

52363

**ÇOCUKLARDA *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*
NAZOFARENJIAL TAŞIYICILIĞI; SEROGRUPLANDIRMA,
ANTİBİYOTİKLERE DUYARLILIĞI VE PENİSİLİN
DİRENÇLİ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* SUŞLARININ
MOLEKÜLER TİPLENDİRMESİ**

SBAG-2615

1025094

PROF. DR. BENGÜL DURMAZ

PROF. DR. RIZA DURMAZ

YRD. DOÇ. MEHMET BAYRAKTAR

YRD. DOÇ. MAHMUT TAYYAR KALCIOĞLU

MAYIS 2004

MALATYA

ÖNSÖZ

Streptococcus pneumoniae suşları başta çocuklar olmak üzere sağlıklı bireylerin üst solunum yollarında flora elemanı olarak bulunmaktadır. Taşıyıcılar *S. pneumoniae* 'ye bağlı infeksiyonların yayılmasında önemli rol oynamaktadır. Özellikle aile, okul, yetimhaneler ve kreşler gibi insanların toplu halde, uzun süre bir arada yaşadıkları yerlerde bireyler arasında yayılım göstererek ciddi infeksiyonlara neden olabilmektedirler.

Kapsül antijenine göre 90 kadar serotipi saptanan *S. pneumoniae* suşlarının oluşturduğu infeksiyonlardan çoğunlukla belirli serotipler sorumlu olmaktadır. Serotiplerin dağılımı bölgeler arasında farklılıklar göstermektedir. Etkin aşının geliştirilebilmesi için bir bölgedeki dominant serogrupların bilinmesinde büyük yarar vardır.

Moleküler altıpleme yöntemlerinin geliştirilmesiyle birçok infeksiyon hastalığının epidemiyolojisi daha iyi anlaşılır olmuştur. Altıpleme yöntemleriyle kaynak ve bulaş yolları hakkında yararlı bilgiler elde edilebilmekte, bu bilgilerin kullanılmasıyla etkin korunma ve kontrol önlemleri geliştirilebilmektedir.

S. pneumoniae suşlarının antimikrobiyal direnç durumu, prevalansı, serogrup ve genotip dağılımı, Malatya toplumunda daha önce çalışılmamıştır. TÜBİTAK destekli olarak yürütülen bu çalışmada; farklı sosyo-ekonomik şartlardaki sağlıklı ilköğretim çocuklarında, nazofarengial kolonizasyon oranının tespiti, izolatların antibiyotiklere direnç durumları, ilimizdeki çocuklar arasındaki *S. pneumoniae* serogruplarının dağılımı ve moleküler altıpleme yöntemlerini kullanarak izolatlar arasındaki epidemiyolojik ilişkiyi belirlemek amaçlanmıştır.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Özet	1
Summary	2
Giriş	3
Materyal ve Metotlar	5
Bulgular	7
Tartışma	8
Sonuçlar	10
Kaynaklar	11

Özet

Streptococcus pneumoniae genellikle sağlıklı çocukların nazofarenksinde bulunur. Taşıyıcılar, toplumdaki *S. pneumoniae* infeksiyonunun sirkülasyonunda önemli role sahiptirler. Bu çalışmanın amacı; farklı sosyo-ekonomik koşullara sahip olan sağlıklı ilköğretim çocuklarının nazofarenksinde *S. pneumoniae* taşıyıcılık oranını tespit etmek, suşların antibiyotik duyarlılık ve serogrup profillerini belirlemek ve taşıyıcılar arasındaki epidemiyolojik ilişkiyi ortaya koymaktır. Dokuzyüzdokuz çocuğun posterior nazofarenksinden sürüntü alınmış, çalışma sonucunda bu çocukların 172 (%18,9)'sinde pnömokok taşıyıcılığı saptanmıştır. Taşıyıcılık erkek çocuklarda ve sosyo-ekonomik düzeyi düşük olanlarda daha yüksek bulunmuştur. Suşların sekiz antibiyotiğe duyarlılığı disk difüzyon yöntemiyle araştırılmıştır. Penisilin direnci oksasilin diski ile taranmış, penisilin E test ile doğrulanmıştır. Penisiline orta dirençli suş sayısı 17 (%9,9) olarak belirlenmiştir. Yüksek seviyede penisilin direnci saptanamamıştır. Ko-trimetaksozol ve tetrasiklin direnci sırasıyla %11 ve %4,1'dir. Eritromisin ve klindamisin düşük oranlarda (sırasıyla %4,7 ve %3,5) direnç saptanmıştır. Bütün izolatlar rifampisin, levofloksasin, moksifloksasin ve vankomisine duyarlı bulunmuştur. Kapsül şişme (Quellung) reaksiyonu 154 suшта yapılabilmektedir. Bunların 32 tanesi tiplendirilememiştir. Kalan 122 izolat (tüm izolatların %76,2'si) içinde 14 farklı serogrup tanımlanmıştır. En sık görülen serogruplar sırasıyla 9, 19, 23, 10, 6 ve 18 olarak bulunmuştur.

Penisiline orta derecede dirençli 17 suşun da bulunduğu 145 suşta "Arbitrary primed" polimeraz zincirleme reaksiyonu (AP-PZR) çalışıldı. "Pulsed Field Gel Electrophoresis" (PFGE) ise 12'si penisiline orta derecede dirençli olmak üzere toplam 57 suşta uygulanabildi. AP-PZR ile suşların %70,5'i, PFGE ile %44,6'sı epidemiyolojik olarak ilişkili bulundu.

Sonuç olarak; Bulunan serogruplar gelecekteki aşının kapsamı gereken serogruplar hakkında bilgi vermektedir. Malatya'da düşük sosyo-ekonomik durumdaki 7 yaş grubu çocuklar pnömokok taşıyıcılığı açısından yüksek riske sahiptir. Bölgemiz için Penisilin G direnci henüz önemli bir sıkıntı oluşturmamaktadır. Çocukların nazofarenksinde kolonize *S. pneumoniae* suşları arasında yüksek oranda epidemiyolojik ilişki vardır.

SUMMARY

Streptococcus pneumoniae commonly colonizes in the nasopharynx of healthy children and carriers may have an important role in circulation of this bacterial infection in a community. The aims of this study are to assess nasopharyngeal colonization rate, serotyping and antibiotic susceptibility patterns of *S. pneumoniae* isolates in healthy primary school children with different socio-economic conditions and to determine clonal relationship between the isolates. Cultures were performed from the swabs obtained from posterior nasopharyngeal walls of 909 children and 172 of these children (18.9%) were found to be carriers. Carriers were more often in male sex. Children with low socio-economic level had the highest carriage prevalence. The susceptibilities of the isolates to eight antibiotics were studied with disk diffusion test. The strains defined as penicillin resistant by oxacillin disk were retested with the penicillin E test. The number of intermediate penicillin-resistant *S. pneumoniae* strains was 17 (9.9%). No high level penicillin-resistant *S. pneumoniae* was found in this study. Resistance rate to co-trimoxazole and tetracycline were 11 %, and 4.1%, respectively. While resistances to erythromycin (4.7%) and clindamycin (3.5%) were low. All isolates were uniformly susceptible to rifampicin, levofloxacin, moxifloxacin and vancomycin. Serotyping with Quelling reaction was performed on 154 strains. Of these, 32 were not typed. Fourteen different serotypes were identified in the remaining 122 isolates. The most prevalent serotypes were serotypes 9, 19, 23, 10, 6, and 18 accounting for 76.2% of all typed isolates. Arbitrary primed polymerease chain reaction (AP-PCR) was used for molecular typing of 145 strains including 17 penicillin-resistant *S. pneumoniae* isolates. While Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) could be performed for 57 strains including 12 penicillin-resistant strains. AP-PCR and PFGE showed that 70.5 % and 44.6% the strains typed were epidemiologically related, respectively.

In conclusion: Serotyping data give us preliminary idea about the possible coverage of future pneumococcal vaccine. Our findings also show that penicillin G is still suitable agent for empiric treatment of pneumococcal infections in our population since penicilin resistance doesn't constitute an important trouble in our area and low socio-economic status may be risk factors for carriage of *S. pneumoniae* among healthy primary school children. There was high epidemiological relationship among the nasopharyngeal *S. pneumoniae* strains of the children in Malatya.

GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER

Streptococcus pneumoniae sıklıkla çocuklar olmak üzere sağlıklı bireylerin üst solunum yollarında flora elemanı olarak bulunur. Üst veya alt solunum yolları epitelinde herhangi bir hasar oluşmadıkça, varlıklarını kommensal olarak sürdürürler. Pnömonokok enfeksiyonlarının yayılmasında, taşıyıcılar önemli rol oynamaktadırlar. Taşıyıcılık aile, okul, yetimhaneler ve kreşler gibi insanların toplu halde, uzun süre bir arada yaşadıkları yerlerde daha da artmaktadır.

S. pneumoniae taşıyıcılığın risk faktörleri iyi araştırılmıştır. Küçük yaş, önceden antibiyotik kullanmış olmak, altta yatan hastalıklar, sigara kullanımı, yakın aile içi ilişkiler, okul ve kreş gibi toplu yaşanan yerlerde bulunmak, diğer solunum yolu enfeksiyonlarının varlığı önemli risk faktörleridir (4,6,20,21,28,29). İsveç gibi soğuk ülkelerde mevsimsel değişiklikler *S. pneumoniae* taşıyıcılığı açısından önemli bulunmazken, Hindistan gibi tropikal ülkelerde, soğuk aylarda, sıcak aylara göre taşıyıcılık belirgin şekilde daha yüksek bulunmuştur (17,19).

Üst solunum yollarının viral enfeksiyonları ve orta kulakta negatif basınca neden olan östaki borusunda ödem oluşumu orta kulak iltihabına ortam hazırlar. *S. pneumoniae*, bu enfeksiyonun en sık nedenleri arasında yer alır. Ayrıca sinüzit, akciğer enfeksiyonu, sepsis ve menenjitlerde önemli rol oynar.

S. pneumoniae izolatlarındaki antibiyotik direnç oranları bütün dünyada sürekli artmaktadır (36,38,41). Bu da toplumda dirençli suşların sirkülasyonunu gösterir. Sağlıklı taşıyıcılarda penisilin ve çoğul ilaç dirençli suşların varlığı ampirik tedaviyi zorlaştırır.

S. pneumoniae suşları kapsül şişme reaksiyonu (Quellung veya Neufeld reaksiyonu) ve özel pnömonokok antiserumlarıyla aglutinasyon gibi birçok yöntemle serolojik olarak tiplendirilir. Kapsül polisakkaritleri ile diğer bakteriler arasında çapraz reaksiyonların varlığı gösterilmiştir. Tiplendirmede Amerikan ve Danimarka isimlendirmesi kullanılmaktadır. Amerikan serogrublendirmesine örnek 1,2,3,4,..... 79, 83, 84 ve Danimarka serogrublendirmesine örnek 1,2,3,6A, 7A, 9N, 18F,..... 33A, 33B, 47A dır (39). *S. pneumoniae* 90 dan fazla serogrup içerir. Aynı ülke ve değişik ülkelerde yaşayan farklı toplumlarda, pnömonokoklarda serogrup ve genotip değişiklikleri mevcuttur (1,2,13,32).

Dirençli serogrupleri tespit etmek için taramaların periyodik olarak yapılması ampirik tedaviye yardımcı olabilir. Aşı hazırlamada yeni stratejiler geliştirilebilir. Türkiye’de pnömonokokların serogrublendirme ve genotiplendirme çalışmaları sınırlıdır (5,6,11).

S. pneumoniae 'nin alttıplemesi için birden fazla moleküler yöntem mevcuttur. Arbitrarily primed (random amplified) polimeraz zincirleme (AP-PZR) reaksiyonu ve Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) sıklıkla kullanılan yöntemlerdir (1,2,13).

AP-PZR reaksiyonu: Uygulanma kolaylığı ve kısa sürede sonuç verebilme açısından geniş kullanım alanı bulan bu yöntemin en önemli dezavantajı henüz standardizasyonun sağlanamamış olmasıdır. Primerlerin baz dizilimi ve amplifikasyon koşullarına göre değişmekle birlikte ayırım gücü oldukça iyidir. Patern farklılığının yorumlanmasında kabul görmüş bir kural yoktur. Laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik oranı yüksek değildir. Bu sorunları gidermek için kullanılan hedef DNA ekstraksiyon protokolü, DNA konsantrasyonu, primerlerin baz dizilimi ve konsantrasyonu, $MgCl_2$ konsantrasyonu, tampon ve Taq DNA polimeraz enziminin çalışma süresince sabit tutulması gerekmektedir. Laboratuvarlar arası standardizasyonu sağlamak için, M13 olarak bilinen universal primer'in kullanılması; sonuçların güvenilirliğini arttırmak için standardize edilmiş amplifikasyon karışımı, aynı thermocycler' da standart bir amplifikasyon protokolüyle uygulanmalı, tüm salgın izolatları aynı anda çalışılmalı ve sonuçları en az üç kez tekrar edilmelidir (42).

Pulsed Field Gel Electrophoresis: Moleküler tiplendirme yöntemlerinin altın standardı olarak kabul edilmektedir. Diğer yöntemlerle kıyaslandığında ayırım gücü onlara eşit veya daha fazladır. Zaman alıcı, laboratuvarın kurulması pahalıdır. Ancak, üstün adaptasyon kolaylığı, tekrarlanabilirliği ve ayırım gücü nedenleriyle bu yöntem major nozokomiyal patojenlerin ve bazı toplum kaynaklı patojenlerin tiplendirilmesinde geçerli olan bir metottur (7).

Bu yöntemde, sıvı veya katı besiyerinde üretilen bakteriler, düşük erime ısısı agaroz karıştırılıp küçük kalıplar içine dökülmektedir. Agaroz içine karıştırılan bakteri hücreleri, deterjan ve enzim yardımıyla parçalanarak (in situ-lysis) DNA izolasyonu yapılmaktadır. PFGE'de bozulmamış DNA gerekli olduğundan, DNA'da kırılmalara yol açabilen geleneksel DNA izolasyonu bu yöntem için uygun değildir. Lizis işlemini takiben agaroz kalıpları iyice yıkanarak veya diyalize edilerek protein ve karbon hidrat gibi kontaminantların uzaklaştırılması sağlanır. Büyük olan kromozomal DNA agaroz jel içinde tutulu kalır. Agaroz içindeki bakteriyel DNA, nispeten az sayıda ve büyük parçalar oluşturan bir restriksiyon enzimi (RE) ile kesime uğratılmaktadır (in situ-digestion). Daha sonra içinde kesime uğratılmış DNA parçaları bulunan kalıplar, elektroforez uygulanacak jel içindeki uygun çukurlara yerleştirilmekte ve belirli aralıklarla yönü değiştirilen elektrik akımına tabi tutulmaktadır. Bu tip bir elektrik akımı, 10-800 kilobazlık DNA segmentlerinin net olarak ayırt edilmesine imkan sağlamaktadır (7).

S. pneumoniae suşlarının antimikrobiyal direnç durumu, prevalansı, serogrup ve genotip dağılımı, Malatya toplumunda, daha önce çalışılmamıştır. Bu çalışmada; farklı sosyo-ekonomik şartlardaki sağlıklı ilköğretim çocuklarında, nazofarenjial kolonizasyon oranının tespiti, izolatların antibiyotiklere direnç durumları, ilimizdeki çocuklar arasındaki *S. pneumoniae* serogruplarının dağılımı ve moleküler alttıplama yöntemlerini kullanarak izolatlar arasındaki epidemiyolojik ilişkiyi belirlemek amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOTLAR

Çalışma grubu: Çalışma, Malatya ilinin farklı bölgelerindeki üç ilköğretim okulunda yapıldı. Birinci okula ait öğrenciler genellikle şehir merkezinde oturmakta olup, özel okul ve kolej imkanına sahip, zengin ve refah seviyesi yüksek ailelerin çocuklarıydı. İkinci okulun öğrencileri ise, genellikle şehir merkezinde oturmakta ve devlet okullarına devam etme imkanına sahip, sosyo-ekonomik seviyesi orta düzeyde olan ailelerin çocuklarıydı. Üçüncü okulda, sosyo-ekonomik seviyesi en düşük, gecekondü semtinde ikamet eden çocuklar bulunmaktaydı. Son iki hafta içinde herhangi bir solunum yolu enfeksiyonu geçirmeyen ve antibiyotik tedavisi almayan 909 sağlıklı çocuğun posterior nazofarenksinden tek sürüntü alındı. Her sürüntü, hemen %5 defibrine koyun kanı içeren triptik soy agar (TSA) plaklarına ekildi. 37°C'de %5 CO₂'li atmosferdeki gecelik inkübasyondan sonra, karakteristik yeşil, düz alfa-hemolitik koloniler izole edildi. Optokin diskinde duyarlılığı ve safrada erime testine (%10 sodyum deoksikolatın kullanıldığı tüp metodu) göre *S. pneumoniae* olarak tanımlandı. Tüm *S. pneumoniae* suşları, %3 gliserol içeren BHI besiyerinde -70°C'de stoklandı.

Duyarlılık testleri: Standart disk-difüzyon testi, NCCLS kriterlerine göre uygulanarak izolatların sekiz antibiyotiğe karşı duyarlılıkları %5 koyun kanlı Muller-Hinton agarda yapıldı (22). Kullanılan antibiyotik diskleri; eritromisin (15µg), klindamisin (2µg), ko-trimeksozol (25µg), tetrasiklin (30µg), rifampisin (5µg), levofloksasin (5µg), moksifloksasin (5µg) ve vankomisin (30µg) idi. 1 µg oksasilin diskiyle (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) penisilin direnci araştırıldı. 19 mm yada daha küçük inhibisyon zonu gösteren izolatlar penisilin E test ile doğrulandı. MIC testinin sonuçlarına göre < 0.06 mg/L (duyarlı), 0.1-1.0 mg/L (intermediate) ve > 2 mg/L (dirençli) olarak değerlendirildi (26). Kalite kontrol için *S. pneumoniae* ATCC 49619 referans suşu kullanıldı.

Serogrupleme: Toplam 172 *S. pneumoniae* suşunun 154'ü için serogrupleme yapılabildi. Onsekiz suşun saklama stoklarından üreme olmadı. Serogrupleme aşısı serogruplarını

kapsayan havuzlanmış 12 Pneumotest antiserumu kullanılarak, Quelling reaksiyonu (kapsül şişme reaksiyonu) ile yapıldı.

Moleküler tiplendirme: Penisiline orta derecede dirençli 17 suşla birlikte toplam 145 suşa "Arbitrary primed" polimeraz zincirleme reaksiyonu (AP-PZR) çalışıldı. "Pulsed Field Gel Electrophoresis" (PFGE) ise penisiline orta derecede dirençli 12 ve duyarlı 45 olmak üzere toplam 57 suşa çalışılabilirdi. Diğer suşlarda subkültür veya tiplendirme aşamalarında sorunlar çıktı.

"Arbitrary primed" polimeraz zincirleme reaksiyonu (AP-PZR): Proteinaz K ve lizozim enzimi kullanılarak bakteri hücrelerinin lizizi gerçekleştirildi. Takiben fenol-kloroform ekstraksiyonu ve etanol presipitasyonu yapıldı (40). UV spektrofotometre kullanılarak örneklerdeki DNA konsantrasyonu belirlendi. Önceden optimize edilmiş AP-PZR protokolu (8) takip edilerek, wilde tip faj M13'ün kor diziliminden hazırlanan primer (5'-GAG GGT GGC GGT TCT-3') yardımıyla 100 ng DNA'nın amplifikasyonu yapıldı. Amplifikasyon ürünü etidyum bromür içeren %1.5'lik agaroz jelde, 100 voltluk akımda 2 saat elektroforeze tabi tutuldu. UV transilüminatörde bant profilleri görüntülendi ve dijital kamerada resim çekilerek bilgisayara aktarıldı. Bilgisayardaki herbir suşa ait bant profilleri GelCompare software (version 3.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) yardımı ile analiz edildi. Tenover ve arkadaşlarının geliştirmiş oldukları kriterlere göre suşlar aynı (cluster), yakın ilişkili, muhtemel ilişkili ve farklı olarak sınıflandırıldı (37).

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE):

Bakterilerin agaroz gömülmesini takiben lizostafin enzimi kullanılarak hücreler parçalandı ve proteinler uzaklaştırıldı (10). Agaroz içindeki DNA, 24 U *Sma*I (Promega Corporation, USA) restriksiyon endonükleaz enzimiyle 24 saat 30°C lik su banyosunda bekletildi. DNA fragmentlerinin ayrıştırılması için 1% agaroz yerleştirilen plaklara, 0.5X Tris-borate-EDTA tamponu içinde CHEF-DR II sisteminde (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium) elektroforez uygulandı. Elektroforez koşulları; başlangıç çarpış süresi 5 s, bitiş çarpış süresi 40 s, tamponun sıcaklığı 14°C, akım 6 V/cm, süre 24 saat olarak uygulandı. Elektroforezi takiben jel etidyum bromürle boyandı, UV transilüminatör yardımıyla oluşan bant profilleri görüntülenerek bilgisayara aktarıldı. Bilgisayardaki herbir suşa ait bant profilleri GelCompare software (version 3.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) yardımıyla analiz edildi. Tenover ve ark. (37) tarafından geliştirmiş olan kriterlere göre suşlar aynı (cluster), yakın ilişkili, muhtemel ilişkili ve farklı olarak sınıflandırıldı.

İstatistiksel analiz: Taşıyıcılık oranları değişkenlerinin değerlendirilmesi için ki kare testi kullanıldı. 0.05 den küçük P değeri istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Taşıyıcılık: Çalışmaya alınan 909 çocuktan 497'si (%54.7) erkek ve 412'si (%45.3) kızdı. Yaş aralığı 4-15 yıl olarak bulundu (Tablo 1). Pnömonokok taşıyıcılığı 172 çocukta (%18.9) saptandı. Taşıyıcıların 91'i (%52.9) erkek ve 81'i (%47.1) kızdı.

Yaş ve sosyo ekonomik durum açısından anlamlı farklar mevcuttu. *S. pneumoniae* en sık 7 yaşındaki çocuklardan izole edildi (Tablo 1). Düşük sosyo ekonomik seviyede olan çocuklarda prevalans oranı daha yüksekti (Tablo 2).

Antibiyotiklere Duyarlılık: Test edilen 172 izolattan 23'ü (%13.4) oksasilin diski ile ≤ 19 mm inhibisyon zonu gösterdi. Ancak, E testi ile izolatların yalnızca 17'si penisiline orta derecede dirençli saptandı. Eritromisin ve klindamisin direnci düşüktü (eritromisin için % 4.7 ve klindamisin için %3.5). İzolatlardan %11'i ko-trimaksazole ve %4.1'i tetrasikline dirençli idi. Rifampisin, levofloksasine, moksifloksasin ve vankomisine bütün izolatlar duyarlıydı (Tablo 3). Orta seviyede penisilin dirençli 17 izolat aynı zamanda üç veya daha fazla antibiyotiğe de dirençli bulundu (çoğul ilaç direnci gösteriyordu (Tablo 4).

Serogruplar: Serogruplemeye alınan 154 izolatın 32'si (%20.8) mevcut panel ile tiplendirilemedi. En sık olan serogrup, serogrup 9 idi ve izolatların %23.8'ini oluşturuyordu. Sıklıkla bulunan serogruplar, sırasıyla serogrup 19 (%13.9), serogrup 23 (%11.5), serogrup 10 (%10.7) serogrup 6 (% 8.5) ve serogrup 18 (% 8.3) idi. Daha düşük oranlarda tanımlanan diğer serogruplar Tablo 5'te gösterilmiştir. Orta derecede penisilin direnci olan 17 izolatın 7'sinde serogrup 9, 5'inde serogrup 19, 3'ünde serogrup 23 ve 2'sinde serogrup 6 bulundu (Tablo 6). Kalite kontrol için kullanılan *S. pneumoniae* ATCC 49619 suşu serogrup 19 olarak saptandı.

Moleküler tiplendirme: AP-PZR çalışılan toplam 145 izolatın 112'sinin bant profili değerlendirmeye alınabildi. Bu yöntemle toplam 58 genotip saptandı. İzolatların 27 tanesi aynı, 31 tanesi yakın ilişkili ve 21 tanesi muhtemel ilişkili olarak bulundu. Genel olarak değerlendirildiğinde, toplam 79 (%70.5) izolat epidemiolojik olarak ilişkili, 33 izolat ilişkisiz saptandı. PFGE uygulanan 57 izolatın 47 tanesinde değerlendirilebilir bant profili elde edildi. Otuzbeş genotip saptandı. İzolatların sekiz tanesi aynı, iki tanesi yakın ilişkili, on bir tanesi muhtemel ilişkili bulunurken, yirmi altı izolat epidemiolojik olarak ilişkisizdi. Epidemiolojik olarak ilişkili olabilecek suşların oranı %44.6 olarak belirlendi. Penisiline orta seviyede direnç gösteren 17 suşun 15 tanesi AP-PZR ile tiplendirilebildi ve bu suşların %40'ı epidemiyolojik olarak ilişkili bulundu. Penisiline orta seviyede dirençli 12 suştan yalnızca ikisi tiplendirilebilir PFGE profili gösterdi. Test edilen izolatların AP-PZR ve PFGE yöntemlerinden elde edilen bant profillerinin, dendograma yansımaları, sırasıyla Şekil 1 ve 2 de görülmektedir.

TARTIŞMA

S. pneumoniae'nin nazofarenjial kolonizasyon oranı farklı topluluklar arasında değişiklik göstermektedir. Roma'da taşıyıcılık oranı %14.9 olarak bulunmuş ve aynı evde üçten fazla kişiyle birlikte yaşamak, taşıyıcılıkla anlamlı ilişkisi olan tek risk faktörü olarak belirlenmiştir (28). Taşıyıcılık Bangladeş' de %47 oranında bildirilmiştir (32). Pek çok çocuğun uzun süre bir arada yaşadıkları günlük bakım merkezlerinde de daha yüksek oranlar (%19,4 ve >%75) saptanmıştır (4,30). Popülasyona dayalı bu çalışma, ilimizde çocuklar arasında *S. pneumoniae* taşıyıcılık durumunu gösteren ilk araştırmadır ve %18,9 oranında taşıyıcılık tanımlanmıştır. Literatürle uyumlu olarak (1,33) düşük sosyo-ekonomik düzeyde olan ailelerin çocuklarında anlamlı derecede yüksek oranda taşıyıcılık saptandı. Bu çocukların beslenme durumları ve kalabalık ailelerden gelmeleri yüksek taşıyıcılık için risk faktörü olabilir.

İzolatların penisilin G'ye direncinin taranması için 1 µg'lık oksasilin diski kullanıldı. Ancak, oksasilin diski ile penisilin dirençli olarak tanımlanan *S. pneumoniae* izolatlarının %71,9'unun E-test ile orta derecede dirençli olduğu görüldü, yüksek seviyede penisilin direnci saptanamadı. Oksasilin inhibisyon çapı ≤14 mm olan bütün suşlar, penisiline orta derecede dirençli olarak bulundu. Ancak inhibisyon çapı 15-20 mm olan suşlarda oksasilin diski ile saptanan penisilin direnci önemli oranda hatalıydı. Bu suşların E-test ile tekrar test edilme gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Önceden belirtildiği gibi (18), *S. pneumoniae* izolatlarındaki penisilin direncinin tespitinde E-testinin en doğru ve etkili metot olduğu bir kez de bu çalışmayla gösterilmiştir.

İnvaziv ve noninvaziv *S. pneumoniae* suşlarında antibiyotik direnç oranlarında ülkeler arasında ve hatta aynı ülke içinde coğrafik değişkenlikler gözlenmiştir. Penisilin dirençli izolatlar, güney İsrail'de (%20) ülkenin geri kalan kısmına göre daha az sıklıkta (%42) bulunmuştur (13). Brezilya'da orta derecede penisilin direnci %41 ve yüksek seviyede penisilin direnci %4 olarak bildirilmiştir (30). Hong-Kong'ta bu oranlar sırasıyla %32.1 ve %26.1 olarak tanımlanmıştır (4). Yunan çocuklarında orta dereceli penisilin direnci %9 ve yüksek dereceli direnç %7.6 ve eritromisin direnci %18.1 olarak bulunmuştu (35). Türkiye'de yüksek seviyeli direnç %0-3.5 ve orta dereceli direnç %23-32.7 oranında bildirilmiştir (5,11,14,34). Benzer sonuçlar İtalya da, Bari bölgesinde gözlenmiştir. Burada sağlıklı çocukların %18.29'u *S. pneumoniae* açısından pozitif saptanmış ve suşların %8.6'sı penisiline orta derecede dirençli bulunmuştur. Ancak, eritromisine yüksek oranda (%65.5) direnç bildirilmiştir (23).

Bu çalışmada, suşların sadece %9'u penisiline orta derecede dirençliydi ve yüksek seviyede dirençli suş bulunamadı. Buna göre ilimizdeki pnömokok enfeksiyonlarının ampirik tedavisinde penisilin G hala uygun olan ajandır. Ancak ülkemizin farklı bölgelerinden, penisiline orta derecede direncin yüksek oranlarda bildirilmesi, eritromisin ve klindamisine dirençli suş oranımızın düşük bulunması gibi nedenlerle bu iki antibiyotik hayati önemi olmayan pnömokok enfeksiyonlarında alternatif olarak önerilebilir. Orta derecede penisilin direnci olan pnömokok suşlarının hepsine moksifloksasin, levofloksasin, rifampisin ve vankomisin etkili olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla bu ilaçlar, çoğul ilaç dirençli *S. pneumoniae* suşlarının neden olduğu ciddi enfeksiyonların tedavisinde etkili ajanlar olarak kullanılabilir. Dünyada çoğul ilaca dirençli *S. pneumoniae* prevalansının arttığına dair yakın zamandaki çalışmalara karşın (16,41), bu çalışmada çoğul ilaca dirençli *S. pneumoniae* oranları; orta derecede penisilin dirençli izolatlarda %52.9 ve bütün izolatlarda % 5.2 olarak bulundu. Direnç prevalanslarında coğrafi görülen değişkenlik kısmen duyarlılık testlerindeki metotsal yaklaşım farklarına bağlı olabilir. Etkili ampirik tedavi için ilaçların seçiminde yerel ve bölgesel sürveyans gereklidir (22,38).

Dünyanın pek çok bölgesinde yapılan çalışmalarda belli serogrupların daha dirençli yada sık olduğu belirtilmiştir (24,30). Serogrup 6, 9, 14, 19 ve 23 en sık saptanan serogruplardır (15,24,31). Bu bilgilerle uyumlu olarak, bölgemizdeki orta derecede penisilin dirençli *S. pneumoniae* izolatları arasında gözlenen serogruplar, serogrup 6, 9, 19 ve 23 idi. Ayırım yapılmaksızın tiplendirilen tüm izolatlar arasında en sık olan serogrup 9 idi.

İzolatların %20,8'i kullanılan pnömokok tiplendirme antiserumları ile reaksiyon vermeyen "tiplendirilemez" suşlar olarak tanımlandı. Bu durum sıklıkla steril olmayan bölgelerden, nadiren de steril bölgelerden elde edilen izolatlarda bildirilmiştir (2,3). Bunlar kapsülsüz suşlar olabilir ve hastalık oluşturma potansiyelleri düşüktür (3,27). Bir çalışmada steril olmayan bölgelerden elde edilen *S. pneumoniae* izolatlarını %10'unun "tiplendiremez" olduğu bildirilmiştir (2).

Serogrupleme; pnömokok enfeksiyonlarının yayılımını azaltan/engelleyen ve mortaliteyi düşüren aşılarda geliştirilmesinde, yeni stratejiler planlanması için çok önemlidir (21). Pek çok ülkede serogrup 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F ve 23F'yi içeren pnömokok aşısı kullanılmıştır. Bunun antibiyotik dirençli suşların taşıyıcılık oranını düşürerek invazif olan ve olmayan pnömokok enfeksiyonlarının önlenmesinde etkili olduğu görülmüştür (12). Ancak pnömokok aşısı Türkiye'de kullanılmamaktadır. Bu çalışmada buluna serogruplar ve direnç paternleri yeni pnömokok aşılarının hazırlanması için fikir verebilir.

Bu çalışmada, suşların sadece %9'u penisiline orta derecede dirençliydi ve yüksek seviyede dirençli suş bulunamadı. Buna göre ilimizdeki pnömokok enfeksiyonlarının ampirik tedavisinde penisilin G hala uygun olan ajandır. Ancak ülkemizin farklı bölgelerinden, penisiline orta derecede direncin yüksek oranlarda bildirilmesi, eritromisin ve klindamisine dirençli suş oranımızın düşük bulunması gibi nedenlerle bu iki antibiyotik hayati önemi olmayan pnömokok enfeksiyonlarında alternatif olarak önerilebilir. Orta derecede penisilin direnci olan pnömokok suşlarının hepsine moksifloksasin, levofloksasin, rifampisin ve vankomisinin etkili olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla bu ilaçlar, çoğul ilaç dirençli *S. pneumoniae* suşlarının neden olduğu ciddi enfeksiyonların tedavisinde etkili ajanlar olarak kullanılabilir. Dünyada çoğul ilaca dirençli *S. pneumoniae* prevalansının arttığına dair yakın zamandaki çalışmalara karşın (16,41), bu çalışmada çoğul ilaca dirençli *S. pneumoniae* oranları; orta derecede penisilin dirençli izolatlarda %52.9 ve bütün izolatlarda % 5.2 olarak bulundu. Direnç prevalanslarında coğrafi görülen değişkenlik kısmen duyarlılık testlerindeki metotsal yaklaşım farklarına bağlı olabilir. Etkili ampirik tedavi için ilaçların seçiminde yerel ve bölgesel sürveyans gereklidir (22,38).

Dünyanın pek çok bölgesinde yapılan çalışmalarda belli serogrupların daha dirençli yada sık olduğu belirtilmiştir (24,30). Serogrup 6, 9, 14, 19 ve 23 en sık saptanan serogruplardır (15,24,31). Bu bilgilerle uyumlu olarak, bölgemizdeki orta derecede penisilin dirençli *S. pneumoniae* izolatları arasında gözlenen serogruplar, serogrup 6, 9, 19 ve 23 idi. Ayırım yapılmaksızın tiplendirilen tüm izolatlar arasında en sık olan serogrup 9 idi.

İzolatların %20,8'i kullanılan pnömokok tiplendirme antiserumları ile reaksiyon vermeyen "tiplendirilemez" suşlar olarak tanımlandı. Bu durum sıklıkla steril olmayan bölgelerden, nadiren de steril bölgelerden elde edilen izolatlarda bildirilmiştir (2,3). Bunlar kapsülsüz suşlar olabilir ve hastalık oluşturma potansiyelleri düşüktür (3,27). Bir çalışmada steril olmayan bölgelerden elde edilen *S. pneumoniae* izolatlarını %10'unun "tiplendiremez" olduğu bildirilmiştir (2).

Serogrupleme; pnömokok enfeksiyonlarının yayılımını azaltan/engelleyen ve mortaliteyi düşüren aşılarda geliştirilmesinde, yeni stratejiler planlanması için çok önemlidir (21). Pek çok ülkede serogrup 4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F ve 23F'yi içeren pnömokok aşısı kullanılmıştır. Bunun antibiyotik dirençli suşların taşıyıcılık oranını düşürerek invazif olan ve olmayan pnömokok enfeksiyonlarının önlenmesinde etkili olduğu görülmüştür (12). Ancak pnömokok aşısı Türkiye'de kullanılmamaktadır. Bu çalışmada buluna serogruplar ve direnç paternleri yeni pnömokok aşılarının hazırlanması için fikir verebilir.

İnfeksiyon hatalıklarının kontrol altına alınmasında kaynakların saptanması kadar, yayılmanın derecelendirilmesi de oldukça yararlı olabilmektedir. Moleküler tiplendirme yöntemleri çalışılan izolatlar arasındaki epidemiyolojik ilişkiyi en güvenli biçimde ortaya koyan yöntemlerdir (9). Bu çalışmada kullanılan AP-PZR ve PFGE tiplendirme yöntemleri pekçok gram pozitif ve gram negatif bakterinin moleküler tiplendirmesinde kullanılmıştır (8,10,38,41). AP-PZR ile test edilen suşların *S. pneumoniae* ile yapılan tiplendirme çalışmalarında AP-PZR ve PFGE ile sırasıyla suşların yalnızca %29.5 ve %55.4'ü birbiriyle tamamen ilişkisiz olarak bulunmuştur. Bu bulgular, çalışılan toplumdaki pnömokok suşları arasında, yüksek oranda bulaşın belirtileri olarak değerlendirilebilir.

Sonuçlarımız, ilimizdeki çocuklar arasında mevcut *S. pneumoniae* serogrupları ve direnç paternlerini aydınlatmaktadır. Serogruplar ve direnç paternleri zamanla değişikliğe uğrayabileceğinden, bölgemizde zaman zaman *S. pneumoniae* 'nin serogrup dağılımı ve direnç sürveyansına ihtiyaç vardır.

SONUÇLAR

1-İlimizde çocuklar arasında *S. pneumoniae* taşıyıcılık durumunu gösteren bu ilk araştırmada; %18,9 oranında nazofarenjial taşıyıcılık tanımlanmıştır. Taşıyıcılık düşük sosyo-ekonomik düzeyde ve 7 yaşındaki çocuklarda anlamlı derecede artmaktadır.

2-*S. pneumoniae* suşlarında yüksek seviyede penisilin direnci saptanmamış olmakla birlikte, %9.3 oranında orta seviyede penisilin direnci saptanmış olması, enfeksiyon etkeni olarak izole edilen pnömokoklarda *in vitro* penisilin direncinin saptanmasının gerekliliğini doğrulamaktadır.

3-Oksasilin diski ile dirençli bulunan *S. pneumoniae* izolatlarının penisilin E testi ile doğrulanması gerekmektedir.

4-Tedavide, penisilin alternatif olan eritromisin ve klindamisine düşük oranlarda da olsa direnç saptanması, bu ilaçların ihtiyatla kullanılmalarının gerekliliğini göstermektedir.

5- Vankomisin, levofloksasin, moksifloksasin *in vitro* etkinliği en iyi olan ilaçlar olup, ciddi pnömokok enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılabilir.

5-*S. pneumoniae* suşlarında 14 farklı serogrup saptanmıştır. Serogrup 9, 19, 23, 10, 6 ve 18 en sık saptanan tipler olup, tiplendirilen izolatların %76.2 sini kapsamaktadır. Bu bulgular bölgemizde uygulanacak pnömokok aşısının kapsamı gereken serogruplar açısından yararlı olacaktır.

6-Moleküler tiplendirme yöntemleri, çocukların nazofarenksinde kolonize *S. pneumoniae* suşlarının, yüksek oranda, epidemiyolojik olarak ilişkili olabileceklerini göstermektedir. Penisiline dirençli olanlardaki klonal ilişki, duyarlı olanlardan daha yüksek değildi.

KAYNAKLAR

1. **Bogaert D., M. N. Engelen, A. J. Timmers-Reker, K. P. Elzenaar, P. G. Peerbooms, R. A. Coutinho, R. de Groot, and P.W. Hermans.** 2001. Pneumococcal carriage in children in the Netherlands: a molecular epidemiological study. *J. Clin. Microbiol.* **39**:3316-3320.
2. **Brueggemann, A. B., D. T. Griffiths, E. Meats, T. Peto, D.W. Crook, and B.G. Spratt.** 2003. Clonal relation between invasive and carriage *Streptococcus pneumoniae* and serotype and clone specific differences in invasive disease potential. *J. Infect. Dis.* **187**:1424-1432.
3. **Carvalho M. G., A. G. Steigerwalt, T. Thompson, D. Jackson, and R. R. Facklam.** 2003. Confirmation of nontypeable *Streptococcus pneumoniae*-like organisms isolated from outbreaks of epidemic conjunctivitis as *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 4415-4417.
4. **Chiu S. S., P. L. Ho, F. K. Chow, K. Y. Yuen, and Y. L. Lau.** 2001. Nasopharyngeal carriage of antimicrobial-resistant *Streptococcus pneumoniae* among young children attending 79 kindergartens and day care centers in Hong Kong. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2765-2770.
5. **Ciftci. E., U. Dogru, D. Aysev, E. Ince, and H. Guriz.** 2000. Nasopharyngeal colonization with penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Turkish children. *Pediatr. Int.* **42**:552-556.
6. **Ciftci, E., U. Dogru, D. Aysev, E. Ince, H. Guriz, and U. D. Aysev.** 2001. Investigation of risk factors for penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* carriage in Turkish children. *Pediatr. Int.* **43**:385-390.
7. **Durmaz B, Durmaz R.** 2002. Pulsed-field gel electrophoresis. Durmaz R (Ed). *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, S: 161-168.
8. **Durmaz R, Durmaz B, Bayraktar M, Ozerol IH, Kalcioğlu MT, Aktas E, Cizmeci Z.** 2003. Prevalence of group A streptococcal carriers in asymptomatic children and clonal relatedness among isolates in Malatya, Turkey. *J Clin Microbiol.* **41**:5285-5287.

9. **Durmaz R, Durmaz B.** 2002. Moleküler epidemiyoloji'nin prensipleri. Durmaz R (Ed). Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, S: 139-147.
10. **Elliott JA, Farmer KD, Facklam RR.** 1998. Sudden increase in isolation of group B streptococci, serotype V, is not due to emergence of a new pulsed-field gel electrophoresis type. J Clin Microbiol. 36:2115-2116
11. **Esel D., B. Sumerkan, and S. Kocagoz.** 2001. Epidemiology of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* isolates in Kayseri, Turkey. Clin. Microbiol. Infect. 7:548-552.
12. **Givon-Lavi N., D. Fraser, and R. Dagan.** 2003. Vaccination of day-care center attendees reduces carriage of *Streptococcus pneumoniae* among their younger siblings. Pediatr. Infect. Dis. J. 22:524-532.
13. **Greenberg D., R. Dagan, M. Muallem, and N. Porat.** 2003. Antibiotic-resistant invasive pediatric *Streptococcus pneumoniae* clones in Israel. J. Clin. Microbiol. 41:5541-5545.
14. **Gur D., B. Guciz, G. Hascelik, D. Esel, B. Sumerkan, U. Over, G. Soyletir, B. Ongen, A. Kaygusuz, and K. Toreci.** 2001. *Streptococcus pneumoniae* penicillin resistance in Turkey. J. Chemother. 13:541-545.
15. **Joloba M. L., S. Bajaksouzian, E. Palavecino, C. Whalen and M. R. Jacobs.** 2001. High prevalence of carriage of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in children in Kampala Uganda. Int. J. Antimicrob. Agents. 17:395-400.
16. **Jones M. E., R. S. Blosser-Middleton, C. Thornsberry, J. A. Karlowsky, and D.F. Sahm.** 2003. The activity of levofloxacin and other antimicrobials against clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* collected worldwide during 1999-2002. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 47:579-586.
17. **Kanungo R., D. d'Lima, B. Rajalakshmi, M. K. Natarajan, and S. Badrinath.** 2000. Throat carriage of pneumococci in healthy school children in the union territory of Pondicherry. Indian J. Med. Res. 112: 100-103.
18. **Kiska, D. L., A. Kerr, M. C. Jones, N. N. Chazotte, B. Eskridge, S. Miller, M. Jordan, C. Sheaffer, and P. H. Gilligan.** 1995. Comparison of antimicrobial susceptibility methods for detection of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. J. Clin. Microbiol. 33: 229-232.
19. **Marchisio P., S. Gironi, S. Esposito, G. C. Schito, S. Mannelli, and N. Principi.** 2001. Seasonal variations in nasopharyngeal carriage of respiratory pathogens in

- healthy Italian children attending day-care centres or schools. *J. Med. Microbiol.* **12**:1095-1099.
20. **Masuda K., R. Masuda, J. Nishi, K. Tokuda, M. Yoshinaga, and K. Miyata.** 2002. Incidences of nasopharyngeal colonization of respiratory bacterial pathogens in Japanese children attending day-care centers. *Pediatr. Int.* **44**:376-380.
 21. **Melander, E., S. Molstad, K. Persson, H. B. Hansson, M. Soderstrom, and K. Ekdahl.** 1998. Previous antibiotic consumption and other risk factors for carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in children. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **17**:834-838.
 22. **Metlay J. P., C. C. Branas, and N. O. Fishman.** 2004. Hospital-reported pneumococcal susceptibility to penicillin. *Emerg. Infect. Dis.* **10**:54-59.
 23. **Mosca A., A. Carucci, L. Santacroce, F. Schettini, D. De Mattia, and G. Miragliotta.** 2003. *Streptococcus pneumoniae* nasopharyngeal colonization in young healthy children: rate of carriage, serotype distribution, and antibiotic resistance. *New Microbiol.* **26**:187-192.
 24. **Muhlemann K., H. C. Matter, M. G. Tauber, and T. Bodmer.** 2003. Nationwide surveillance of nasopharyngeal *Streptococcus pneumoniae* isolates from children with respiratory infection, Switzerland, 1998-1999. *J. Infect. Dis.* **187**:589-596.
 25. **Musher D. M.** 1992. Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. *Clin. Infect. Dis.* **14**: 801-807.
 26. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2001. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: NCCLS document M100-S12. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Wayne, Pennsylvania.
 27. **Pease A. A., C. W. Douglas, and R. C. Spencer.** 1986. Identifying non-capsulate strains of *Streptococcus pneumoniae* isolated from eyes. *J. Clin. Pathol.* **39**:871-875.
 28. **Petrosillo N., A. Pantosti, E. Bordini, A. Spano, M. Del Grosso, B. Tallarida, and G. Ippolito.** 2002. Prevalence, determinants, and molecular epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* isolates colonizing the nasopharynx of healthy children in Rome. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect.* **21**:181-188.
 29. **Regev-Yochay G., M. Raz, B. Shainberg, R. Dagan, M. Varon, M. Dushenat, and E. Rubinstein.** 2003. Independent risk factors for carriage of penicillin-non-susceptible *Streptococcus pneumoniae*. *Scand. J. Infect. Dis.* **35**:219-222.
 30. **Rey L. C., B. Wolf, J. L. Moreira, D. Milatovic, J. Verhoef, and C. K. Farhat.** 2002. Antimicrobial susceptibility and serotypes of nasopharyngeal *Streptococcus*

- pneumoniae* in children with pneumonia and in children attending day-care centres in Fortaleza, Brazil. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **20**:86-92.
31. **Ronchetti M. P., R. Merolla, S. Bajaksouzian, G. Violo, R. Ronchetti, and M.R. Jacobs.** 1998. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* from children attending day-care centers in a central Italian city. *Clin. Microbiol. Infect.* **4**: 622-626.
 32. **Saha S.K., Baqui A.H., Darmstadt G.L., Ruhulamin M, Hanif M, El Arifeen S, Santosham M, Oishi K, Nagatake T, and R.F. Black.** 2004. Comparison of antibiotic resistance and serotype composition of carriage and invasive pneumococci among Bangladeshi children: implications for treatment policy and vaccine formulation. *J Clin Microbiol.* **41**: 5582-5587.
 33. **Samore M. H., M. K. Magill, S. C. Alder, E. Severina, L. Morrison-De Boer, J. L. Lyon, K. Carroll, J. Leary, M. B. Stone, D. Bradford, J. Reading, A. Tomasz, and M A. Sande.** 2001. High rates of multiple antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* from healthy children living in isolated rural communities: association with cephalosporin use and intrafamilial transmission. *Pediatrics.* **108**:856-865.
 34. **Sener B. and A. Günalp.** 1998. Trends in antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* in children in a Turkish hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* **42**:381-384.
 35. **Syrogianopoulos G. A., I. N. Grivea, G. D. Katopodis, P. Geslin, M. R. Jacobs, and N. G. Beratis.** 2002. Carriage of antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* in Greek infants and toddlers. *Clin. Infect. Dis.* **35**:1174-1182.
 36. **Tang Y. W., H. Li, J. P. Griffin, D. W. Haas, and E. M. D'Agata.** 2002. Rapidly increasing prevalence of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in middle Tennessee: a 10-year clinical and molecular analysis. *J. Clin. Microbiol.* **40**:395-399.
 37. **Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B..** 1995. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* **33**: 2233-2239.
 38. **Tomasz, A.** 1997. Antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Clin. Infect. Dis.* **24**:S85-S88.
 39. **Ustaçelebi Ş.** 1999. Temel ve klinik mikrobiyoloji. Güneş kitabevi, Ankara. S: 367.
 40. **Welsh J, McClelland M.** 1993. Characterization of pathogenic microorganisms by genomic fingerprinting used arbitrarily primed PCR. In: Persing DH, Smith TF, Tenover F, White TJ eds. *Diagnostic Molecular Microbiology: Principles and*

applications. Washington: American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp. 595-602.

41. Whitney C. G., M. M. Farley, J. Hadler, L. H. Harrison, C. Lexau, A. Reingold, L. Lefkowitz, P. R. Cieslak, M. Cetron, E. R. Zell, J. H. Jorgensen, and A. Schuchat. 2000. Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. N. Engl. J. Med. **343**:1917-1924.
42. Yağcı A. 2002. Restriction fragment length plimorfizm ve polimeraz zincirleme reaksiyon bazlı tiplendirme yöntemleri. Durmaz R (Ed). Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, s: 149-160.

Tablo 2. Farklı serotiplerdeki serotiplerin izolasyon oranları ve serotiplerin dağılımı.

Serotip	Sayı	Oran (%)
1	11	4,7
2	103	19,2
3	52	21,8
4	177	38,9

Toplam: 243

Tablo 3. Farklı serotiplerin izolasyon oranları ve serotiplerin dağılımı.

Serotip	Sayı	Oran (%)
1	11	4,7
2	103	19,2
3	52	21,8
4	177	38,9

Tablo 1. *S. pneumoniae* nazofarenjial taşıyıcılığının yaşa göre dağılımı.

Yaş (yıl)	Taşıyıcılık durumu	
	Sayı	%
≤6	10/61	16.4
7	89/308	28.9*
8	35/234	15.0
9	32/206	15.5
≥ 10	6/100	6.0
Total	172/909	18.9

* $\chi^2= 35.05$, P değeri: 0.000004538

Tablo 2. Farklı sosyo-ekonomik seviyedeki ilköğretim çocuklarında *S. pneumoniae* taşıyıcılık oranları.

Okullar (n)	Taşıyıcı	
	Sayı	%
Okul 1, yüksek sosyoekonomik düzey (114)	11	9.7
Okul 2, orta sosyoekonomik düzey (569)	109	19.2
Okul 3, düşük sosyoekonomik düzey (226)	52	23.0*
Toplam (909)	172	18.9

* $\chi^2= 8.87$, P değeri: 0.0119

Tablo 3 Sağlıklı çocuklardan izole edilen 172 *S. pneumoniae* izolatının antibiyotik duyarlılıkları.

Antibiyotik	duyarlı		Orta duyarlı		dirençli	
	sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Penisilin	156	90.7	16	9.3	0	0
Eritromisin	163	94.7	1	0.6	8	4.7
Klindamisin	166	96.5	0	0	6	3.5
Vankomisin	172	100	0	0	0	0
Tetrasiklin	165	95.9	0	0	7	4.1
Ko-trimaksozol	148	86.1	5	2.9	19	11
Levofloksasin	172	100	0	0	0	0
Moksifloksasin	172	100	0	0	0	0
Rifampisin	172	100	0	0	0	0

Tablo 4. Penisiline orta seviyede dirençli 17 *S. pneumoniae* suşunun diğer antibiyotiklere direnç profilleri

Dirençli suş	1 Antibiyotik	2 Antibiyotik	3 Antibiyotik	4 Antibiyotik
Sayı	8	4	3	2
%	47.1	23.5	17.6	11.8

Tablo 5. 122 *S. pneumoniae* izolatının serogrup dağılımı.

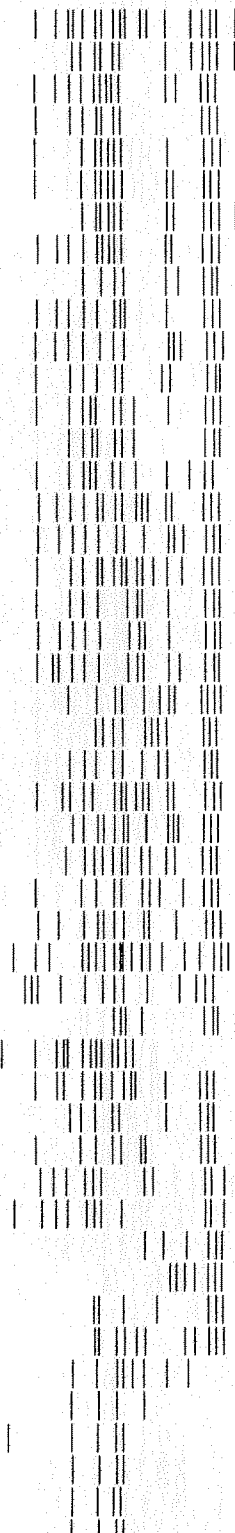
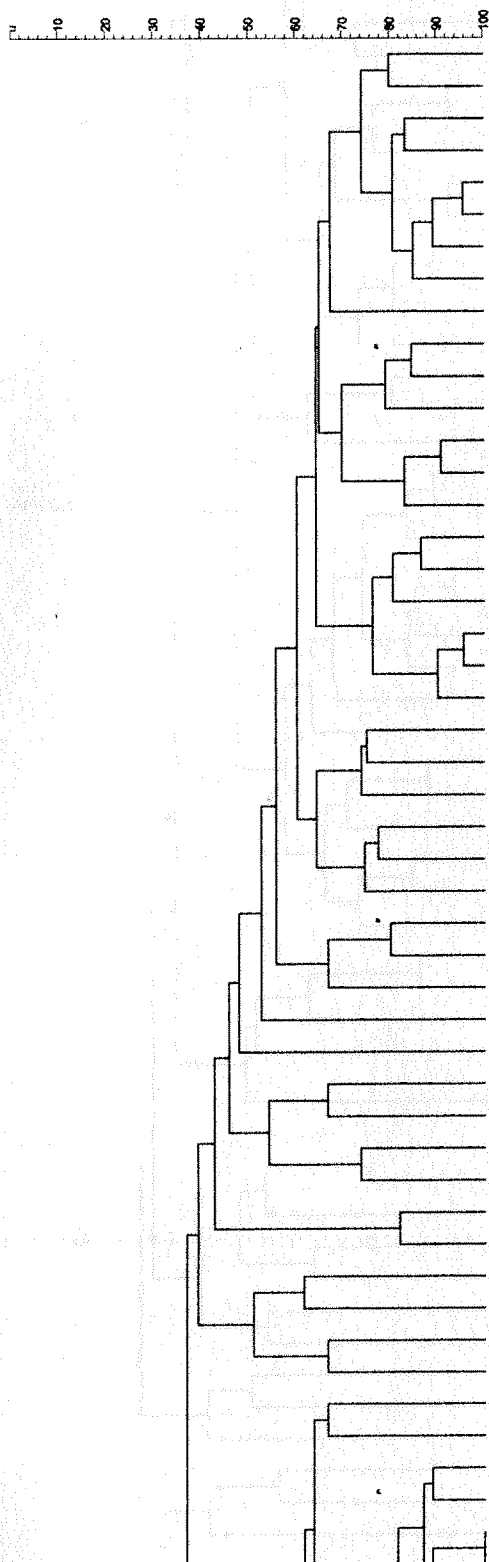
Serogrup	Okul 1	Okul 2	Okul 3	Toplam
1		4	1	5
3	1	5		6
6		8	2	10
9	1	20	8	29
10		9	4	13
11		2	1	3
12		1	1	2
14	1	3		4
15		4	3	7
18		8	2	10
19	2	12	3	17
20			1	1
23		13	1	14
33		1		1
Toplam	5	90	27	122

Tablo 6. Orta seviyede penisiline dirençli 17 *S. pneumoniae* suşunun serogrupleştirme sonuçları

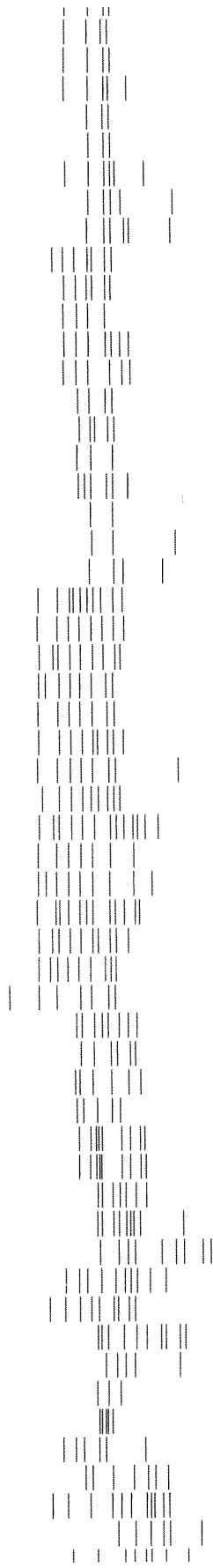
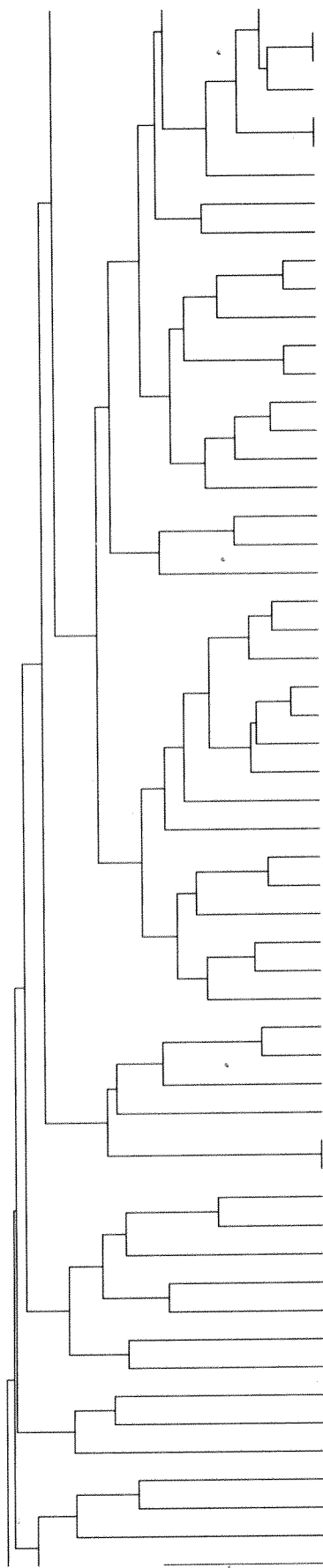
Serogrup	Sayı
6	2
9	7
19	5
23	3
Toplam	17

Dice (Tol 1.0%-1.0%) (P>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
AP-PCR 1. grup

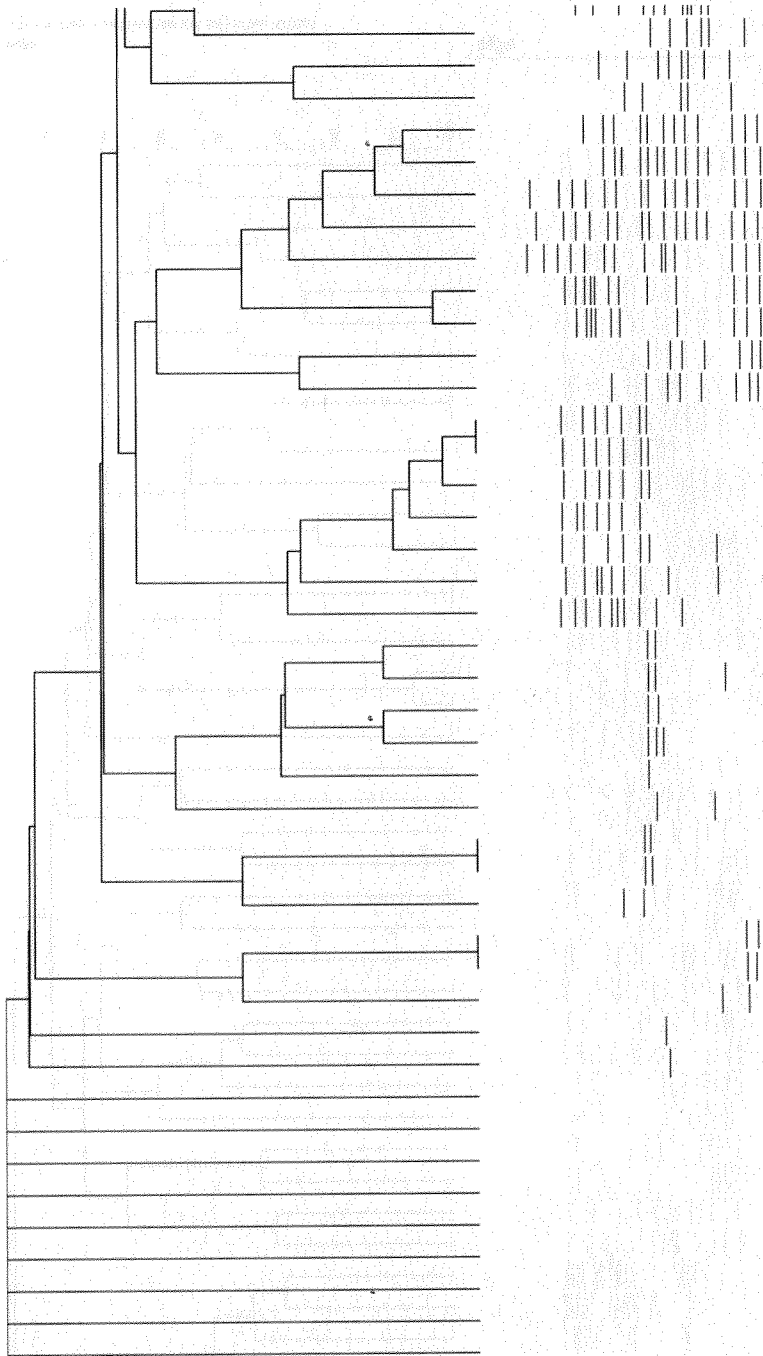
AP-PCR 1. grup



02-03 -
02-05 -
03-05 -
02-04 -
01-08 -
02-09 -
02-07 -
02-01 -
04-05 -
01-05 -
02-12 -
01-11 -
01-06 -
01-12 -
01-03 -
02-02 -
04-07 -
02-06 -
01-07 -
04-08 -
04-06 -
02-11 -
04-02 -
03-08 -
01-04 -
04-04 -
04-03 -
03-06 -
03-10 -
02-10 -
03-09 -
03-07 -
11-11 -
03-01 -
03-02 -
03-03 -
06-01 -
06-07 -
01-10 +
01-09 -
04-09 -
04-10 +
08-10 +
09-12 -
09-09 -
09-07 -
10-06 -
09-10 -



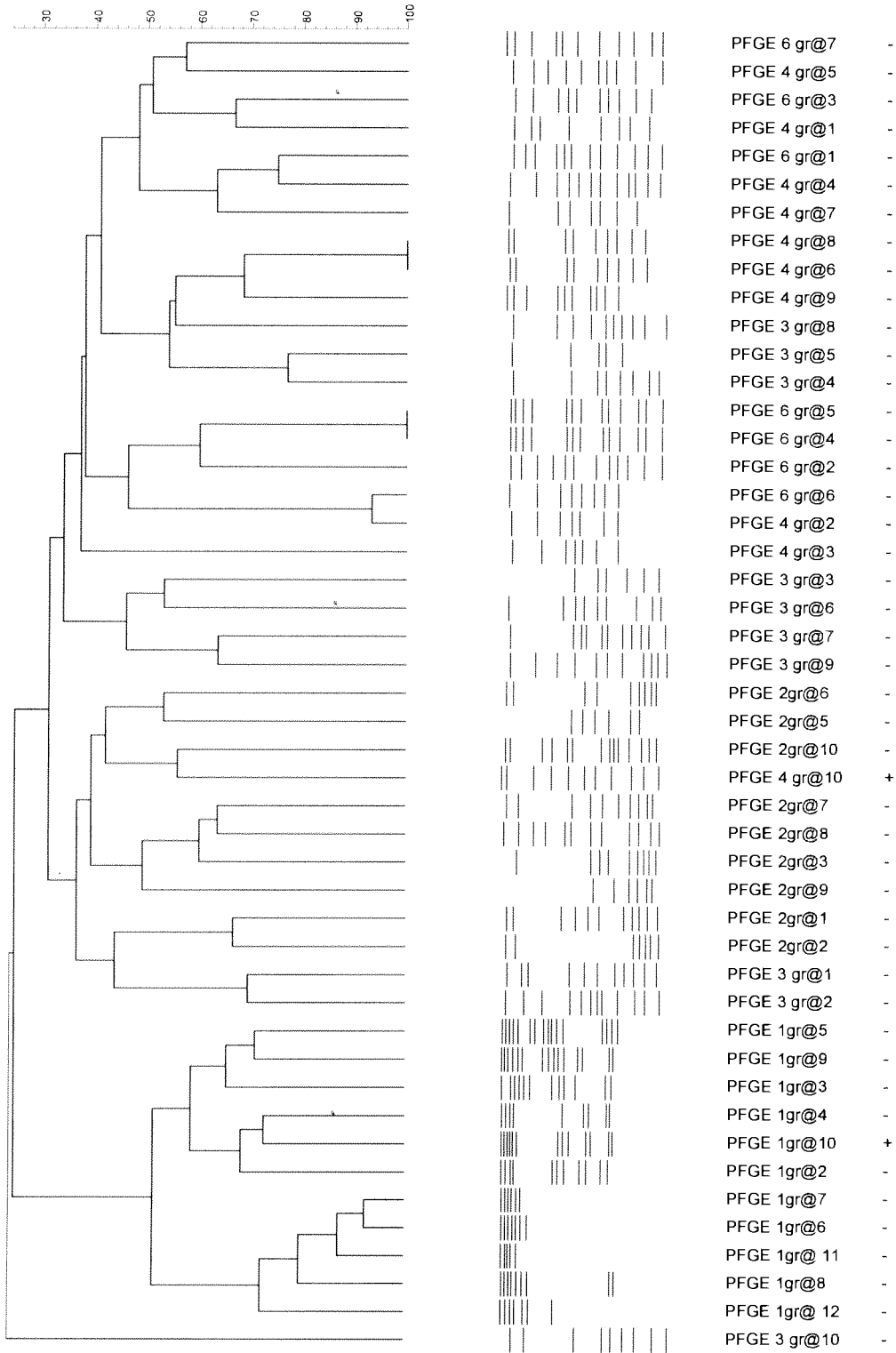
10-06 -
 09-10 -
 09-05 -
 10-01 -
 09-08 -
 09-06 -
 09-04 -
 09-14 -
 08-05 +
 08-13 -
 09-16 +
 08-01 -
 09-17 +
 10-08 -
 08-09 -
 09-11 -
 09-02 -
 09-13 -
 09-03 -
 09-15 -
 10-05 -
 10-12 +
 10-11 +
 10-02 -
 10-03 -
 10-07 -
 11-16 -
 10-10 -
 07-03 -
 08-12 +
 08-14 -
 08-04 -
 10-14 -
 11-02 -
 11-12 -
 10-13 -
 08-11 -
 08-15 -
 11-15 -
 07-06 -
 07-02 +
 07-14 -
 07-13 -
 02-08 -
 10-15 -
 11-05 -
 07-10 +
 08-02 -
 10-17 -
 07-16 +
 10-09 -
 07-01 -
 07-07 +
 04-01 -
 04-01 -



04-01 -
09-01 -
08-06 -
05-06 -
05-09 -
05-10 -
06-03 -
05-04 -
06-02 -
06-04 -
06-06 -
06-05 -
11-04 -
11-06 -
11-09 -
11-03 -
11-08 -
11-07 -
11-01 -
07-08 +
08-08 -
10-16 -
07-05 -
07-17 -
05-01 +
10-04 -
08-16 -
11-10 -
05-02 -
05-05 -
01-02 -
08-03 -
07-11 -
11-14 -
03-04 -
05-03 -
05-07 -
07-04 -
07-12 +
07-15 -
07-09 +
08-07 -

Şekil 1- AP-PZR sonuçlarının dendrogramda gösterilmesi.

(+) Orta seviyede penisilin dirençli suşları, (-) penisiline duyarlı suşları göstermektedir



Şekil 2. PFGE tiplene sonuçları. (+) Orta seviyede penisilin dirençli suşları, (-) penisiline duyarlı suşları göstermektedir.

PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Kodu: SBAG-2615	
Proje Başlığı: ÇOCUKLARDA <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i> NAZOFARENJİAL TAŞIYICILIĞI, SEROGRUPLANDIRMA, ANTİBİYOTİKLERE DUYARLILIĞI VE PENİSİLİN DİRENÇLİ SUŞLARININ MOLEKÜLER TİPLENDİRMESİ	
Proje Yürütücüsü ve Yardımcı Araştırmacılar: PROF. DR. BENGÜL DURMAZ PROF. DR. RIZA DURMAZ YRD. DOÇ. MEHMET BAYRAKTAR YRD. DOÇ. MAHMET TAYYAR KALCIOĞLU	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalı 44069, MALATYA	
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi:	
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	
Öz (en çok 70 kelime): <i>Streptococcus pneumoniae</i> genellikle sağlıklı çocukların nazofarenksinde bulunur. Taşıyıcılar, toplumdaki <i>S. pneumoniae</i> infeksiyonunun sirkülasyonunda önemli role sahiptirler. Bu çalışmanın amacı; farklı sosyo-ekonomik koşullara sahip olan sağlıklı ilköğretim çocuklarının nazofarenksinde <i>S. pneumoniae</i> taşıyıcılık oranını tespit etmek, suşların antibiyotik duyarlılık ve serogrup profillerini belirlemek ve taşıyıcılar arasındaki epidemiyolojik ilişkiyi ortaya koymaktır. Doküzyüzdokuz çocuğun posterior nazofarenksinden sürüntü alınmış, çalışma sonucunda bu çocukların 172 (%18,9)'sinde pnömokok taşıyıcılığı saptanmıştır. Taşıyıcılık erkek çocuklarda ve sosyo-ekonomik düzeyi düşük olanlarda daha yüksek bulunmuştur. Suşların sekiz antibiyotiğe duyarlılığı disk difüzyon yöntemiyle araştırılmıştır. Penisilin direnci oksasilin diski ile taranmış, penisilin E test ile doğrulanmıştır. Penisiline orta dirençli suş sayısı 17 (%9,9) olarak belirlenmiştir. Yüksek seviyede penisilin direnci saptanamamıştır. Ko-trimetaksozol ve tetrasiklin direnci sırasıyla %11 ve %4,1'dir. Eritromisin ve klindamisin düşük oranlarda (sırasıyla %4,7 ve %3,5) direnç saptanmıştır. Bütün isolatlar rifampisin, levofloksasin, moksifloksasin ve vankomisin duyarlı bulunmuştur. Kapsül şişme (Quellung) reaksiyonu 154 suşa yapılabilmektedir. Bunların 32 tanesi tiplendirilememiştir. Kalan 122 izolat (tüm isolatların %76,2'si) içinde 14 farklı serogrup tanımlanmıştır. En sık görülen serogruplar sırasıyla 9, 19, 23, 10, 6 ve 18 olarak bulunmuştur. Penisiline orta derecede dirençli 17 suşun da bulunduğu 145 suşa "Arbitrary primed" polimeraz zincirleme reaksiyonu (AP-PZR) çalışıldı. "Pulsed Field Gel Electrophoresis" (PFGE) ise 12'si penisiline orta derecede dirençli olmak üzere toplam 57 suşa uygulanabildi. AP-PZR ile suşların %70,5'i, PFGE ile %44,6'sı epidemiyolojik olarak ilişkili bulundu. Sonuç olarak; Bulunan serogruplar gelecekteki aşıların kapsamı gereken serogruplar hakkında bilgi vermektedir. Malatya'da düşük sosyo-ekonomik durumdaki 7 yaş grubu çocuklar pnömokok taşıyıcılığı açısından yüksek riske sahiptir. Bölgemiz için Penisilin G direnci henüz önemli bir sıkıntı oluşturmamaktadır. Çocukların nazofarenksinde kolonize <i>S. pneumoniae</i> suşları arasında yüksek oranda epidemiyolojik ilişki vardır.	
Anahtar Kelimeler: <i>Streptococcus pneumoniae</i> , nazofarenjial taşıyıcılığı, serotiplendirme, antibiyotiklere duyarlılığı, penisilin dirençli suşlarının, AP-PZR, PFGE	
Projeden Kaynaklanan Yayınlar:	
Bilim Dalı:	☐
Doçentlik Bilim Dalı Kodu:	☐