

HAEMOPHILUS INFLUENZAE SUŞLARININ İN-VİTRO ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARI

Nilay ÇÖPLÜ, Orhan C. AKTEPE, Selda ULUUTKU

ÖZET

Çocuk hasta grubu alt solunum yolları infeksiyonlarından izole edilen 64 *Haemophilus influenzae* suşunun buyyonda mikrodilüsyon yöntemi ile in-vitro duyarlılıkları siprofloksasin için % 100, kloramfenikol için % 84, sefotaksim ve sefaklor için % 81, ampisilin için % 37.5 olarak bulunmuştur. Ampirik tedavinin alışlagelmiş seçeneği olan ampisiline karşı duyarlılık oldukça düşük bulunmuştur. Diğer antibiyotiklerin duyarlılık oranları ise bu bakteri ile oluşan infeksiyonlarda etkili bir terapötik olarak kullanılacaklarını düşündürmüştür.

SUMMARY

In-vitro antibiotic susceptibilities of Haemophilus influenzae isolates.

The frequency of susceptibilities of 64 *Haemophilus influenzae* isolates from lower respiratory tract infections in childhood were found to be 100% for ciprofloxacin, 84% for chloramphenicol, 81% for cefotaxime and cefaclor, 37.5% for ampicillin by broth microdilution method. The susceptibility for ampicillin which is the first choice drug for empiric therapy has been found very low. The susceptibility ratios of other antibiotics showed that they can be used as therapeutic agents in infections caused by this bacterial species.

GİRİŞ

Haemophilus influenzae özellikle çocukluk yaş grubunda olmak üzere, hemen her yaşta ılımlıdan ciddi seyirliye değişen bir spektrumda infeksiyonlara neden olmaktadır. Özellikle çocukluk dönemi infeksiyonlarının kısa sürede fataliteye yol açabilmesi, hızlı tedavi yaklaşımlarını önemli kalmaktadır. Yirmibeş yıl öncesine kadar *H. influenzae* infeksiyonlarının tamamı ampisilin ile tedaviye yanıt verirken, bugün hızla artan oranda dirençli suşlar saptanmaktadır (2,3). Ampisiline dirençli *H. influenzae* suşları ilk olarak 1972'de bildirilmiş, 1980'de penisilin bağlayan proteinlerde yapısal değişiklik sonucu tüm beta-laktam antibiyotiklere direnç geliştirdiği gösterilmiştir (4).

Tedavinin yönlendirilmesinde antibiyotik duyarlılık testlerinin önemi büyüktür. Bu testler çok farklı tekniklerle yapılmaktadır. En sık kullanılanlar disk difüzyon, agar dilüsyon, buyyonda mikrodilüsyondur (3). Bu çalışmada ülkemizde sık kullanılan buyyonda mikrodilüsyon yöntemiyle, klinik örneklerden izole edilen *H. influenzae* suşlarının in-vitro antibiyotik duyarlılıklarının saptanması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Alt solunum yolu infeksiyonlarından izole edilen 64 *H. influenzae* suşu çalışma kapsamına alınmıştır. Suşların izole edildiği hastalar 4 ay - 17 yaş grubunda olup, ortalama yaş 7.3'dür. Bu hastalar Hacettepe Üniversitesi Pediatrik Göğüs Hastalıkları Bölümünde takip

edilen hastalar olup % 52'si (33/64) kistik fibrozislidir. *H. influenzae* suşları zenginleştirilmiş Columbia agardan izole edilip X ve V faktör (Difco) gereksinimleri ve biyokimyasal reaksiyonları ile identifiye edilip, polivalan antiserumlarla (Difco) doğrulanmıştır (2).

Antibiyotikler siprofloksasin, kloramfenikol, sefotaksim, sefaklor ve ampisilin olarak belirlenmiştir. Antibiyotikler, başkanlığımız İlaç ve Kozmetikler Müdürlüğünden potansi bilinen toz şeklinde alınmıştır. Stok solüsyonlar 1280 µg/ml antibiyotik içerecek şekilde hazırlanmış ve NCCLS tarafından belirlenen kriterlere uyulmuştur (14).

Besiyeri olarak Ca-Mg içeren Mueller-Hinton (MH) buyyonuna sığır hematini 15 µg/ml, β-NAD (15 µg/ml) ve maya özeti (5 mg/ml) miktarlarda eklenmiş olarak kullanılmıştır. Deneylerde inokulum, bakterilerin 35°C'de CO₂'li ortamda bir gecelik çikolata agar kültürlerinden MH buyyona ekilip 4-6 saatlik inkübasyondan sonra 10⁵ cfu/ml olacak şekilde dilüe edilmesiyle hazırlanmıştır. *H. influenzae* ATCC 49247 suşu kontrol amacıyla çalışma kapsamına alınmıştır (14).

Steril mikrodilüsyon plaklarında antibiyotikler son konsantrasyon 128-0.06 µg/ml'ye kadar ikiye kat azalacak şekilde sulandırılmıştır. Her suş için inokulum ve buyyon kontrol çukurları ayrılmıştır. İnokulum eklendikten sonra plakların yüzeyi parafin film ile kapatılarak 18-24 saat inkübe edilmiştir. Her sıra için görülebilir şekilde üremenin inhibe olduğu (turbiditenin izlenmediği) en düşük konsantrasyon o antibiyotiğin o izolat için minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) olarak kabul edilmiştir (14).

Duyarlı suşlar değerlendirilirken NCCLS'de belirtilen "breakpoint" değerleri esas alınmıştır (14).

BULGULAR

H. influenzae suşlarının buyyonda mikrodilüsyon yöntemiyle saptanan beş antimikrobik için duyarlılık yüzdeleri ve MİK değerleri tabloda sunulmuştur.

Tablo. 64 *H. influenzae* suşunun buyyonda mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenen duyarlılıkları.

Antibiyotikler	MİK sınırları (µg/ml)	MİK ₅₀ / MİK ₉₀ (µg/ml)	Duyarlılık (%)
Siprofloksasin	0.06-1	0.06/0.25	100
Kloramfenikol	0.06-16	0.5/4	84
Sefotaksim	0.06-64	0.06/8	81
Ampisilin	0.06-128	2/16	37.5
Sefaklor	0.12-128	1/16	81

Ampisilin % 37.5 ile en düşük etkinliğe sahiptir. MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri açısından incelendiğinde ampisilin 2 ve 16 µg/ml ile en yüksek konsantrasyonlara sahiptir ve bu bulgu duyarlılık oranındaki düşüklükle uyumludur. Tüm izolatlar siprofloksasine duyarlı bulunmuş, siprofloksasinin 0.06-0.25 µg/ml olan MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri de çalışılan beş antibiyotik içinde en düşük konsantrasyonlar olmuştur. Diğer antibiyotiklere karşı % 80'in üzerinde duyarlılık saptanmıştır.

TARTIŞMA

H. influenzae klinik izolatlarında çeşitli antibiyotiklere karşı artan direnç in-vitro duyarlılık testlerine ilgiyi arttırmıştır (10). Beta-laktamaz üreten suşların bildirilmesiyle bu ihtiyaç belirginleşmiştir (2). Beta-laktamaz üretimi TEM-1 tipi ya da ROB-1 tipi beta-laktamaz enzimi ile olmaktadır. Beta-laktamaz üreten suşlarda tüm beta-laktam antibiyotiklere direnç söz konusu olabilmektedir. Dirençten sorumlu bir başka mekanizma ise penisilin bağlayan proteinlerdeki değişimdir (3). Antibiyotik duyarlılık testleri öncelikle izole edilen mikroorganizmanın in-vitro duyarlılığını belirlemek için yapılmaktadır. Ancak epidemiyolojik veriler mikrobiyoloji laboratuvarından ayrıntılı raporların alınmadığı durumlarda ampirik tedavide yol göstericidir. Bu çalışma da epidemiyolojik veriler elde etmek için planlanmış olup özellikle ampisilinde mekanizmasına bakmaksızın toplam direnci saptamak hedeflenmiş, bu nedenle beta-laktamaz oluşturma aranmamıştır.

Suşlarımız siprofloksasine % 100 duyarlılık göstermiştir (MİK₉₀ 0.25 µg/ml) ve bu oran ampirik tedavi için uygun bir seçenek olduğunu göstermektedir. Kloramfenikol, sefotaksim ve sefaklor % 80'in üzerinde duyarlılık saptanmıştır. Bu oranlar bu antibiyotiklerin tedavide başarılı olabileceklerini göstermektedir. Ampisilin % 37.5 duyarlılık (MİK₉₀ 16 µg/ml) ile beklenenden de düşük bir oran göstermiştir.

Yurt içi ve yurt dışında, 1990-1998 yılları arasında yapılmış olan diğer çalışmalar incelendiğinde siprofloksasin için duyarlılığın % 100 (7), MİK₉₀ değerinin ise 0.03-0.047 µg/ml arasında (3,5) olduğu anlaşılmaktadır. Kloramfenikol duyarlılık oranları % 93-100 arasında (6,9,15,16,18,19,20), MİK₅₀ 0.25-0.50 µg/ml, MİK₉₀ 0.25-2 µg/ml (3,13,17) arasında değişmektedir. Sefotaksim duyarlılığı % 100 (10,20), MİK₅₀ 0.015-0.125 µg/ml, MİK₉₀ 0.01-0.75 µg/ml (5,13,17) arasında, sefaklor duyarlılığı % 93-100 (6,7,9,13,18,20), MİK₅₀ 1-4 µg/ml, MİK₉₀ 6-32 µg/ml (1,3,11,12,17,22) arasında bildirilmektedir. Bu veriler elde ettiğimiz sonuçlarla uyumludur.

Ampisilin ile yapılan çalışmalar incelendiğinde ise MİK₅₀ değerinin 0.25-0.75 µg/ml, MİK₉₀ değerinin 1-64 µg/ml arasında değiştiği görülmektedir (3,5,8,13,17,22). Sonuçlarımızda bu değerler 2 ve 16 µg/ml olarak daha önce yapılan çalışmaların çoğunluğuyla uyumlu bulunmuştur. Yurt dışında yapılmış çalışmalarda duyarlılık oranları % 86-100 arasında bildirilmektedir (6,9,18,20). Türkiye'de yapılmış bazı çalışmalarda ise duyarlılık oranının % 47.5-92 arasında değiştiği saptanmıştır (7,18,19,21). Çalışmamızda duyarlılık % 37.5 olarak diğer çalışmalardan belirgin şekilde düşük bulunmuştur. Veriler incelendiğinde duyarlılık sınırı olan 1.0 µg/ml ve altında MİK değeri veren 24 suş saptanırken MİK değeri 2 µg/ml olan 17 suş saptanmıştır. Bu suşlar "intermediate" gruba dahildir ve bu durumda dirençli suşlar tüm izolatların % 36'sını oluşturmaktadır. Bu çalışmada kullanılan suşlar tek bir merkezden izole edilmiş olup çoğunluğu kistik fibrozisli hastalardandır. Kistik fibrozisde antibiyotik kullanımı sıkça gerekebilmektedir. Bu hastalar büyük olasılıkla daha önce ampisilin kullanmışlardır. Ayrıca hastane ortamında dirençli suşların oranının artabileceği de göz önünde tutulmalıdır. Ampisilin direncinin yüksek bulunmasının bu nedenlerle olabileceği düşünülmüştür.

Tüm veriler göz önünde tutularak değerlendirildiğinde, başta siprofloksasin olmak üzere kloramfenikol, sefotaksim ve sefaklor tedavide başarılı olabilirken, ampisilin iyi bir seçenek olmadığı düşünülebilir. Ancak *H. influenzae* infeksiyonlarının ciddiyeti de göz önünde tutulduğunda ampirik yaklaşımla yetinmemek, tedaviye antibiyotik duyarlılık testleri sonuçlarına göre yön vermek gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- 1- Aytuğ Ş, Tünger A, Çavuşoğlu C, Özkan F, Özinel M A: Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae ve Moraxella catarrhalis kökenlerinin antibiyotik duyarlılıkları, *XXVIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi*, Özet kitabı 12-171, Antalya (1998).
- 2- Campos J M: Haemophilus, "Murray P R, Baron E J, Pfaller M A, Tenover F C, Tenover R H (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, 6. baskı" kitabında s. 556, Am Soc Microbiol, Washington DC (1995).
- 3- Doern G V, Brueggemann A B, Pierce G, Holley H P Jr, Rauch A: Antibiotic resistance among clinical isolates of Haemophilus influenzae in the United States in 1994 and 1995 and detection of beta-lactamase-positive strains resistant to amoxicillin-clavulanate: Results of a national multicenter surveillance study, *Antimicrob Agents Chemother* 41: 292 (1997).
- 4- Doern G V, Jones R N: Antimicrobial susceptibility testing of Haemophilus influenzae, Branhamella catarrhalis, and Neisseria gonorrhoeae, *Antimicrob Agents Chemother* 32: 1747 (1988).
- 5- Dornbusch K, Göransson E, Mörtzell E: Susceptibility testing of respiratory tract pathogens using a new technique, the E test, *30th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAC)*, Poster no. 1071, Atlanta (1990).
- 6- Giger O, Mortensen J E, Clark R B, Evingelista A: Comparison of five different susceptibility test methods for detecting antimicrobial agent resistance among Haemophilus influenzae isolates, *Diagn Microbiol Infect Dis* 24: 145 (1996).
- 7- Gür D, Şener B, Sümerkan B, Koç N, Ünal S, Akalın H E: In vitro activity of Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis and Streptococcus pneumoniae, *19th International Congress of Chemotherapy*, Poster no. 2234, Montreal (1995).
- 8- Hasegawa U, Uchino U, Himuoraka H, Kobayashi I, Kaneko A, Sasaki J, Iwata S: Evaluation of a new quantitative antimicrobial susceptibility test. Application for Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae strains, *Jap J Chemother* 3: 630 (1995).
- 9- Hryniewicz W, Tyski S, Riedl V, Palotai T: Surveillance of antibiotic resistance of Haemophilus influenzae in Poland, *18th International Congress of Chemotherapy*, Abstract No. 158, Stockholm (1993).
- 10- James H J, Howel A W, Maher L A: Quantitative antimicrobial susceptibility testing of Haemophilus influenzae and Streptococcus pneumoniae by using the E-test, *J Clin Microbiol* 29: 109 (1991).
- 11- Jones R: Can antimicrobial activity be sustained? *Diagn Microbiol Infect Dis* 27: 21 (1997).
- 12- Jones R N, Jacobs M R, Washington J A, Pfaller M A: A 1994-95 survey of Haemophilus influenzae susceptibility to ten orally administered agents, *Diagn Microbiol Infect Dis* 27: 75 (1997).
- 13- Moloney A C, Fogarty J, Clarke P, Musser J M: Invasive Haemophilus influenzae in the Republic of Ireland, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 16: 377 (1997).
- 14- National Laboratory for Clinical Laboratory Standards: *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically*, 3. baskı, Approved Standards M7-A3, NCCLS, Wayne Pa (1993).
- 15- Ndoyo J, Siopathis R M, Klugman K P, Wasas A: Antibiotic resistance among nasopharyngeal isolates of Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae-Bangui, *JAMA* 277: 621 (1997).

- 16- Özalp M, Anadol D, Kiper N, Gür D: Haemophilus influenzae ve Streptococcus pneumoniae suşlarında antibiyotik direnci, *VIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi*, Özet kitabı s. 723, Antalya (1997).
- 17- Perez M J, Lozano M C, Aretio M R, Aller A, Martin E: Evaluation of the E-test for the determination of in vitro sensitivity of Haemophilus influenzae and Moraxella catarrhalis, *6th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, Poster no. 420, Seville (1993).
- 18- Sidorenko S V, Navashin S M, Speranskaya O N: Resistance patterns of Haemophilus influenzae and Staphylococcus aureus in Russia, *6th International Congress for Infectious Diseases*, Poster no. 487, Prague (1994).
- 19- Şener B, Haşçelik G, Günalp A: Haemophilus influenzae suşlarının antimikrobik maddelere in-vitro duyarlılıkları ve beta-laktamaz aktiviteleri, *VIII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi*, Poster no. N9, Antalya (1997).
- 20- Thege M K, Riedl V, Ban E, Arr U, Fodor T, Szeness A, Nagy E: Resistance of Haemophilus influenzae and Staphylococcus aureus in Hungary, *6th International Congress for Infectious Diseases*, Poster no. 486, Prague (1994).
- 21- Torun M M: Antibiyotik duyarlılık testlerinde sorunlar: Haemophilus, *Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu Toplantısı* kitabı s. 23, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti, İstanbul (1997).
- 22- Yeo S F, Chiew Y F, Fung C P: Susceptibility of Haemophilus influenzae isolates with known resistance mechanisms to five cephalosporins, *Chemotherapy* 42: 85 (1996).