarda makrolid direnç genotip ve fenotip dağılımları ve yoğunlukları coğrafik bölgelere göre farklılıklar gösterir. Amerika’da *mef(A)* geni ve M fenotipi daha sık izole edilirken, Avrupa ülkelerinin çoğunda ve Asya’da *erm(B)* genotipi ve MLS_B fenotipi ağırlıklı olarak saptanmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda her iki geni birden taşıyan pnömokok sayısının giderek arttığı gözlenmektedir.

Güney Kore’de 2007 yılında yapılan bir çalışmada *erm(B)* genotipi %43,4, *mef(A)* genotipi %17,1, *erm(B)* ve *mef(A)* genotiplerini birlikte taşıyan suş oranı ise %39,5 olarak saptanmıştır (106).

Amerika’da PROTEKT US 6 (2005–2006) çalışmasında makrolidlere dirençli bulunan 6.747 (%35,3) suşun %18,8’inde *erm(B)* genotipi, %53,8’de *mef(A)* genotipi saptanmıştır. Çalışmanın önemli bir bulgusu, hem *erm(B)* hem *mef(A)* genleri taşıyan suşların oranındaki artışıdır. 2004-2005 yılları arasındaki PROTEKT US 5’de %19,8 olan *erm(B)+mef(A)* oranı 2005-2006 dönemindeki çalışmasında % 24,1’e yükselmiştir. Özellikle bu iki geni birlikte taşıyan suşlarda çoğul antibiyotik direnci gözlenmektedir. Makrolidlere dirençli bulunan suşların %90’ından fazlası aynı zamanda penisiline, tetrasikline ve trimetoprim-sulfametoksazole de dirençli bulunmuştur (92, 107).

Rusya’da 2003-2005 yapılan ve 76 makrolid dirençli pnömokok suşu izole edilen bir çalışmada, suşların 38’inde (%50) *erm(B)* geni saptanmıştır. *erm(B)* geni taşıyan 38 suşun 29’u iMLS_B, 9’u ise cMLS_B, fenotipi olarak belirlenmiştir. *mef(E)* geni taşıyan 15 (%19,7) suş izole edilmiş ve bu suşların tümünün M fenotipine sahip olduğu belirlenmiştir. *erm(B)* ve *mef(E)* genlerinin ikisini birden taşıyan suş sayısı ise 23’tür (%30,3). Fenotip olarak 23 suşun 21’i cMLS_B, 2’si iMLS_B olarak bulunmuştur (108).

Yunanistan’da 1985-2004 yılları arasında dirençli toplam 207 (% 33,8) pnömokok suşunun %70,1’i *mef(E)*, %19,8’i *erm(B)* ve %4,8 *mef(E)+erm(B)* geni taşımaktadır. Suşların %75,4’ü M fenotipi, %24,6’sı MLS_B fenotipidir (109).

İspanya’da 2000-2007 yılları arasında yapılan bir çalışmada kan kültürlerinden izole edilen 78 eritromisin dirençli pnömokokta *erm(B)* geni %74,3, *mef(A)* geni %7,7 olarak bulunmuştur. Her iki geni birden taşıyanların oranı ise %17,9’dur. *erm(B)* geni taşıyan suşlarının %79,4’ü iMLS_B, %20,6’sı cMLS_B’dir. *Mef(A)* genine sahip olanların hepsi M fenotipine sahiptir. Her iki geni birden taşıyanların %85,7’si iMLS_B, % 14,3’ü cMLS_B fenotipine sahiptir (110).

Ülkemizde yapılan çalışmalara bakıldığında, Şener ve arkadaşları 669 pnömokokun 91’ini (%13,6) makrolidlere dirençli bulmuşlardır. Dirençli suşların %83,5’i *erm(B)*, %16,5’i *mef(A)* geni taşımaktadır. *erm (B)* geni taşıyanların %62,6’sı cMLS_B, %20,9’u ise iMLS_B fenotipine aittir. *mef(A)* genini taşıyan suşların hepsi M fenotipindedir ve %16,5 oranında saptanmıştır (111).

Eşel ve arkadaşlarının 1998-2003 yıllarını kapsayan çalışmalarında, makrolidlere dirençli bulunan 17 (%3,2) suştan %58,8’inin *erm(B)*, %35,3’ünün *mef(A)* genini taşıdığı, bir suşun ise 23S RNA’da A2059G mutasyonunu gösterdiği bildirilmiştir (101).

1998-2002 yılları arasında Gülay ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 151 pnömokok suşu incelenmiş, 40 (%26,4) suşta makrolid direnci saptanmıştır. Bu suşların 38’i (%95) *erm(B)*, 1’i (%2,5) *mef(A)* ve 1 (%2,5) tanesi her iki geni birden taşımaktadır. *erm(B)* geni taşıyanların 37’si (%97,3) cMLS_B, 1 (%2,6) tanesi iMLS_B fenotipine aittir. Her iki geni taşıyan suş iMLS_B+ M fenotipini taşımaktadır (112).

Pınar ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada penisiline dirençli 76 pnömokok incelemişlerdir. Bu suşların 18'i (% 23,6) makrolidlere dirençli bulunmuştur. Bu suşların 11'i (%61,1) cMLS_B fenotipi, 5'i (%27,5) iMLS_B fenotipi ve 2'si (%11,4) M fenotipine sahiptir (113).

Yaptığımız çalışmada makrolidlere dirençli bulunan 18 (%22,5) suşun 8'i (%44,5) *erm*(B), 2'si (%11) *mef*(A)/(E) ve 8'i (%44,5) her iki geni birden taşımaktadır. Ülkemizde yapılan önceki çalışmalara bakıldığında, bizim çalışmamızdaki makrolid direnci önceki çalışmalarla paralellik gösterirken, *erm*(B)+*mef*(A)/(E) genlerinin birlikte görüldüğü suş oranında önemli bir artış saptanmıştır. Bu suşların hepsinde yüksek düzey makrolid direnci (MİK > 256 µg/ml) tespit edilmiştir.

Çalışmamızda 16 (%88,8) suшта cMLS_B fenotipi, 1 suшта (%5,6) iMLS_B+ M fenotipi ve 1 suшта (%5,6) M fenotipi saptanmıştır. Bu sonuçlar Avrupa'daki ve ülkemizdeki fenotip oranları ile benzerlik göstermektedir.

İzole ettiğimiz 80 pnömokok suşunun 58'i (%72,5) penisiline duyarlı, 16'sı (%20) penisiline orta düzeyde dirençli ve 6 suş (%7,5) penisiline yüksek düzey dirençli bulunmuştur. Çalışmamızdaki verilerle ülkemizdeki çeşitli çalışmaların verileri karşılaştırıldığında, bizim saptadığımız penisilin direncinin daha düşük olduğu gözlenmiştir. Gönüllü ve Berkiten'in 1998 yılında yaptığı çalışmada orta düzey direnç %31,3, yüksek düzey direnç %10 olarak bulunmuştur (114). Gür ve arkadaşlarının 2002 yılındaki çalışmalarında ise orta düzey direnç %11,5, yüksek düzey direnç %22,7 olarak saptanmıştır (115). Eyigör ve arkadaşlarının 2008 yılındaki çalışmalarında incelenen 83 pnömokokun % 35'i penisiline düşük düzeyde dirençli, % 1'i yüksek düzeyde dirençli bulunmuştur (116).

İzole ettiğimiz suşlarda kinupristin-dalfopristin'e direnç saptanmamış, 4 (%5) suş orta dirençli bulunmuştur. Ülkemizde kinupristin-dalfopristin ile ilgili yeterli veri bulunmamaktadır. Yurt dışında yapılan çalışmalarda bizim sonuçlarımıza benzer oranlar bulunmuştur. PROTEKT 1999-2000 verilerine göre Avrupa'daki kinupristin-dalfopristin duyarlılığı %98'dir (89). Reinert ve arkadaşlarının 2005'te 7 Avrupa ülkesinde topladıkları 82 eritromisin dirençli suşun %2,4'ünü kinupristin-dalfopristine orta dirençli bulmuş, dirençli suş saptanmamıştır (117).

Çalışmamızda sadece 1 suş (%1,25) levofloksasine dirençli olarak saptanmıştır. Ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda da levofloksasin direnç oranlarının düşük olduğu

bildirilmiştir. Yaman ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada levofloksasin direnci %2 olarak bulunmuştur (105). Gür ve arkadaşlarının yaptığı çok merkezli bir çalışmada ise levofloksasine dirençli suş saptanmamıştır (118).

Suşların tektrasiklin direnci %18,75 olarak saptanmıştır. Bu oran ülkemizdeki oranlarla paralellik göstermektedir. Öncü ve arkadaşlarının çalışmasında tetrasiklin direnci %24,6 olarak bulunurken, Gür ve arkadaşlarının çalışmasında %21,5 olarak saptanmıştır (118, 119).

Çalışmamızda trimetoprim-sulfametoksazol (SXT) direnci %62,5 olarak saptanmıştır. Son yıllarda ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda da SXT direncinde artış olduğu gözlenmektedir. Yaman ve arkadaşları yaptıkları çalışmada SXT direncini %55, Öncü ve arkadaşları ise %63,8 olarak bulmuşlardır (105, 119).

Yaptığımız çalışmada dikkati çeken, makrolid dirençli suşlarda yüksek oranda *erm(B)* ve *mef(A)/(E)* birlikteliği saptanmasıdır. Sonuçların güvenilirliği, suşların iki kez DNA ekstraksiyonu yapılarak ve ilgili gen bölgeleri ayrı seanslarda iki kez PZR işlemine tabi tutularak güvence altına alınmıştır. Nitekim, *erm(B)* ve *mef(A)/(E)* birlikte taşıyan suşların dendogramda aynı küme altında gruplanması, bölgemizde *erm(B)* ve *mef(A)/(E)*'yi birlikte taşıyan suşların klonal olarak yayılmış olduğunu desteklemektedir.

Sonuç olarak pnömokoklardaki makrolid direncinin artışı önemli bir sorun haline gelmiştir. Pömokoklara karşı yapılan yerel ve evrensel sürveyans çalışmaları, uygun ampirik tedavinin belirlenmesi ve doğru antibiyotik kullanımı açısından önem taşımaktadır. Bu nedenle makrolid direnç genotiplerinin takibi, pnömokokal infeksiyonların epidemiyolojisi ve bu infeksiyonlardan korunma açısından önemlidir. Çalışmamızın bu konuda yapılan epidemiyolojik çalışmalara katkısı olacağı kanısındayız.

KAYNAKLAR

1. Austrian R. The pneumococcus at the millennium: not down, not out. *J Infect Dis* 1999; 179 (Suppl 2):338–341.
2. Prevention of pneumococcal disease: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *Morb Mortal Wkly Rep* 1997; 46:1–24.
3. World Health Organization. New and under-utilized vaccines: World Health Organization, 2009 [<http://www.who.int/nuvi/pneumococcus/en/>].
4. Neu HC. The crisis in antibiotic resistance. *Science* 1992; 257:1064-1073.
5. Appelbaum PC. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: An overview. *Clin Infect Dis* 1992; 15:77–83.
6. Marrie TJ. Therapeutic implications of macrolide resistance in pneumococcal community-acquired lower respiratory tract infections. *Int J Clin Pract* 2004; 58:769–776.
7. Musher DM. *Streptococcus pneumoniae*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and practice of infectious diseases. New York: Churchill Livingstone, 1995; 1811-1826.
8. Mandell GC, Bennett JE, Dalin R. Principles and practice of infectious disease. 5. baskı. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2000; 2128-2146.
9. Watson DA, Musher MD, Jacobson JW, Verhoef J. A Brief history of the Pneumococcus in biomedical research: A panoply of scientific discovery. *Clin Infect. Dis* 1993; 17:913-924.
10. Pınar A. Enfeksiyonlardan sıklıkla izole edilen *Streptococcus pneumoniae* serotipleri için heterodupleks analizi ile serotiplendirme ve yöntemin gerçek zamanlı florometrik nükleik asit saptama sistemine uyarlanması [Doktora]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi, 2004.
11. Koneman EW, Allen SD, Janda WM et al. The Gram-positive cocci, Part II. Color atlas and testbook of diagnostic microbiology. Philadelphia, New York: 2005; 577-649.
12. Kara A. Tonsillofarenjit. *Çocuk Enf Derg* 2009; 3:(Özel Sayı 1):25-34.

13. Ustaçelebi Ş. Temel ve klinik mikrobiyoloji. 5. baskı. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999.
14. Bilgehan H. Klinik mikrobiyoloji. 2. baskı. İzmir: Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları, 1996.
15. Sümerkan B. Streptococcus pneumoniae. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, (Editörler). İnfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. 2. baskı. İstanbul: Nobel tıp kitabevleri, 2002:1493–1497.
16. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller AM. Medical microbiology. St. Luis, Missouri: Mosby Inc, 2002.
17. Werno AM, Murdoch DR. Laboratory diagnosis of invasive pneumococcal disease. *Clin Infect Dis* 2008; 46:926–32.
18. Gürler N. Çocuklarda pnömokok infeksiyonları ve korunma. *ANKEM Derg* 2008; 22 (Ek 2):237–261.
19. Akan E. Tıbbi mikrobiyoloji. 2. Baskı. İzmir: Saray Medikal Yayıncılık, 1993.
20. Abigail A, Salyers D, Whitt D. Streptococcus pneumoniae. Bacterial pathogenesis a molecular aproach. Washington: ASM Pres, 1994.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, Pennsylvania; 2005.
22. Berkiten R. Streptococcus pneumoniae: Klasik ve moleküler tanıda karşılaşılan sorunlar. *ANKEM Derg* 2006; 20 (3):180–186.
23. Chester K. Streptococcus pneumoniae. In Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG Baltimore, eds. Bergey's manual of microbiology, London, Los Angeles, Sydney: Williams and Wilkins co, 1986; 1052.
24. Winn W, Allen S, Koneman E and et al. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Gram-positive cocci Part II: Streptococci, Enterococci, and the 'Streptococcus-Like' bacteria. 6.baskı. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins co, 2006.
25. Tünger Ö. Pnömokok infeksiyonları ve korunma. *ANKEM Derg* 2006; 20 (2):125–132.
26. Livermore DM, Williams JD. Beta Lactams: Mode of action and mechanisms of bacterial resistance. In Loria'n V eds. Antibiotics in laboratory medicine, 5.

- baskı Philadelphia, London, Paris, Bangkok, Buenos Aires, Hong Kong, Munich, Sydney, Tokyo: Baltimore, Williams and Wilkins Co. 1996: 502–578.
27. Austrain R. Pneumococci. In BD Davis eds. Microbiology. Philadelphia, Pennsylvania: JB Lippincott Co, 1990:515-523.
 28. Henrichsen J. Six newly recognized types Streptococcus pneumoniae. *J Clin.Microbiol* 1995; 33:2759-2762.
 29. Mufson MA. Pneumococcal infection. *Curr Op Infect Dis* 1994; 7:178-183.
 30. Bogaert D, Groot de R, Hermans PWM: Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis* 2004; 4:144-154.
 31. Austrian R: Pneumococcal polysaccharide vaccines. *Rev Infect Dis* 1989; 11 (suppl 3):598-602.
 32. Salyers AA, Whitt DD. Bacterial pathogenesis a molecular approach. 1. baskı. Washington DC: ASM Press, 1994.
 33. Tuomanen E, Austrian R, Masure HR. Pathogenesis of pneumococcal infection. *N Engl J Med* 1995; 332 (19):1280-1284.
 34. Tünger Ö. Streptococcus pneumoniae infeksiyonlarının patogenezi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2000; 30:49-55.
 35. Watson DA, Musher DM, Verhoef J. Pneumococcal virulence factors and host immune responses to them. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14 (6):479-490.
 36. Andersson B, Dahmen J, Frejd T, Lefler H, Magnusson G, Noori G, Eden CS. Identification of an active disaccharide unit of a glycoconjugate receptor for pneumococci attaching to human pharyngeal epithelial cells. *J. Exp. Med* 1983; 158:559–570.
 37. Paton JC, Andrew PW, Boulnois GJ, Mitchell TJ. Molecular analysis of the pathogenicity of Streptococcus pneumoniae: the role of pneumococcal proteins. *Ann Rev Microbiol* 1993; 47:89–115.
 38. Boulnois GJ. Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by Streptococcus pneumoniae. *J Gen Microbiol* 1992; 138:249–259.
 39. Jedrzejak MJ. Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiol Mol Biol Rev* 2001; 65 (2):187-207.

40. Tang RS, Mac Phail M, Schickli JH et al. Parainfluenza virus type 3 expressing the native or soluble fusion (F) Protein of Respiratory Syncytial Virus (RSV) confers protection from RSV infection in African green monkeys. *J Virol* 2004; 78:11198–11207.
41. McDaniel L, Scott SG, Kearney JF, Briles DE. Monoclonal antibodies against protease-sensitive pneumococcal antigens can protect mice from fatal infection with *Streptococcus pneumoniae*. *J Exp Med* 1984; 160:386–397.
42. Crain MJ, Waltman WD, Turner JS et al. Pneumococcal surface protein A (PspA) is serologically highly variable and is expressed by all clinically important capsular serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* 1990; 58:3293–3299.
43. Öztürk D. Klinik örneklerden izole edilen *Streptococcus pneumoniae* serotiplerinin heterodupleks yöntemiyle serotiplendirilmesi [Yüksek Lisans]. Ankara: Hacettepe Üniversitesi, 2008.
44. Jedrzejak MJ, Hollingshead SK, Lebowit J, Chantalat L, Briles DE, Lamani E. Production and characterization of the functional fragment of pneumococcal surface protein A. *Arch Biochem Biophys* 2000; 37 (1):116-125.
45. Henrichsen, J. Typing of *Streptococcus pneumoniae*: past, present, and future. *Am J Med* 1999; 107(1A):50-54.
46. Rogers HJ, Perkins HR, Ward JB. Formation of cell wall polymers. In Nombela C, eds. *Microbial cell wall and membranes*. London, United Kingdom: Chapman and Hall Ltd, 1980:437–460
47. Berry AM, Paton JC, Hansman D. Effect of insertional inactivation of the genes encoding pneumolysin and autolysin on the virulence of *Streptococcus pneumoniae* type 3. *Microb Pathog* 1992; 12:87–93.
48. Canvin JR, Marvin AP, Sivakumaran M et al. The role of pneumolysin and autolysin in the pathology of pneumonia and septicemia in mice infected with a type 2 pneumococcus. *J Infect Dis* 1995; 172:119–123.
49. Berry AM, Lock RA, Thomas SM, Rajan DP, Hansman D, Paton JC. Cloning and nucleotide sequence of the *Streptococcus pneumoniae* hyaluronidase gene and purification of the enzyme from recombinant *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1994; 62:1101–1108.

50. O' Toole RD, Goode L, Hawe C. Neuraminidase activity in bacterial meningitis *J Clin Invest* 1971; 50:979–985.
51. Rantala M. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae* in Finland with special reference to macrolides and telithromycin. Publications of the National Institute for Health and Welfare, Research 2009.
52. Pons J, Mandement MN, Martin E, Eemort C, Nouvellon M, Mallet E, Eemeland JF. Clonal and temporal patterns nasopharyngeal penicillin susceptible and penicillin resistant *Streptococcus pneumoniae* strains in children attending a day care center. *J Clin Microbiol* 1996; 3218-3222.
53. Öncül O, Cavuşlu Ş, Yenen O. S. *Streptococcus pneumoniae*, Flora 1999; 4 (2):3-23.
54. Tuomanen E, Mitchell T, Morrison D, Spratt B, Butler J. The Pneumococcus. 1. baskı Washington DC: ASM press 2004.
55. World Health Organization. Pneumococcal conjugated vaccine for childhood immunization-WHO position paper. *Wkly Epidemiol Rec* 2007; 82 (12):93–104.
56. Fogarty CM, Kohno S, Buchanan P, Aubier M, Baz M. Community-acquired respiratory tract infections caused by resistant pneumococci: clinical and bacteriological efficacy of the ketolide telithromycin. *J Antimic Chemother* 2003; 51:947-955.
57. Klugman KP. Pneumococcal resistance to antibiotics. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3: 171-196
58. Ball P. Therapy for pneumococcal infection at the millennium: Doubts and certainties. *Am J Med* 1999; 107:77-85.
59. Stanck PJ, Mufson AM: A 20 year epidemiological study of pneumococcal meningitis. *Clin infects Dis* 1999; 28:1265-1272.
60. Chen F, Breiman R, Farley M, Plikaytis B, Deaver K, Cetron M. Geocoding and linking data from population-based surveillance and the US Census to evaluate the impact of median household income on the epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections. *Am J Epidemiol* 1998; 148:1212-1218.
61. Tomasz A. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* *Clin Infect Dis* 1997; 24 (Suppl 1):85-88.

62. Venetz I, Schopfer K, Muhleman K, Swiss Pneumococcal Study Group. Pediatric invasive pneumococcal disease in Switzerland, 1985-1984 *Int J Epidemiol*. 1998; 27:1101-1104.
63. Somer A. Çocukluk çağı pnömokok infeksiyonlarında klinik ve tedavi, *ANKEM Derg* 2008; 22 (Ek 2)252-257.
64. Wald ER, Milmoie GJ, Bowen A, Ledesma-Medina J, Salamon N, Bluestone CD. Acute maxillary sinusitis in children. *N Engl J Med* 1981; 304 (13):749-754.
65. Güneş A. Çocukluk çağı pnömokok infeksiyonlarında penisilin direnci [Uzmanlık]. Diyarbakır: Dicle Üniversitesi 2008.
66. Cima-Cabal MD, Mendez FJ, Vazquez F et al. Immunodetection of pneumolysin in human urine by ELISA. *J Microbiol Methods* 2003; 54(1):47-55.
67. Hanage WP, Kaijalainen T, Herva E, Saukkoriipi A, Syrjanen R, Spratt BG. Using multilocus sequence data to define the pneumococcus. *J Bacteriol* 2005; 187 (17):6223-6230.
68. Seki M, Yamashita Y, Torigoe H, Tsuda H, Sato S, Maeno M. Loopmediated isothermal amplification method targeting the *lytA* gene for detection of *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2005; 43 (4):1581-1586.
69. Montanari MP, Mingoia M, Cochetti H, Varaldo PE. Phenotypes and genotypes of erythromycin-resistant pneumococci in Italy. *J Clin Microbiol* 2003; 41 (1):428-431.
70. Carvalho G, Tondella ML, McCaustland K et al. Evaluation and improvement of real-time PCR assays targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of pneumococcal DNA. *J Clin Microbiol* 2007; 45 (8):2460-2466.
71. Messmer TO, Sampson JS, Stinson A, Wong B, Carlone GM, Facklam RR. Comparison of four polymerase chain reaction assays for specificity in the identification of *Streptococcus pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 49 (4):249-254.
72. Harbarth S, Albrich W, Brun-Buisson C. Outpatient antibiotic use and prevalence of antibiotic-resistant pneumococci in France and Germany: a sociocultural perspective. *Emerg Infect Dis* 2002; 8 (12):1460-1467.

73. Lipsitch M. Measuring and interpreting associations between antibiotic use and penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 2001; 32 (7):1044-1054.
74. Köksal İ. Toplum kökenli dirençli infeksiyonlarda tedavi seçenekleri. *ANKEM Derg* 2006; 20 (Ek 2):286-288.
75. McGee L. The coming of age of niche vaccines? Effect of vaccines on resistance profiles in *Streptococcus pneumoniae*. *Curr Opin Microbiol* 2007; 10 (5):473-478.
76. Kyaw MH, Lynfield R, Schaffner W et al. Effect of introduction of the pneumococcal conjugate vaccine on drug-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *N Engl J Med* 2006; 354 (14):1455-1463.
77. Breiman RF, Butler JC, Tenover FC, Elliott JA, Facklam RR. Emergence of drug-resistant pneumococcal infections in the United States. *JAMA*. 1994; 271:1831–1835.
78. Öztürk R. Makrolidler, linkozamitler, streptogramin, kloramfenikol ve tetrasiklinler. Günümüzde antimikrobik tedavi. İstanbul bulaşıcı hastalıklarla savaş derneği yayın no.12 İstanbul 1998; 65–66.
79. Berkiten R. Türkiye’de *Streptococcus pneumoniae*: Antibiyotiklere direnç, eritromisin direnç fenotipleri ve serotip dağılımı. *ANKEM Derg* 2006; 20 (2):114–124.
80. Wierzbowski AK, Boyd D, Mulvey M, Hoban DJ, Zhanel GG. Expression of the *mef(E)* gene encoding the macrolide efflux pump protein increases in *Streptococcus pneumoniae* with increasing resistance to macrolides. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 4635–4640.
81. Lynch III JP, Martinez FJ. Clinical relevance of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* for community-acquired pneumoniae. *Clin Infect Dis* 2002; 34 (Suppl 1):27–46.
82. Pedrosa EG, Baquero F, Loza E, Serrano JM, Fenol A, Campo R, Canton R. High clonal diversity in erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* invasive isolates in Madrid, Spain (200–07). *J Antimicrob Chemother* 2009; 64: 1165–1169.

83. Sutcliffe J, Grebe T, Tait-Kamradt A, Wondrack L. Detection of Erythromycin-resistant determinants by PCR. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 2562–2566.
84. McGee L, McDougal L, Zhou J et al. Nomenclature of major antimicrobial-resistant clones of *Streptococcus pneumoniae* defined by the pneumococcal molecular epidemiology network. *J Clin Microbiol* 2001; 7 (39):2565-2571.
85. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 1999; 41:95–98.
86. Peer V, Wachter D. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Appl. Biosci.* 1994; 10:569-570.
87. Raes J, Peer V. ForCon: a software tool for the conversion of sequence alignments, 2001. [http://www.hgmp.mrc.ac.uk/embnet.news/vol6_1/ForCon/forcon.html].
88. Felmingham D, Grüneberg RN. The Alexander project 1996-1997: Latest susceptibility data from this international study of bacterial pathogens from community-acquired lower respiratory tract infections. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45:191-203.
89. Felmingham D, Reinert RR, Hirakata Y, Rodloff A. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among isolates of *Streptococcus pneumoniae* from the PROTEKT surveillance study, and comparative in vitro activity of the ketolide, telithromycin. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50 (Suppl 1):25-37.
90. Farrell DJ, Couturier C, Hryniewicz W. Distribution and antibacterial susceptibility of macrolide resistance notypes in *Streptococcus pneumoniae*: PROTEKT Year 5. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31: 245–249.
91. Shin JH, Jung HJ, Kim HR et al. Prevalence, characteristics, and molecular epidemiology of macrolide and fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* at Five Tertiary-Care Hospitals in Korea. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 2625–2627.
92. Jenkins SG, Farrell DJ. Activity of telithromycin against *Streptococcus pneumoniae* isolates resistant to multiple antibacterials: PROTEKT Years 1-5

- [Abstracts C2-424]. In: 46. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. San Francisco, 2006.
93. Jenkins SG, Brown SD, Farrell DJ. Trends in antibacterial resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolated in the USA: update from PROTEKT US Years 1-4. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2008; 7:1-11.
 94. Jenkins SG, Farrell DJ. Increase in Pneumococcus macrolide resistance, United States. *Emerg Infect Dis* 2009; 8 (15):1260-1264.
 95. European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) Annual report 2005. Bilthoven: The Netherlands, 2005.
 96. Reinert RR, Franken C, Linden M, Lütticken R, Cil M, Al-Lahham A. Molecular characterisation of macrolide resistance mechanisms of *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* isolated in Germany 2002–2003. *Int J Antimicrob Agents* 2004; 24:43–47.
 97. Cant' on R, Unal S, Farrell DJ. Antibacterial resistance patterns in *Streptococcus pneumoniae* isolated from elderly patients: PROTEKT years 1–5 (1999–2004). *Int J Antimicrob Agents* 2007; 30:546–550.
 98. Alexandrova A, Setchanova L, Sredkova M et al. MLS_B Genotype is predominant molecular genetic mechanism among erythromycin-resistant *Streptococcus Pneumoniae* for the period: 2006–2008. *J IMAB-Annual proceeding (Scientific Papers)* 2009; 1:36–39.
 99. Gür D. Solunum sistemi patojenleri ve Türkiye'deki direnç durumları. Arman D, Ulusoy S, editörler. Üst solunum yolu infeksiyonlarının tedavisi. Ankara: Bilimsel tıp yayınevi, 2003:9-14.
 100. Şener B, Koseoğlu O. Comparative in vitro activity of antiribosomal agents on penicillin-susceptible and-resistant *Streptococcus pneumoniae* in relation to the resistance genotypes. *Int JAntimicrob Agents* 2004; 24 (1):39–42.
 101. Eşel D, Bozdoğan B, Sümerkan B, Appelbaum PC. Makrolidlere dirençli *Streptococcus pneumoniae* izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları ve direnç mekanizmaları [Özet s.143]. In: 3.Ulusal moleküler ve tanısal mikrobiyoloji kongresi özet kitabı. Ankara, 2004.
 102. Mamal Torun M, Bahar H, Alkan E. *Streptococcus pneumoniae* kokenlerinde penisiline ve diğer antimikrobik maddelere direnc. *ANKEM Derg* 2001; 15 (1):109–13.

103. Gülay Z, Biçmen M, Gür D. Resistance mechanisms to macrolide antibiotics in erythromycin-resistant *S. pneumoniae* in Turkey [Abstract p.1544]. In:13th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Glasgow, 2003.
104. Azap A, Altunsoy A, Memikoğlu KO, Balık İ. Solunum sistemi infeksiyonlarından izole edilen pnömokok suşlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları. *A. Ü. Tıp Fakültesi Mecmuası* 2004; 57 (2):63-67.
105. Yaman A, Kibar F, Büyükelik O, Dündar IH. Klinik örneklerden izole edilen *Streptococcus pneumoniae* suşlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması. *ANKEM Derg* 2004; 18 (Ek 1): 2-6.
106. Songa HJ, Baek JY, Cheong HS, Chunga D, Pecka KR, Kob KS, Changes of serotype and genotype in *Streptococcus pneumoniae* isolates from a Korean hospital in. *Diagn Microbiol Infect* 2007; 63 (3): 271-278.
107. Farrell DJ, Jenkins SG, Brown SD, Patel M, Lavin BS, Klugman KP. Emergence and spread of *Streptococcus pneumoniae* with erm(B) and mef(A) Resistance. *Emerg Infect Dis* 2005; 11 (6):851-858.
108. Reinert RR, Filimonova OY, Al-Lahham A, Grudinina SA, Ilina EN, Weigel LM, Sidorenko SV. Mechanisms of macrolide resistance among *Streptococcus pneumoniae* isolates from Russia. *J Antimicrob Chemother* 2008; 2260–2262.
109. Daikosa GL, Koutsolioutsoub A, Tsiodrasc S et al. Evolution of macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae* clinical isolates in the prevaccine era. *Diagn Microbiol Infect* 2008; 60:393–398.
110. Pedrosa EG, Baquero F, Loza E, Serrano JM, Fenol A, Campo R, Canton R. High clonal diversity in erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* invasive isolates in Madrid, Spain (200–07). *J Antimicrob Chemother* 2009; 64:1165-1169.
111. Sener B, Köseoglu O, Gür D, Bryskier A. Mechanisms of macrolide resistance in clinical pneumococcal isolates in a university hospital, Ankara, Turkey. *J Chemother.* 2005; 17 (1):31–35.
112. Gülay Z, Özbek A, Biçmen M, Gür D. Macrolide resistance determinants in erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Turkey. *Jpn J Infect Dis* 2008; 61 (6):490-493.

113. Pinar A, Köseoğlu O, Yenişehirli G, Şener B. Molecular epidemiology of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in a university hospital, Ankara, Turkey. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10 (8):718–723.
114. Gönüllü N, Berkiten R, Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Streptococcus pneumoniae* suşlarında penisilin ve sefotaksim MİK değerleri. *Turk Mikrobiyol Cem Derg* 1999; 29: 47–50.
115. Gür D, Özalp M, Sümerkan B, Kaygusuz A, Töreci K, Köksal İ, Över U, Söyletir G. Prevalence of antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* and *Streptococcus pyogenes*: results of a multicenter study in Turkey. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 19:207–211.
116. Eyigör M, Gültekin B, Aydın N. Klinik örneklerden izole edilen *Streptococcus pneumoniae* kökenlerinin antibiyotik direnci *ANKEM Derg* 2008; 22 (1):1-6.
117. Reinert R, Ringelstein A, Linden M, Cil M, Al-Lahham A, Schmitz FJ. Molecular epidemiology of macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates in Europe. *J Clin Microbiol* 2005; 1294-1300.
118. Gür D, Mülazımoğlu L, Ünal S ve e-baskett-II çalışma Grubu. Solunum yolu infeksiyon etkenleri *Streptococcus pneumoniae* ve *Streptococcus pyogenes*'in telitromisin ve 11 antimikrobik ilaca in vitro duyarlılığı: e-basket-II sörveyans çalışmasının Türkiye sonuçları. *Mikrobiyol Bült* 2007; 41:1–9.
119. Oncu S, Erdem H, Pahsa A. Therapeutic options for pneumococcal pneumonia in Turkey. *Clinical Therapeutics* 2005; 27 (6):674-683.

ETİK KURUL KARARI



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI



Sayı : 826
Konu :

Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Başkanlığına

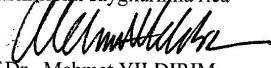
İstanbul / /
18 Mart 2009

İLGİ: 20.02.2009 tarihli, 260 sayılı yazınıza:

Bölümünüze bağlı Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr. Nevriye GÖNÜLLÜ'nün danışmanlığında Yüksek Lisans Öğr., Leyla CAFEROĞLU'nun yürüteceği "Streptococcus Pneumoniae'de Makrolid Direnç Fenotipleri ve Direnç Genlerinin Araştırılması" başlıklı yüksek lisans tezi hakkında ilgi yazınız ve ekleri 03 Mart 2009 tarihinde toplanan Fakültemiz Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup, etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi durum adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini saygılarımla rica ederim.

EKİ:
1 dosya


Prof.Dr. Mehmet YILDIRIM
Dekan Yardımcısı ve Etik
Kurul Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Leyla	Soyadı	CAFEROĞLU
Doğ.Yeri	Cuhumen	Doğ.Tar.	18.04.1985
Uyruğu	TC	TC Kim No	55783600510
Email	leylacaferoglu@hotmail.com	Tel	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Yük.Lis.	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	2010
Lisans	Trakya Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2007
Lise	Pertevniyal Anadolu Lisesi	2003

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	-	-	-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	İyi	İyi	İyi	-	58

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	70	71	68
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	Çok iyi