

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN HAEMOPHILUS INFLUENZAE KÖKENLERİNDE ANTİBİYOTİKLERE DUYARLILIK*

Duygu EŞEL, Nuriye KARACA, Bülent SÜMERKAN

ÖZET

Klinik örneklerden izole edilen 73 *Haemophilus influenzae* kökeninin beta-laktamaz aktiviteleri ve antibiyotik duyarlılıklarları araştırılmıştır. Duyarlılık testleri NCCLS'in önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ile yapılmış, beta-laktamaz aktivitesi ise nitrocefın diskleri kullanılarak araştırılmıştır. İki tip b, bir non-tip b kökende beta-laktamaz aktivitesi pozitif bulunurken, beta-laktamaz negatif ampicilime dirençli kökene rastlanmamıştır. Amoksisin-clavulanat, sefaklor, ofloksasin, lorakarbef ve sefotaksime direnç saptanmamış, suşların 3 (% 4)'ü ampicilime, 11 (% 15)'i ko-trimoksazole, 4 (% 5)'i klaritromicin, 2 (% 3)'si kloramfenikole, 5 (% 7)'i tetrasisikline dirençli bulunmuştur.

SUMMARY

Antibiotic susceptibilities of Haemophilus influenzae strains isolated from clinical specimens.

Seventy-three *Haemophilus influenzae* strains isolated from clinical specimens were examined for beta-lactamase activity and antibiotic susceptibility. The susceptibility tests were performed by the disk diffusion method according to the recommendations of the NCCLS, and the beta-lactamase activity was detected by nitrocefin disks. While the beta-lactamase activity of two type b and one non-type b strains were positive, there was no strain which was beta-lactamase negative and resistant to ampicillin. Three (4 %) strains were found to be resistant to ampicillin, 11 (15 %) to co-trimoxazole, 4 (5 %) to clarithromycin, 2 (3 %) to chloramphenicol, and 5 (7 %) to tetracycline. There was no resistance to amoxicillin-clavulanate, cefaclor, ofloxacin, loracabef and cefotaxime.

GİRİŞ

Haemophilus influenzae sağlıklı kişilerin üst solunum yolu ve genital floralarında normalde bulunabilen bakterilerdir. *Haemophilus* türlerinin üretilmeleri zordur ve zenginleştirilmiş besiyerine ihtiyaç gösterirler. Chapin ve Doern (4) zenginleştirilmiş çikolata agar+basitrasin+vankomisin+klindamisin içeren besiyerinin özellikle karışık örneklerden *Haemophilus* cinsi bakterileri izole etmek için en uygun besiyeri olduğunu bildirmiştir. Aynı çalışmada *Haemophilus* cinsi bakterilerin üremesi için gerekli olan X ve V faktörlerinden V faktörünü inhibe etmemesi yönyle bu besiyerinde koyun kanı yerine at kanı kullanılması önerilmektedir.

H.influenzae konjonktivit, otitis media, toplum kaynaklı pnömoni gibi sık görülen ve kolaylıkla tedavi edilebilen infeksiyonların yanısıra menenjit, perikardit, Brazilian purpu-

* 4. Antimikrobiik Kemoterapi Günleri'nde kısmen sunulmuştur (17-19 Mayıs 1999, İstanbul).

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

ric fever gibi ağır infeksiyonlara da neden olabilir. İnvaziv infeksiyon genellikle 5 yaş alındı ve en çok da 6-7. aylarda görülür. En fazla invazyon yapan serotip *H.influenzae* tip b'dir. Ancak kapsülsüz tiplerin de invazyon yaptığı bilinmemektedir. Yirmi yıl öncesine kadar *Haemophilus* infeksiyonları ampisilin ile tedavi edilirken yaklaşık 20 yıldır ampisilin, penisilin, kloramfenikol, ko-trimoksazol, tetrasiyklin ve rifampisin direnci bildirilmeye başlamıştır (3,6).

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi, Gevher Nesibe Hastanesi Bakteriyoloji Ünitesinde incelenen çeşitli klinik örneklerden izole edilen *H.influenzae* kökenlerinin beta-laktamaz aktivitelerini ve çeşitli antibiyotiklere in-vitro duyarlılık durumunu belirlemek amacıyla yapılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Şubat 1998 - Ekim 1999 arasında Erciyes Üniversitesi, Gevher Nesibe Hastanesi Bakteriyoloji Ünitesinde 33'ü çocuk, 40'ı erişkin hastalara ait klinik örneklerden izole edilen 73 *H.influenzae* kökeni çalışmaya alınmıştır.

Bakterilerin identifikasiyonu için koloni morfolojisi ve Gram boyama özelliklerinin yanı sıra X ve V faktör gereksinimlerine bakılmıştır. Bunun için bakterilerin çikolata agar'daki 24 saatlik saf kültürlerinden % 0.9 serum fizyolojik içinde 0.5 McFarland bulanıklığına eşdeğer süspansiyonlar hazırlanmış, bu süspansiyonlardan steril ekuvyonlar aracılığı ile 150 mm çaplı Mueller-Hinton agar yüzeyine sürülmüştür. Daha sonra besiyeri üzerine basitrasinli X, V ve XV faktörleri içeren 3 disk (Difco) konmuş, 35°C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra sadece XV faktörü içeren disk etrafında üreme gösteren kökenler *H.influenzae* polivalan antiserumu (Difco) ile lam aglutinasyon yöntemiyle karşılaştırılmış ve aglutinasyon veren kökenler tip b antiserumu (Difco) ile de karşılaştırılarak tip b veya non-tip b olarak tiplendirilmiştir. *H.influenzae* polivalan antiserumu ile aglutinasyon vermeyen kökenler çalışma dışı bırakılmıştır. Ayrıca bakterilerin tanımlanmasında BBL Crystal *Neisseria/Haemophilus* ID System (Becton Dickinson, USA) yönteminden de yararlanılmıştır. Beta-laktamaz varlığına nitrosefin (Cefinase, BBL) disk konularak bakılmıştır. Diske sürüldükten sonra 1 dakika içerisinde pembe-kırmızı renk oluşturan kökenler beta-laktamaz pozitif kabul edilmiştir. Nitrosefin disklerini kontrol etmek amacıyla pozitif kontrol olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, negatif kontrol olarak *H.influenzae* ATCC 10211 kullanılmıştır.

Duyarlılık testleri NCCLS (11) standartlarına göre *Haemophilus* Test Medium (HTM) (Oxoid)'da disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Bunun için bakterilerin çikolata agar'daki 20-24 saatlik kültürlerinden 0.5 McFarland bulanıklığına eşdeğer süspansiyonlar hazırlanmış, bu süspansiyonlardan steril ekuvyonlar aracılığı ile 4 mm kalınlığındaki HTM yüzeyine sürülmüş ve 10-15 dakika içinde besiyeri üzerine ampisilin (10 µg), amoksisilin-klavulanat (20/10 µg), sefaklor (30 µg), ofloksasin (5 µg), ko-trimoksazol (1.25-23.75 µg), klaritromisin (15 µg), kloramfenikol (30 µg), sefotaksim (30 µg), tetrasiyklin (30 µg) ve lorakarbef (30 µg) diskleri yerleştirilmiştir. Plaklar % 5 CO₂'li ortamda 35°'de 18 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Zon çapları NCCLS M 100-S8 yorumlama standartlarına göre duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak yorumlanmıştır (12). Kontrol kökeni olarak sefaklor ve lorakarbef için *H.influenzae* ATCC 49766, diğerleri için *H.influenzae* ATCC 49247 kullanılmıştır. Ayrıca HTM'un üretebilme özelliğini kontrol için besiyeri döküldükten sonra *H.influenzae* ATCC 10211 ekilerek üreyip üremedidine bakılmıştır. Bu kökeni üretebilen HTM, test besiyeri olarak kullanılmıştır.

BULGULAR

Kökenlerin izole edildiği klinik örnekler tablo 1'de gösterilmiştir.

Çalışmaya alınan 73 kapsüllü *H.influenzae* kökeninden 47 (% 64)'si tip b, 26 (% 36)'si non-tip b olarak tiplendirilmiştir. İki tip b, biri non-tip b olmak üzere toplam üç (% 4) kökende beta-laktamaz varlığı saptanmıştır.

Kökenlerin antibiyotik duyarlılıklarını tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Yetmiş üç *H.influenzae* kökeninin izole edildiği klinik örneklerde göre dağılımı.

Klinik örnek	Sayı	%
Balgam	37	51
Kulak salgısı	21	29
BOS	7	10
Göz sürüntüsü	3	4
Kan	3	4
Sinüs ponksiyon sıvısı	1	1
Bronkoalveoler lavaj	1	1
Toplam	73	

Tablo 2. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen 73 *H.influenzae* kökeninin antibiyotiklere duyarlılıkları.

Antibiyotik	Duyarlı		Orta duyarlı		Dirençli	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Ampisilin	70	96	-	-	3	4
Amoksisilin-klav. asit	73	100	-	-	-	-
Sefaklor	73	100	-	-	-	-
Oftoksasin	73	100	-	-	-	-
Ko-trimoksazol	59	81	3	4	11	15
Klaritromisin	67	92	2	3	4	5
Kloramfenikol	71	97	-	-	2	3
Sefotaksim	73	100	-	-	-	-
Tetrasiklin	62	85	6	8	5	7
Lorakarbef	71	97	2	3	-	-

Çalışmamızda BOS ve kan örneklerinden izole edilen 10 (% 13) *H.influenzae* kökeninin tamamı çocuk hastalara aittir ve hepsi tip b olarak tiplendirilmiştir.

TARTIŞMA

Çalışılan *H.influenzae* kökenlerinin % 4'ü ampisilin'e dirençli, ancak amoksisilin-klavulanata duyarlı bulunmuştur. Bu kökenlerin beta-laktamaz sentezledikleri nitrosefin diski kullanılarak kanıtlanmıştır. Plazmid aracılı TEM ve ROB beta-laktamazlarının sentezlenmesi *H.influenzae* kökenlerinde penisilinler direncin en önemli sebebidir. Ampisilin direncinin belirlenmesi için en iyi yol TEM-1 beta-laktamaz aktivitesinin gösterilmesidir. ROB-1 enzimi taşıyan kökenlerde rutin laboratuvar koşullarında beta-laktamaz aktivitesi gösterilemez. PCR ile bla_{TEM} ve bla_{ROB-1}'in gösterilmesi bu problemlerin üstesinden gel-

miştir (17). Penisilin direncinde bir diğer mekanizma da penisilin bağlayıcı proteinlerdeki değişikliklerdir. Bu kökenler beta-laktamaz üretmedikleri halde ampisiline dirençlidirler (BLNAR) (3). Bu çalışmada BLNAR köken saptanamamıştır.

Amerika'da 224 kökenle yapılan bir çalışmada kökenlerin % 27'sinde ampisiline direnç saptanmıştır (8). Küçük karaaslan ve ark. (9) bölgelerinde ampisiline direnci % 53 olarak belirlenmiştir. Torun ve ark. (18) çalışmaları 60 kökenin % 26.6'sında beta-laktamaz aktivitesi belirlerken % 5 oranında BLNAR köken saptanmıştır. Ankara'dan bildirilen iki çalışmada beta-laktamaz aktivitesi % 8-12 arasında görülmektedir (15,16). Berkiten ve ark. (1) 81 kökenden sadece birinde beta-laktamaz aktivitesi saptarken, üç kökenin ampisiline dirençli olduğunu bulmuşlardır.

H.influenzae kökenlerinde antibiyotik direnci coğrafi farklılıklar göstermektedir. Örneğin 1986 verilerine göre ampisiline direnç Almanya'da % 1.6 iken İspanya'da % 30.1 bulunmuştur (6). Aynı verilere göre kloramfenikol ve tetrasiklin direnç oranı Almanya'da sırasıyla % 1 ve % 2 iken, İspanya'da bu oranlar sırasıyla % 24 ve % 25 olarak bulunmuştur. Bu durum İspanya'da aşırı antibiyotik kullanımı ile ilişkili bulunmuştur. Çalışmamızda amoksisin-klavulanat, sefaklor, ofloksasin ve sefotaksime direnç bulunmamıştır. Ülkemizde yapılan bazı çalışmalarda düşük oranda ampisilin-sulbaktam ve sefaklora direnç bildirilmiştir (2,5).

H.influenzae kökenlerinde ampisilinden sonra en çok direnç ko-trimoksazole karşı saptanmaktadır (7,13,16,18). Bu çalışmada da ko-trimoksazole direnç % 15 ile birinci sıradadır. Bu durum özellikle solunum yolu infeksiyonlarında ko-trimoksazolun fazla kullanımıyla ilişkili olabilir.

Kloramfenikol ve ampisilin direnci tetrasiklin direnç genlerinin bulunduğu transpozonda yer alabilir ve çoklu dirençten bu transpozisyon sorumludur (10). Bu çalışmada beta-laktamaz sentezleyen iki kökende tetrasiklin ve kloramfenikole de direnç saptanmıştır. Bu bulgu düşük oranda olmakla birlikte yönetimde çoklu dirençli kökenlerin varlığını göstermektedir.

Direnç konusunda yapılan çalışmalarda elde edilen farklı sonuçlar, kullanılan duyarlılık yöntemi, coğrafi yapı ve hasta gruplarındaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir. *H.influenzae* duyarlılığı besiyeri, disk konsantrasyonu ve inokulumdan belirgin biçimde etkilenebilir. Bu nedenle bu bakterilerde duyarlılık çalışmaları standart yöntemlerle yapılmalıdır (14).

Sonuç olarak bölgemizde *H.influenzae* kökenlerinde antibiyotiklere direnç yönünden önemli bir problem olmadığı gözlenmektedir. Bununla birlikte bu infeksiyonlarda tedavinin empirik olduğu dikkate alınırsa, tedavide ko-trimoksazol ve tetrasiklin dışındaki ajanların tercih edilmesi uygun olacaktır.

KAYNAKLAR

- 1- Berkiten R, Bal Ç, Gürol SD: Solunum yolu infeksiyonlarından izole edilen *Haemophilus influenzae* suslarının çeşitli antibiyotiklere in-vitro duyarlılıkları, *ANKEM Derg* 12:20 (1998).
- 2- Berkiten R, Gürol DS: Solunum yolu örneklerinden izole edilen *Haemophilus influenzae* suslarında antibiyotiklere direnç, *ANKEM Derg* 12:492 (1998).
- 3- Campos JM: *Haemophilus*, "PR Murray (ed): *Manual of Clinical Microbiology*, 6. baskı" kitabında s. 556, ASM Press, Washington DC (1995).
- 4- Chapin KC, Doern GV: Selective media for recovery of *H.influenzae* from specimens contaminated with upper respiratory tract microbial flora, *J Clin Microbiol* 17:1163 (1983).

- 5- Çöplü N, Aktepe OC, Uluutku S: Haemophilus influenzae suşlarının in-vitro antibiyotik duyarlılıkları, *ANKEM Derg* 13:87 (1999).
- 6- Jordens JZ, Slack MPE: Haemophilus influenzae: Then and now, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 14:935 (1995).
- 7- Kansak N, Öksüz L, Kaygusuz A, Öngen B, Töreci K: Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis, Streptococcus pyogenes ve Streptococcus pneumoniae suşlarında antibiyotik direnci, *ANKEM Derg* 12:1 (1998).
- 8- Kibsey PC, Rennie RP, Rushton JE: Disk diffusion versus broth microdilution susceptibility testing of Haemophilus species and Moraxella catarrhalis using seven oral antimicrobial agents: application of updated susceptibility guidelines of the National Committee for Clinical Laboratory Standards, *J Clin Microbiol* 32:2786 (1994).
- 9- Küçükkaraaslan A, Kocabeyoğlu Ö, Emekdaş G: Klinik örneklerden Haemophilus cinsi bakterilerin izolasyon sıklığı ve antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması, *İnfeksiyon Derg* 6:87 (1992).
- 10- Levy J, Verhaegen G, de Mol P, Couturier M, Dekegel D, Butzler JP: Molecular characterization of resistance plasmids in epidemiologically unrelated strains of multiresistant Haemophilus influenzae, *J Infect Dis* 168:177 (1993).
- 11- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests*; 6th edition, Approved standard, NCCLS document M2-A6, NCCLS, Wayne Pa (1997).
- 12- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*; eighth informational supplement M100-S8. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Pennsylvania (1998).
- 13- Saydam C, Tünger A, Özinel MA, Tokbaş A: Haemophilus influenzae kökenlerinin serotipleri, beta-laktamaz salgılama özellikleri ve antibiyotik duyarlılıkları, *ANKEM Derg* 10:415 (1996).
- 14- Scriver SR, Hoban DJ, McGeer A, Moore TC, Walmsley SL, Low DE: Surveillance of susceptibility testing methodologies for Haemophilus influenzae in Canada, including evaluation of disk diffusion test, *J Clin Microbiol* 32:2013 (1994).
- 15- Şener B, Gür D, Sümerkan B, Koç AN, Günalp A, Ünal S, Akalın HE: Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis, Streptococcus pneumoniae ve Streptococcus pyogenes'in çeşitli antibiyotiklere karşı in-vitro duyarlılıkları, *Mikrobiyol Bult* 30:129 (1996).
- 16- Şener B, Hasçelik G, Günalp A: Alt solunum yolu infeksiyonlarından izole edilen Haemophilus influenzae suşlarının antimikrobiik maddelere in-vitro duyarlılıkları ve beta-laktamaz aktiviteleri, *İnfeksiyon Derg* 12:55 (1998).
- 17- Tenover FC, Huang MB, Rasheed K, Persing DH: Development of PCR assays to detect ampicillin resistance genes in cerebrospinal fluid samples containing Haemophilus influenzae, *J Clin Microbiol* 32:2729 (1994).
- 18- Torun MM, Alkan EE, Değirmenci ZS: Haemophilus influenzae kökenlerinin antimikrobiik maddelere direnç durumları ve beta-laktamaz aktiviteleri, "4. Antimikrobiik Kemoterapi Günleri" kitabında s. 206, İstanbul (1999).