

# SOLUNUM YOLU İNFEKSİYONLARINDAN İZOLE EDİLEN HAEMOPHILUS INFLUENZAE SUŞLARI VE ÇEŞİTLİ ANTİMİKROBİK MADDELERE DİRENÇ\*,\*\*

Rahmiye BERKİTEN, S. Dilara GÜROL

## ÖZET

Ocak-Aralık 1999 arasında solunum sistemi örneklerinden izole edilen 100 *Haemophilus influenzae* suşu incelenmiştir. Kapsül tip tayini a ve b antiserumları (Difco) ile,  $\beta$ -laktamaz aktivitesi nitrosefin diski ile belirlenmiş; biyotip tayini için indol, üreaz ve ornitin dekarboksilaz özellikleri saptanmıştır. Ampisilin ve grepafloksasin MİK değerleri E-test (AB Biodisk, İsveç); ampisilin-sulbaktam, sefaklor, sefuroksim, seftriakson, klo-ramfenikol ve kotrimoksazol duyarlılığı NCCLS önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Suşların 36'sı serotip b, 12'si serotip a olarak bulunmuş, 52'sinin bu iki serotipten olmadığı saptanmıştır. En çok rastlanan biyotipler I ve V olmuştur. Suşların 80'i denenen tüm antimikrobiklere duyarlı, ikisi ampisiline, biri ampisilin ve kotrimoksazole, 15'i kotrimoksazole dirençli, ikisi de kotrimoksazole dirençli, sefaklor orta duyarlı bulunmuştur. Ampisiline dirençli üç suşun  $\beta$ -laktamaz oluşturduğu saptanmıştır.

## SUMMARY

*Respiratory tract isolates of Haemophilus influenzae and their resistance to various antimicrobials.*

A total of 100 *Haemophilus influenzae* clinical isolates were obtained between January and December 1999, from patients with respiratory tract infections. Capsule typing was performed by using antisera a and b (Difco).  $\beta$ -lactamase activity was detected by nitrocefin disk. Biotypes were determined according to the results of the indole, urease and ornithine decarboxylase tests. MIC's of ampicillin and grepafloxacin were determined by standard E-test (AB Biodisk, Sweden). Ampicillin+sulbactam, cefaclor, cefuroxime, ceftriaxone, chlórampfenicol and cotrimoxazole susceptibility tests were performed according to NCCLS guidelines by disk diffusion tests. 36 strains were found to be serotype b, 12 strains to be serotype a, 52 strains not to be a or b serotypes. Biotype I and V strains were more frequent. 80 strains were found to be sensitive to all antimicrobials tested. Two strains were resistant to ampicillin, one strain to ampicillin and cotrimoxazole, 15 strains to cotrimoxazole. Two strains were resistant to cotrimoxazole and moderately sensitive to cefaclor. Ampicillin resistant three strains produced  $\beta$ -lactamase.

## GİRİŞ

*H. influenzae* en sık rastlanan üç pnömoni etkeninden biridir ve çoğu ülkede ilk sırayı alır. Hastanelerde ventilatöre bağlı ve immun yetmezliği olan hastalarda gelişen pnömonilerde, 3 ay-3 yaş arası bebeklerde gelişen menenjitlerde sıklıkla etkindir. *H. influenzae* tip

\* 9th International Congress on Infectious Diseases (ICID)'de sunulmuştur (10-13 Nisan 2000, Buenos Aires).

\*\* İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir (Proje No:1240/181298).

İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çapa, İstanbul.

b (Hib) daha çok invaziv infeksiyonlardan izole edilirken, diğer tipler (a,c,e,f) gerek erişkin, gerekse çocuklarda çeşitli hastalıklara yol açarlar. Ayrıca kapsülsüz tiplerin invazyon yaptığı bilinmektedir. Sekiz (I-VIII) biyotipi vardır (11). Coğrafik dağılım bakımından farklılık gösteren serotip ve biyotipler izolasyon kaynağı, antijen yapısı ve antibiyotiklere direnç gibi çeşitli özellikleri belirlemede epidemiyolojik öneme sahiptir.

Tedavide başta ampisilin olmak üzere, ikinci ve üçüncü kuşak sefalosporinler, siprofloksasin ve ofloksasin gibi çeşitli antibiyotikler kullanılır. Ancak etkili antibiyotığın antibiyogramla seçilmesi tercih edilmelidir. Çalışmamızda solunum yolu infeksiyonlarından izole edilen *H.influenzae* suşlarının serotip ve biyotip özellikleri,  $\beta$ -laktamaz aktiviteleri ve sekiz antibiyotiğe duyarlılıkları araştırılmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

Ocak-Aralık 1999 arasında solunum sistemi şikayeti (biri konjunktivit) bulunan erişkin hastalardan alınan örnekler klasik yöntemlerle incelenmiş, izole edilen 100 *H.influenzae* suşunun  $\beta$ -laktamaz aktivitesi nitrosefin diskleri ile (Difco), serotip a ve b sıklığı monovalan antiserumlarla (Difco) belirlenmiş; indol, üreaz ve ornitin dekarboksilaz özellikleri saptanarak biyotiplendirim yapılmıştır (11).

Ampisilin ve grepafloksasin MİK değerleri E-test (AB Biodisk, İsveç) ile firmanın önerileri doğrultusunda; ampisilin+sulbaktam, sefaklor, sefuroksim, seftriakson, kloramfenikol ve kotrimoksazol duyarlılığı NCCLS önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır (14). *H.influenzae* ATCC 49766 ve ATCC 49247, *E.coli* ATCC 25922 kontrol suşları olarak kullanılmıştır.

## BULGULAR

Yüz *H.influenzae* suşunun 94'ü balgam, üçü bronş lavaj sıvısı, bireri boğaz, burun ve konjunktiva sürüntülerinden izole edilmiştir.

Balgamdan izole edilen 3 suş  $\beta$ -laktamaz pozitif bulunmuştur. Suşların 36'sı serotip b (Hib), 12'si serotip a olarak saptanmış, 52 suş a ve b antiserumları ile reaksiyon vermemiştir (Tablo 1). En fazla rastlanan biyotipler biyotip I ve biyotip V olmuştur (Tablo 2). Suşların 80'i denenen tüm antimikrobiklere duyarlı, 11'i Hib olmak üzere kalan 20 suştan 15'i kotrimoksazole, ikisi ampisiline, biri ampisilin ve kotrimoksazole dirençli, ikisi ise kotrimoksazole dirençli, sefaklor orta duyarlı bulunmuştur (Tablo 3). MİK sınırları ampisilin için 0.0125-6  $\mu\text{g/ml}$  (üç suşta  $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ ), grepafloksasin için 0.003-0.0047  $\mu\text{g/ml}$  olarak saptanmıştır.

Tablo 1. 100 *H.influenzae* suşunda  $\beta$ -laktamaz üretimi ve serotip dağılımı.

Serotip	$\beta$ -laktamaz	
	(+)	(-)
Serotip b (n:36)	3	33
Serotip a (n:12)	0	12
a ve b dışı (n:52)	0	52

Tablo 2. *H.influenzae* suşlarının biyotip dağılımı.

Serotip	Biyotip							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Hib (n:36)	19*	5**	2	1	2	7	0	0
Hib dışı (n:64)	27	5	9	9	13	1	0	0
Toplam (n:100)	46	10	11	10	15	8	0	0

\*Biri konjunktiva salgısı, \*\* ikisi bronş lavaj sıvısından.

Tablo 3. 100 *H.influenzae* suşunda antimikrobiklere direnç.

Antimikrobik	Direnç (n=%)
Ampisilin	3*
Ampisilin + sulbaktam	0
Sefaklor	2**
Sefuroksim	0
Seftriakson	0
Kloramfenikol	0
Grepafloksasin	0
Kotrimoksazol	18***

\*  $\beta$ -laktamaz pozitif, biri kotrimoksazole de dirençli.

\*\* Orta duyarlı ve kotrimoksazole de dirençli.

\*\*\* Biri ampisiline de dirençli, ikisi sefaklorlara orta duyarlı.

## TARTIŞMA

Ampisilin *H.influenzae* infeksiyonlarının ampirik tedavisinde önerilen ilk seçenektir. Ancak dirençli suşların ortaya çıktığı 1972 yılından beri yaşanan tedavi başarısızlıkları, dikkatleri genelde birbirine paralel bulunan  $\beta$ -laktamaz pozitifliği ve ampisilin direnci üzerine çekmiştir. Coğrafik bölgeye, infeksiyon yerine ve izole edildiği mevsime göre farklılık gösteren  $\beta$ -laktamaz pozitifliği Suudi Arabistan'da (1) % 13.2, Portekiz'de (2) % 11.2, Amerika'da (7) % 31.1, Macaristan ve Slovakya'da (16) % 4-75 gibi oldukça farklı oranlarda bildirilmiştir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise Saydam ve ark.(17) % 5.5; Berkiten ve Gürol (4) burun ve balgamdan izole edilen suşlarda sırasıyla % 14 ve % 8, diğer çalışmalarında (5) % 1.8, Öngen ve ark. (15) % 4; Kansak ve ark.(9) % 0, Kaygusuz ve ark.(10) % 3.5 olarak saptamışlardır. Çalışmamızda balgamdan izole edilen yalnız 3 (% 3) suşta  $\beta$ -laktamaz pozitif bulunmuştur. Bu sonuçlar ülkemizde  $\beta$ -laktamaz üreten *H.influenzae* suşlarının oranının yüksek olmadığını ve bu oranın yıllara göre artmadığını göstermiştir.

*H.influenzae*'da ampisilin direnci daha çok TEM-1  $\beta$ -laktamazı ile olmaktadır. Ancak bazı suşlar rutin duyarlılık yöntemleriyle saptanamayacak kadar az  $\beta$ -laktamaz üreterek veya üretmeksizin direnç gösterirler. Önceleri çok düşük oranda saptanan  $\beta$ -laktamaz negatif ampisilin direnci (BLNAD) (% 0.04), Japonya'da yapılan bir çalışmada % 44.4 olarak bildirilmiştir (18). Direnç oranındaki artışlar bazı ülkelerde ampisilini ampirik tedavide ilk seçenek olmaktan çıkarmış, yine dirençli suşların artması, menenjit ve diğer sistemik infeksiyonlarda kloramfenikolün  $\beta$ -laktam antibiyotiklerle kombine kullanılmasına

yol açmıştır. Dirençli suşlarla oluşan bu gibi ciddi infeksiyonlarda 3. kuşak sefalosporinler öncelikle kullanılması gereken antibiyotiklerdir, ancak penisilin bağlayan proteinlerdeki değişiklik nedeniyle gelişen direnç unutulmamalıdır. Günümüzde sefaklor, sefuroksim ve sefotaksim duyarlılığında da azalma gözlenmektedir (19). Wootten ve ark. (19) sefuroksime dirençli ve duyarlı suşların sefotaksim duyarlılığını sırasıyla % 95 ve % 92 olarak bildirmişlerdir. Kloramfenikol direnci gerek yurt içi, gerekse yurt dışı çalışmalarda oldukça düşük, yaklaşık % 10 civarındadır (2,13). Kotrimoksazole direnç ise % 13.5-32.7 arasında bildirilmektedir (7,8,13).

Serotip b (Hib) invaziv ve ciddi infeksiyonların başlıca sorumlusudur. Hib oranı Portekiz'de (2) % 94.1, Suudi Arabistan'da (1) ampisiline dirençli suşlarda % 23.5 olarak bildirilmiştir. Ülkemizde serotip ve biyotip çalışmaları oldukça azdır ve saptanan serotip b oranları % 11-53.6 (10,12,17) arasında değişmektedir. Çalışmamızda serotip b oranı % 36'dır ve suşların ikisi bronş lavaj sıvısı, biri konjunktiva sürüntüsünden, diğerleri balgamdan üretilmiştir. Avrupa ülkelerini kapsayan bir çalışmada invaziv infeksiyonlarda, başta biyotip I olmak üzere I-IV biyotipleri daha sık izole edilmiştir (2). İstanbul'da bir biyotiplendirme çalışmasında solunum yolu infeksiyonlarından biyotip II ve VIII diğer tiplere göre daha fazla izole edilmiştir (3). Araştırmamızda ise en fazla izole edilen biyotip I (% 46) olmuştur; 36 Hib suşunun 19'u (% 53), Hib dışı 64 suşun 27'si (% 42),  $\beta$ -laktamaz pozitif ve serotip b olan üç suşun ikisi, kotrimoksazole dirençli 18 suşun 10'u (% 56) biyotip I olarak belirlenmiştir. Bu verilere göre çalışmamızda biyotip I, solunum yolu infeksiyonlarında en sık izole edilen etken olmaktadır.

Türkiye'de antimikrobiklere direnç oranları bazı çalışmalar dışında genelde birbirine uyumludur. Çöplü ve ark. (6) çocuk hastalara ait solunum yolu örneklerinden izole edilen 64 suşa ampisilin, sefaklor, sefotaksim ve kloramfenikol direncini sırasıyla % 62.5, % 19, % 19 ve % 16 olarak saptamışlardır. Burada ampisilin direncinin çok yüksek olması suşların kistik fibrozlu hastalardan izole edilmesine ve orta duyarlı grubun dirençli gruba katılmasına bağlanmıştır. Bir başka çalışmada (10) suşların % 3.5'i ampisiline, % 14'ü kotrimoksazole dirençli bulunurken tümü sefuroksime duyarlı; çoğu balgam örneklerine ait suşların incelendiği bir başka çalışmada (17) ise bakterilerin % 12.9'ü kotrimoksazole dirençli saptanırken, tümü sefuroksim ve kloramfenikole duyarlı bulunmuştur.

Çalışmamızda ampisilin MİK sınırı 0.0125-6  $\mu\text{g/ml}$ 'dir ve suşların % 3'ü dirençli bulunmuş, BLNAD suşa rastlanmamıştır. Disk difüzyon yöntemi ile denenen diğer antibiyotiklerden kotrimoksazole % 18 direnç, sefaklorla % 2 orta duyarlılık saptanmış, ampisilin/sulbaktam, sefuroksim, seftriakson ve kloramfenikole direnç saptanmamıştır. Bu sonuçlar diğer çalışma verileri ile genel olarak uyum göstermektedir (10,17). Ampisilin direncinin birçok yurtdışı yayının aksine düşük bulunması tedavi açısından ülkemiz için olumlu bir saptamadır. Yan etkileri nedeniyle kullanımdan kaldırılan grepafloksasine suşların tümü duyarlı (MİK  $\leq$  0.05  $\mu\text{g/ml}$ ) bulunmuştur.

*H.influenzae*'da bazı suşlar birden fazla antibiyotik grubuna dirençli olabilir. Çoğul direnç oranının % 2.4 gibi düşük saptandığı bir çalışmada ampisiline dirençli suşların % 50'sinin ilave olarak bir veya iki antibiyotige daha dirençli olduğu bildirilmiştir (2). Çalışmamızda balgam örneğinden izole edilen ve  $\beta$ -laktamaz pozitif (serotip b, biyotip I) olan yalnız bir suş ampisilin ve kotrimoksazole dirençli bulunmuş, çoğul dirençli suşa rastlanmamıştır.

Sonuç olarak ülkemizde son yıllara ait suşlarda saptanan  $\beta$ -laktamaz pozitifliği ve buna paralel olarak görülen ampisilin ve diğer  $\beta$ -laktam antibiyotiklerde saptanan düşük orandaki direnç sevindiricidir. Yine de yeni izole edilen suşlarda olabilecek değişiklikleri saptayabilmek için, bu tip çalışmaların devam etmesi gerekmektedir.

## KAYNAKLAR

- 1- Abdel-Rahman EM, Ismael NA, Dizon RA: A study of antibiotic resistance and  $\beta$  lactamases of *Haemophilus influenzae* from respiratory infections in Saudi Arabia, *J Antimicrob Chemother* 44 (Suppl A):92 (1999).
- 2- Bajanca-Lavado MP, Casin I, Vaz Pato MV, the Multicentre Study Group:Antimicrobial resistance and epidemiological study of *Haemophilus influenzae* strains isolated in Portugal, *J Antimicrob Chemother* 38:615 (1996).
- 3- Bal Ç, Keskin SD, Şalcıoğlu M, Berkiten R: Haziran 1993-Nisan 1995 tarihleri arasında solunum yolu örneklerinden izole edilen *Haemophilus influenzae* suşları, "Anğ Ö, Mamal Torun M (eds): *Haemophilus influenzae* Enfeksiyonları Simpozyumu" kitabında s. 169, Türk Mikrobiyol Cem Yayın No: 24, İstanbul (1995).
- 4- Berkiten R, Gürol SD: Solunum yolu örneklerinden izole edilen *Haemophilus influenzae*'da antibiyotiklere direnç, *ANKEM Derg* 12: 492 (1998).
- 5- Berkiten R, Gürol SD: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* isolates from lower respiratory tract infections and their resistance to some antibiotics, *European Society of Chemotherapy, Infectious Disease, 6th Scientific Meeting*, Program and Abstract Book p.122, İstanbul (1999).
- 6- Çöplü N, Aktepe OC, Uluutku S: *Haemophilus influenzae* suşlarının in-vitro antibiyotiklere duyarlılıkları, *ANKEM Derg* 13: 87 (1999).
- 7- Doern GV,Richter SS, Huynh HK, Wingert EM, Rhomberg PR, Brueggemann AB: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* antimicrobial resistance rates from a 1997-98 34 centers U.S. Surveillance Study, *J Antimicrob Chemother* 44 (Suppl A): 91 (1999).
- 8- Felmingham D, Grüneberg RN, the Alexander Project Group: Alexander Project 1998 preliminary results: Comparative in vitro activity of 20 antimicrobials against 1887 community-acquired LRTI isolates from 7 European countries, *J Antimicrob Chemother* 44(Suppl A): 172 (1999).
- 9- Kansak N, Öksüz L, Kaygusuz A, Öngen B, Töreci K: *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* ve *Streptococcus pneumoniae* suşlarında antibiyotik direnci, *ANKEM Derg* 12:1 (1998).
- 10- Kaygusuz A, Öngen B, Öksüz L, Gürler N, Töreci K: Sefprozilin *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* ve *Streptococcus pneumoniae* suşlarına in-vitro etkisi, *ANKEM Derg* 13: 485 (1999).
- 11- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Win WC:*Haemophilus*, *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, p.380, Lippincott, New York (1997).
- 12- Mamal Torun M, Alkan E, Altunkum SM, Aksın E, Kulaksız B, Yüksel P: *Haemophilus influenzae*'da antimikrobiklere direnç sıklığı, *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 28: 49 (1998).
- 13- Mathai D, Lewis MT, Kugler KC, Beach ML, Jones RN and the SENTRY Surveillance Group:Pathogen occurrence and antimicrobial resistance patterns for strains isolated from hospitalized patients with pneumoniae in North America: A report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-1998), *J Antimicrob Chemother* 44 (Suppl A): 85 (1999).
- 14- National Committee for Clinical Laboratory Standards: *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 6th Informational Supplement (M100-S6), Villanova, Pa (1995).
- 15- Öngen B, Kaygusuz A, Gürler N, Töreci K: Çeşitli bakteri suşlarına sefodizimin etkinliği, *ANKEM Derg* 12: 41 (1998).

- 16- Richard MP, Gil Aguado A, Mattina R, Marre R and the SPAR Study Group: Sensitivity to sparflloxacin and other antibiotics of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* strains isolated from adult patients with community-acquired lower respiratory tract infections: a European multicentre study, *J Antimicrob Chemother* 41: 207 (1999).
- 17- Saydam C, Tünger A, Özinel MA, Tokbaş A: *Haemophilus influenzae* kökenlerinin serotipleri, beta-laktamaz salgılama özellikleri ve antibiyotiklere duyarlılıkları, *ANKEM Derg* 10: 415 (1996).
- 18- Seki H, Kasahara Y, Ohta K, Saikawa Y, Sumita R, Yachie A, Fujita S, Koizumi S: Increasing prevalence of ampicillin-resistant, non-beta-lactamase-producing strains of *Haemophilus influenzae* in children in Japan, *Chemotherapy* 45: 15 (1999).
- 19- Wootton M, Bowker KE, Janowska A, Holt HA, MacGowan AP: In-vitro activity of HMR 3647 against *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* and  $\beta$ -haemolytic streptococci, *J Antimicrob Chemother* 44:445 (1999).