

SOLUNUM YOLU İNFEKSİYONLARINDAN İZOLE EDİLEN HAEMOPHILUS INFLUENZAE SUŞLARININ ÇEŞİTLİ ANTİBİYOTİKLERE İN-VİTRO DUYARLILIKLARI

Rahmiye BERKİTEN, Çiğdem BAL, Dilara S.GÜROL

ÖZET

Erişkinlerin solunum sistemi örneklerinden izole edilen 81 *Haemophilus influenzae* suşunun nitrosefin diski ile beta-laktamaz aktivitesi, agar dilüsyon yöntemi ile ampisilin, sefaklor, sefuroksim, seftriakson, kloramfenikol ve siprofloksasine duyarlılığı araştırılmıştır. Biri beta-laktamaz pozitif olan üç suş (%3.7) ampisiline dirençli bulunmuş, diğerlerine direnç saptanmamıştır.

SUMMARY

In vitro antibiotic susceptibilities of *Haemophilus influenzae* strains isolated from respiratory tract infections.

Eighty-one *Haemophilus influenzae* strains isolated from respiratory tract specimens were investigated for beta-lactamase activity by nitrocephin disk and antibiotic susceptibility by agar dilution method to ampicillin, cefaclor, cefuroxime, ceftriaxone, chloramphenicol and ciprofloxacin. Three strains (%3.7), one of which was beta-lactamase positive were resistant to ampicillin. No resistance to the other antibiotics was observed.

GİRİŞ

Haemophilus influenzae çocuklarda ve yetişkinlerde solunum yolu infeksiyonlarına neden olan önemli bir patojendir. Pnömonilerde en fazla izole edilen serotip b'dir. Tedavide kullanılan ampisilin ve kloramfenikole karşı gelişen direnç gittikçe artan orandadır. Ampisiline direnç, beta-laktamaz veya kromozomal mutasyonlar sonucu Penisilin Bağlayan Protein(PBP)'lerde meydana gelen değişiklik veya hücre permeabilitesindeki farklılaşma sonucu; kloramfenikole direnç Kloramfenikol Asetil Transferaz (CAT) enzimi ile olmaktadır. Dirençli suşların ortaya çıkması, antibiyotiklerin MİK değerlerinin izlenmesine ve alternatif antibiyotiklerin aranmasına yol açmaktadır (19).

Bu çalışmada erişkin hastaların solunum sistemi infeksiyonlarından izole edilen *H.influenzae* suşlarının beta-laktamaz aktivitesi ve çeşitli antibiyotiklere in-vitro duyarlılıkları araştırılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çeşitli kliniklerden solunum yolu infeksiyonu şüphesi ile gönderilen muayene maddelerinden izole edilen 81 *H. influenzae* suşu incelenmiştir. Suşların 75'i balgam, ikisi burun, dördü trakeal aspirat, bronş lavaj sıvısı, boğaz ve konjunktiva sürüntülerine aittir. Örnekler basitrasimli (300 mg/l) çukulatamsı jeloza ekilerek 37°C'de %5-10 CO₂'li ortamda 24-48 saat bekletilmiş, üreyen bakterilerin *Haemophilus* cinsinden Gram negatif çomaklar olduğu tespit edildikten sonra X ve V faktörlerine olan gereksinimleri ve %5 at kanlı jelozda hemoliz oluşturma özellikleri incelenerek tür tanıları yapılmıştır. Ayrıca beta-laktamaz aktivitesi Nitrosefin Dry Slide (Difco) ile belirlenmiştir.

Duyarlılık deneyi: Bakterilere ampisilin, sefaklor, sefuroksim, seftriakson, kloramfenikol ve siprofloksasinin MİK'ları saptanmıştır. Suşlar deneye kadar gliserinli buyyonda -70°C'de muhafaza edilmiştir (27). Agar dilüsyon yöntemi ile MİK tayini NCCLS kriterlerine göre (20) yapılmıştır. Bu yöntemde, çift kat seri dilüsyonla 0.03-64 µg/ml aralıkta antibiyotik içeren *Haemophilus* Test Medium (HTM) plakları hazırlanmıştır (2,7). Suşlar Mueller-Hinton buyyonda süspansiyon edilip 0.5 McFarland bulanıklığına ulaşana kadar 37°C'de inkübe edilmiş ve sonra 1/10 oranında sulandırılmıştır. 10⁷ cfu/ml bakteri içeren bu süspansiyonlardan standart antibiyotik konsantrasyonlarını içeren HTM plaklarına birer µl (10⁴ cfu) nokta ekimi yapılmış ve plaklar 24 saat 37°C'de %5-10 CO₂'li ortamda inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda her suş için üremenin görülmediği plaktaki antibiyotik konsantrasyonu, o suşun MİK'u olarak kabul edilmiştir. Ampisilin 2 µg/ml, sefaklorun 16 µg/ml, sefuroksimin 8µg/ml, kloramfenikolün 4 µg/ml MİK değerleri orta duyarlılık, daha düşük değerler duyarlılık, daha yüksek değerler direnç işareti olarak alınmıştır. Seftriaksonun ≤ 2 µg/ml, siprofloksasinin ≤ 1 µg/ml değerleri duyarlılık, daha yüksek değerleri direnç olarak değerlendirilmiştir (20). Deneylerde kontrol suş olarak *S.aureus* ATCC 25923, *H.influenzae* ATCC 49766 ve 35056 suşları kullanılmıştır.

BULGULAR

X ve V faktörlerine gereksinim duyan, at kanlı jelozda hemoliz yapmayan 81 suş *H.influenzae* olarak belirlenmiştir. Çalışmaya alınan *H.influenzae* suşları için saptanan MİK değerleri tabloda gösterilmiştir.

Tablo. *H.influenzae* suşları için çeşitli antibiyotiklerin MİK'ları (µg/ml).

Antibiyotik	≤0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64
Ampisilin	11*	10	9	23	16	5	4	2	-	-	-	1**
Sefaklor	-	-	-	-	-	8	26	21	21	5	-	-
Sefuroksim	-	-	3	-	12	24	36	5	1	-	-	-
Seftriakson	36	23	10	6	3	3	-	-	-	-	-	-
Kloramfenikol	1	-	29	28	17	6	-	-	-	-	-	-
Siprofloksasin	81***	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*: Bir suş < 0.03 µg/ml, **: Beta-laktamaz pozitif, ***MİK <0.0015 µg/ml.

Sonuçlara göre 81 suşdan üçü (%3.7) ampisiline dirençli, dördü orta duyarlı bulunmuş; sefaklor, sefuroksim, seftriakson, kloramfenikol ve siprofloksasine direnç saptanmamıştır. Beş suş sefaklor, bir suş sefuroksime orta duyarlı bulunmuştur.

Beta-laktamaz aktivitesi Ağustos 1997'de izole edilen ve ampisilin MİK değeri 64 µg/ml olan bir suşda pozitif bulunmuştur.

TARTIŞMA

Ampisiline dirençli *H.influenzae* suşlarının artışı klinik önemi olan antibiyotiklere direncin izlenmesini zorunlu kılmaktadır. Beta-laktamaz oluşturmaya bağlı direnç genellikle TEM-1 ve çok az suşda ancak PCR yöntemiyle saptanan ROB-1 beta-laktamazları ile oluşur (5). Bu oran sırasıyla %93, %7 düzeyindedir (27). Beta-laktamaz pozitifliği çeşitli faktörlerin yanında yaşa ve mevsime göre de farklılık gösterir. 1996'da ülkemizde bildirilen ve Aralık-Mart aylarını içeren bir çalışmada %5.5 (25), 1997'de Amerika'da yapılan bir çalışmada ilkbahar suşlarında %23, sonbahar, kış suşlarında %8 olarak saptanmıştır (6). Beş yaşından küçüklerde de bu oran yüksektir (6,32). Kanada'da 1992'de %26 (26), 1994'de %28.4 (27), İsveç'te %10 (7), 1995'de Fransa'da %32.1 (3) Belçika'da %23 (4), Amerika'da 1994 de %30 (2), 1997'de %36.4 (6) beta-laktamaz pozitifliği bildirilmiştir.

H.influenzae infeksiyonlarında tercihen ampisilin ve kloramfenikol kullanılır. Fakat beta-laktamaz pozitif (BLP) suşların tümü, beta-laktamaz negatif (BLN) suşların ise bir kısmı ampisiline dirençlidir ve dirençli suş sayısı her geçen gün artan sıklıkla bildirilmektedir. BLN suşlarda direnç, PBP'lerde meydana gelen değişiklik sonucu beta-laktam antibiyotiklere afinitenin azalması ile ortaya çıkar. Kapsülsüz ve BLN suşlar antibiyotiklere daha duyarlıdır. Kapsüllü ve kapsülsüz her iki grupta da artan direnç tedavi başarısını etkilediğinden ve kapsüllü suşların daha dirençli olmaları nedeniyle etkenin özelliklerinin önceden belirlenmesi gerekir. Fakat birçok laboratuvar, özellikle maliyetin yüksek olması nedeniyle bu saptamayı rutin olarak yapamamaktadır. Oysa özellikle ciddi infeksiyonlarda, BLN ve ampisiline dirençli (AR) veya orta duyarlı suşların MİK değerleri belirlenerek tedavi uygulanmalıdır. Bu amaçla kısa sürede sonuç veren E testi uygulanabilir (9,13). BLN-AR suş oranı 1994'de Kanada'da %0.4 (27), Amerika'da %0.1 (%0.8 de orta duyarlı) (2), Asya, Avrupa ve Amerika'da yapılan 11 çalışmanın sonuçlarını değerlendiren bir çalışmada %0-1.6 (12), 1997'de Amerika'da % 2.5 (6) olarak bildirilmiştir. Kronik solunum sistemi infeksiyonu olan hastalardan elde edilen suşların %50'den fazlasının beta-laktam antibiyotiklere direnci, diğer organlardan izole edilenlere göre daha fazladır ve balgamdan izole edilen kapsülsüz bakterilerde BLN-AR suşlara daha sık rastlanmaktadır (11). BLP suşlarda ampisilin MİK değeri, BLN suşların MİK değerinden daha yüksektir (8,10).

Tedavide kullanılan diğer bir antibiyotik kloramfenikoldür. Dirençli suş oranları %0.2 (6), %0.8 (23), %2 (10) gibi çok düşük düzeydedir. Fakat geniş kapsamlı bir çalışmada %0-36 (12) direnç bildirilmiştir.

H.influenzae suşlarına etkili diğer beta-laktamlar sefalosporinlerdir. Birinci kuşak sefalosporinlerin BOS'a geçmemesi nedeniyle menenjitde kullanılamaması, ikinci ve üçüncü kuşak sefalosporinleri üstün kılmaktadır. Direnç artışı olmasına rağmen direncin henüz çok az tespit edildiği sefaklor, özellikle TEM-1 beta-laktamazı üreten suşlara yüksek oranda etkilidir (6,24,27). Sefuroksim ve seftriaksona duyarlılık da yüksektir (6,11,27).

Ülkemizdeki çalışmalar ancak 1990'larda yoğunlaşmıştır. Bildirilen beta-laktamaz pozitiflik oranları %5.8-%23.3 arasındadır (1,14,16,18,21,31). Çalışmamızda 81 suşdan üçünde ampisiline (%3.7) direnç, birinde beta-laktamaz oluşturma saptanmıştır. BLN suşlarda AR oranı %0.6 (21), %2.5 (17), %5 (14,31) gibi oranlarda bildirmiş, çalışmamızda %2.5 olarak bulunmuştur.

Ülkemizde kloramfenikole direnç genel olarak düşük düzeydedir. Yöre, hasta grubuna ve yıllara göre farklılık gösteren dirençli suş oranı 1978'de %1-3 (29,30), 1991'de %15.5 (17), 1995'de %1.6 (21), %1.7 (14), %13.7 (18), 1996'da %7 (16), %0 (25) olarak bildirilmiştir. Bu çalışmada direnç saptanmamıştır.

Sefalosporinlere direnç genellikle düşük düzeydedir. Sefuroksim ve seftriaksona 1994, 1995-1996 yıllarında sırasıyla %8, %8 (31); %17, %15 (15); %18.7, %8.5 (16) oranlarında direnç bildirilmiştir. Mamal ve ark. (18) BLN-AR suşları için sefaklor ve sefuroksim MİK değerlerinin arttığını, diğerleri için değişme olmadığını saptamıştır. Sefaklor (9,14), sefuroksim (14,25) ve seftriaksona (14) direnç saptanmayan çalışmalar çoğunluktadır. Bu çalışmada da bu üç antibiyotige direnç tespit edilmemiştir.

Kinolonlar erişkinlerde gittikçe artan oranda kullanılmaktadır. Bu gruptan siprofloksasin *H.influenzae* suşlarına yüksek oranda etkilidir. Dirençli suş oranı %10'dan az (9,14,15,16,17,28) olmakla beraber, MİK değeri yükselmektedir (31). Bu çalışmada tüm suşlar duyarlı (MİK < 0.0015 µg/ml) bulunmuştur.

KAYNAKLAR

- 1- Bal Ç, Keskin SD, Şalçoğlu M, Berkiten R: Haziran 1993-Nisan 1995 tarihleri arasında solunum yolu örneklerinden izole edilen *Haemophilus influenzae* suşları, "Ö. Anđ. M. Mamal Torun (eds): *Haemophilus influenzae İnfeksiyonları Simpozyumu*", Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No.24, s.169, İstanbul (1995).
- 2- Barry AL, Pfaller MA, Fuchs PC, Packer RR: In vitro activities of 12 orally administered antimicrobial agents against four species of bacterial respiratory pathogens from U.S. Medical Centers in 1992 and 1993, *Antimicrob Agents Chemother* 38: 2419 (1994).
- 3- Boulesteix J, Begue P, Dubreuil C, Megraud F, Dabernat H, Geslin P, de La Rocque F, Trinh A: Acute otitis media in children: A study of nasopharyngeal carriage of potential pathogens and therapeutic efficacy of cefixime and amoxicillin-clavulanate, *Infection* 23 (Suppl 2): 79 (1995).
- 4- Crokaert F, Aoun M, Duchateau V, Grenier P, Vandermies A, Klustersky J: In vitro activity of trovafloxacin (cp-99,2199), sparfloxacin, ciprofloxacin, and fleroxacin against respiratory pathogens, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 15: 696 (1996).
- 5- Daum RS, Murphey-Corb M, Shapira E, Dipp S: Epidemiology of ROB β -lactamase among ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* isolates in the United States, *J Infect Dis* 157: 450 (1988).
- 6- Doern GV, Brueggemann AB, Pierce G, Preston Holley H, Rauch A: Antibiotic resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae* in the United States in 1994 and 1995 and detection of β -lactamase-positive strains resistant to amoxicillin-clavulanate: Results of a National Multicenter Surveillance Study, *Antimicrob Agents Chemother* 41: 292 (1997).
- 7- Forsgren A, Walder M: Antimicrobial susceptibility of bacterial isolates in south Sweden including a 13-year follow-up study of some respiratory tract pathogens, *APMIS* 102: 227 (1994).
- 8- Fuchs PC, Barry AL: Interpretive criteria for susceptibilities of *Haemophilus influenzae* to ampicillin, amoxicillin and amoxicillin-clavulanic acid, *J Clin Microbiol* 32: 2846 (1994).

- 9- Gür D, Şener B, Sümerkan B, Koç N, Ünal S: Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis ve Streptococcus pneumoniae'ye karşı çeşitli antibiyotiklerin in-vitro etkinliği, *ANKEM Derg* 9: 115 (1995).
- 10- Heelan JS, Chesney D, Guadagno G: Investigation of ampicillin-intermediate strains of Haemophilus influenzae by using the disk diffusion procedure and Current National Committee for Clinical Laboratory Standards Guidelines, *J Clin Microbiol* 30:1674 (1992).
- 11- James RA, Hossain FK, Lewis DA, White DG: β -lactam susceptibility of Haemophilus influenzae strains showing reduced susceptibility to cefuroxime, *J Antimicrob Chemother* 32: 239 (1993).
- 12- Jorgensen JH: Update on mechanisms and prevalence of antimicrobial resistance in Haemophilus influenzae, *Clin Infect Dis* 14: 1119 (1992).
- 13- Jorgensen JH, Howell AW, Maher LA: Quantitative antimicrobial susceptibility testing of Haemophilus influenzae and Streptococcus pneumoniae by using the E-Test, *J Clin Microbiol* 29: 109 (1991).
- 14- Kaygusuz A, Özalp M, Öngen B, Gürler N, Töreci K: İstanbul'da çocuk hastalardan izole edilen Haemophilus influenzae ve Haemophilus parainfluenzae suşlarında antibiyotiklere direnç, *ANKEM Derg* 9: 47 (1995).
- 15- Kocabeyoğlu Ö, Birinci İ, Koşan E, Fidan A, Diler M: Haemophilus cinsi bakterilerin sefalosporin ve kinolon grubu bazı antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması, *ANKEM Derg* 9: 115 (1995).
- 16- Kocabeyoğlu Ö, Birinci İ, Koşan E: Haemophilus influenzae suşlarında beta-laktamaz aktivitesi ve çeşitli antibiyotiklere duyarlılık, *ANKEM Derg* 10: 119 (1996).
- 17- Küçükkaaraşlan A, Kocabeyoğlu Ö, Emekdaş G: Klinik örneklerden Haemophilus cinsi bakterilerin izolasyon sıklığı ve antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması, *İnfeksiyon Derg* 5: 181 (1991).
- 18- Mamal Torun M, Özgenç R, Aşırdizer S, Altınkuş SM, Alkan E, Köksal S, Demir H: Haemophilus influenzae'nin antibiyotiklere duyarlılığı "Ö Anğ, M Mamal Torun (eds): *Haemophilus influenzae İnfeksiyonları Simpozyumu*", Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No: 24, s. 140, İstanbul (1995).
- 19- MacGowan AP, Brown NM, Holt HA, Lovering AM, McCulloch SY, Reeves DS: An eight-year survey of the antimicrobial susceptibility patterns of 85.971 bacteria isolated from patients in a District General Hospital and The Local Community, *J Antimicrob Chemother* 31: 543 (1993).
- 20- National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically, 2. baskı, *Approved Standard Document M7 A2*, Villanova (1990).
- 21- Öngen B, Kaygusuz A, Küçükbasmacı Ö, Gürler N, Töreci K: İstanbul'da çocuk hastalardan izole edilen Haemophilus influenzae suşlarında antibiyotik direnci, "Ö Anğ, M Mamal Torun (eds): *Haemophilus influenzae İnfeksiyonları Simpozyumu*", Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No: 24, s.174, İstanbul (1995).
- 22- Picard M, Malouin F: Molecular basis of the efficacy of cefaclor against Haemophilus influenzae, *Antimicrob Agents Chemother* 36: 2569 (1992).
- 23- Powel M, Fah YS, Seymour A, Yuan M, Williams JD: Antimicrobial resistance in Haemophilus influenzae from England and Scotland in 1991, *J Antimicrob Chemother* 29: 547 (1992).
- 24- Powell L, Williams JD: In-vitro activity of cefaclor, cephalixin and ampicillin against 2453 clinical isolates of Haemophilus influenzae, *J Antimicrob Chemother* 21:27 (1988).
- 25- Saydam C, Tünger A, Özinel MA, Tokbaş A: Haemophilus influenzae kökenlerinin serotipleri, beta-laktamaz salgılama özellikleri ve antibiyotiklere duyarlılıkları, *ANKEM Derg* 10: 415 (1996).

- 26- Scriver SR, Low DE, Simor AE, Toye B, McGeer A, Jaeger R, and Canadian Haemophilus Study Group: Broth microdilution testing of Haemophilus influenzae with Haemophilus test medium versus lysed horse blood broth, *J Clin Microbiol* 30: 2284 (1992).
- 27- Scriver SR, Walmsley SL, Kau CL, Hoban DJ, Brunton J, McGeer A, Moore TC, Witwicki E, Canadian Haemophilus Study Group, Low DE: Determination of antimicrobial susceptibilities of canadian isolates of Haemophilus influenzae and characterization of the β -lactamases, *Antimicrob Agents Chemother* 38: 1678 (1994).
- 28- Şener B, Gür D, Sümerkan B, Koç AN, Günel A, Ünal S, Akalın HE: Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis, Streptococcus pneumoniae ve Streptococcus pyogenes'in çeşitli antibiyotiklere karşı in-vitro duyarlılıkları, *Mikrobiyol Bült* 30: 129 (1996).
- 29- Töreci K, Çetin ET, Anđ Ö: Antibiotic susceptibility of 7726 bacterial strains isolated from clinical specimens, "W Siegenthaler, R Lüthy (eds): *Current Chemotherapy: Proceedings of the 10th International Congress of Chemotherapy*" Vol I, s.553, Am Soc Microbiol, Washington (1978).
- 30- Töreci K, Çetin ET, Anđ Ö, Kasımoğlu Ö: 1976-1977 yıllarında muayene maddelerinden izole edilen 11385 bakteri suşunun kemoterapötiklere duyarlılıkları, *XVIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Rapor ve Ana konuları kitabı* s.70, İstanbul (1978).
- 31- Vahapođlu H, Mülazımoğlu L, Yıldırım İ, Avkan V, Taşer B, Erdem I: Nasopharyngeal carriage rate and antimicrobial resistance of Haemophilus influenzae in Istanbul-Türkiye, *Marmara Med J* 7: 78 (1994).
- 32- Weightman N, Barnham M: Seasonal variation in incidence of β -lactamase production of Haemophilus influenzae isolated from sputa in community-acquired lower respiratory tract infections, 20. ICC, Final Programme and Book of Abstracts, s.156, Sydney (1997).