

# DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ HASTANESİNDE 2003-2006 YILLARINDA ÜRETİLEN *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* SUŞLARININ ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARI

Hilal ÖZKUL, Özgen Alpay ÖZBEK, Hüseyin ÇOBAN, Zeynep GÜLAY

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İZMİR

## ÖZET

*Haemophilus influenzae*; menenjit, sepsis, çeşitli doku infeksiyonları ve toplum kökenli pnömonilerin en önemli etkenlerindedir. Bu çalışmada 2003-2006 yıllarında laboratuvarımıza gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 289 *H. influenzae* suşunun antibiyotik duyarlılıkları CLSI standartlarına uyularak disk difüzyon yöntemi ile araştırılmış, beta-laktamaz aktivitesi nitrocefim hidrolizi yöntemi ile belirlenmiştir.

Söz konusu yıllar içinde direnç oranlarına bakıldığında 2003 yılı izolatlarının hiçbirinde beta-laktamaz aktivitesi saptanmamışken sonraki yıllarda beta-laktamaz pozitif suşların arttığı, 2005 yılında % 8'e ulaştığı, 2006 yılında ise % 7 oranında bulunduğu izlenmiştir. Benzer şekilde, trimetoprim-sulfametoksazol direnç oranları da % 29'dan (2003) % 36'ya (2006) yükselmiştir. İzolatların tümü değerlendirildiğinde ampisiline % 5.9, trimetoprim-sulfametoksazole % 31.8 direnç saptanmış, suşların hiçbirinde sefotaksim, sefuroksim, amoksisilin-klavulanat direnci görülmemiştir. Benzer şekilde, beta-laktamaz negatif ampisiline dirençli (BLNAR) izolat varlığı saptanmamıştır.

**Anahtar sözcükler:** antibiyotik direnci, beta-laktamaz aktivitesi, *H. influenzae*

## SUMMARY

### Antimicrobial Susceptibility Pattern of *Haemophilus influenzae* Strains Isolated during 2003-2006 at Dokuz Eylül University Hospital

*Haemophilus influenzae* is one of the most important causes of meningitis, sepsis, various tissue infections and community acquired pneumonia. In this paper antimicrobial susceptibilities of 289 *H. influenzae* strains isolated from various clinical samples between 2003-2006 were evaluated by disk diffusion method according to the recommendations of CLSI and beta-lactamase activity was investigated by nitrocefim hydrolysis test.

Beta-lactamase activity was not detected in 2003 isolates. The percentage of beta-lactamase positive strains increased to 8 % and 7 % in 2005 and 2006, respectively. Similarly, resistance rates to trimethoprim-sulfamethoxazole increased from 29 % (2003) to 36 % (2006). When all isolates were evaluated, resistance rates for ampicillin and trimethoprim-sulfamethoxazole were 5.9 % and 31.8 %. None of the isolates were resistant to cefotaxime, cefuroxime, amoxicillin-clavulanate. Similarly, beta-lactamase negative ampicillin resistant (BLNAR) isolates were not detected.

**Keywords:** antimicrobial resistance, beta-lactamase activity, *Haemophilus influenzae*

## GİRİŞ

*Haemophilus influenzae* otit, bronşit, pnömoni ve menenjit gibi çeşitli infeksiyonlara neden olan bir patojendir<sup>(19)</sup>. Bu etkene karşı korunma, kapsül maddesine karşı gelişen antikor-

larla sağlanır. Bu nedenle, bağışıklığı baskılanmış hastalarda ve henüz yeterli antikor düzeyine sahip olmayan 3 yaş ve altı çocuklarda infeksiyon riski yüksektir<sup>(2)</sup>.

*H. influenzae* için ampisilin direnci ilk kez 1974 yılında bildirilmiştir<sup>(11)</sup>. Klinik *H. influenzae*

**Yazışma adresi:** Zeynep Gülay, Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İZMİR

Tel.: (0232) 412 45 03

e-posta: zeynep.gulay@deu.edu.tr

Alındığı tarih: 24.04.2007, revizyon kabulü: 17.05.2007

izolatları arasında ampisiline direnç artmaktadır<sup>(15)</sup>. Ampisilin direncinden, genellikle TEM-1 ya da daha az sıklıkta ROB-1 beta-laktamaz varlığının sorumlu olduğu gösterilmiştir<sup>(11,15,20)</sup>. Bunların dışında yapılan çalışmalarda beta-laktamaz negatif olan ampisilin dirençli (BLNAR) ve beta-laktamaz pozitif olan amoksisilin-klavulanat dirençli (BLPACR) suşlar bildirilmiştir<sup>(11,12)</sup>. İlk kez 1980 yılında bildirilen BLNAR suşlarında dirençten beta-laktam antibiyotiklerin bağlanma afinitelerini azaltan penisilin bağlayan protein-3 (PBP 3) mutasyonları sorumludur<sup>(14,20,21)</sup>. BLNAR izolatları genellikle beta-laktamaz üreten suşlara kıyasla daha düşük oranda izole edilmektedir<sup>(15)</sup>. *H.influenzae*'nin özel üreme ve antibiyogram koşullarına gereksinim duyması nedeniyle, ülkemizde bu tür antibiyotik duyarlılıklarını inceleyen kısıtlı sayıda çalışma yapılmıştır<sup>(2,10,13)</sup>. Ancak farklı reçeteleme alışkanlıkları özellikle oral antibiyotiklere karşı bölgesel direnç paternlerini etkilemektedir. Örneğin, değişik Avrupa ülkelerinde beta-laktamaz prevalansının % 0-17.6 arasında değiştiği bildirilmiştir<sup>(13)</sup>. Bu nedenle, çalışmamızda hastanemize başvuran hastalardan 2003-2006 yıllarında izole edilen *H.influenzae* suşlarının antibiyotik duyarlılığı ve duyarlılıkların yıllar içindeki değişimi incelenmiştir.

## GEREÇ VE YÖNTEM

**Bakteriler:** Çalışmaya, Ocak 2003 - Ekim 2006 tarihleri arasında Bakterioloji Laboratuvarımıza gelen klinik örneklerden üretilmiş 289 *H.influenzae* suşu alınmıştır. Örneklerin dağılımı tablo 1'de gösterilmiştir. Suşların tanımlanma-

**Tablo 1:** *H.influenzae*'nin etken olarak saptandığı örneklerin dağılımı (n).

Örnek türü	2003	2004	2005	01.01.06-10.10.06
Solunum yolu örnekleri	24	35	89	69
Konjunktiva, apse, yara	7	10	22	28
Kan	-	-	2	1
BOS	-	-	-	1
Periton sıvısı	-	-	-	1

sında X ve V faktörüne gereksinim, koloni morfolojisi, Gram boyama, katalaz ve oksidaz testleri kullanılmıştır.

**Beta-laktamaz aktivitesi:** Beta-laktamaz aktivitesinin varlığı nitrosefin (Oxoid, İngiltere) testi ile araştırılmıştır. Kromojenik substrat olan nitrosefinin renginin 1 dakika içinde sarıdan kırmızıya dönüşmesi beta-laktamaz aktivitesinin varlığını gösterir<sup>(8)</sup>.

**Antibiyotik duyarlılık testleri:** İzole edilen suşların ampisilin (10 µg), trimetoprim-sulfametoksazol (1.25/23.75 µg), amoksisilin-klavulanat (20/10 µg), sefotaksim (30 µg) ve sefuroksime (30 µg) duyarlılıkları Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standartlarına göre *Haemophilus* test besiyeri'nde (HTM, Oxoid) disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir<sup>(6)</sup>.

**İstatiksel analiz:** 2003-2006 yıllarındaki ampisilin ve trimetoprim-sulfametoksazol dirençleri arasındaki farkın önemi Yates süreklilik düzeltilmesi ile araştırılmıştır.

## BULGULAR

Ocak 2003 ile 10 Ekim 2006 arasında *H.influenzae* izolatlarına ait antibiyotik duyarlılık sonuçlarının yıllara göre dağılımı tablo 2'de gösterilmiştir.

**Tablo 2:** *H.influenzae* suşlarının antibiyotik duyarlılık sonuçlarının yıllara göre dağılımı (%).

Antibiyotik	2003 (n: 31)		2004 (n: 45)		2005 (n: 113)		2006 (n: 100)		Toplam (n: 289)	
	Du	Di	Du	Di	Du	Di	Du	Di	Du	Di
Ampisilin	100	0*	98	2	92	8*	93	7*	94.1	5.9
Trimetoprim-sulfametoksazol	71	29**	69	31	71	29	64	36**	68.2	31.8
Amoksisilin-klavulanat	100	-	100	-	100	-	100	-	100	0
Sefotaksim	100	-	100	-	100	-	100	-	100	0
Sefuroksim	100	-	100	-	100	-	100	-	100	0
Beta-laktamaz enzimi	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	Pozitif
	100	0	98	2	92	8	93	7	94.1	5.9

Du: duyarlı, Di: dirençli, \*  $p < 0.05$  (2003-2005 ve 2003-2006 yılları için), \*\*  $p > 0.05$  (2003-2006 yılları için).

rilmiştir.

İnfeksiyon etkeni olarak 2003-2006 yıllarında izole edilen suşlarda antibiyotik duyarlılık paternleri incelendiğinde, beta-laktamaz enzim aktivitesi pozitif suşların ve trimetoprim-sulfametoksazol dirençli suşların yıllar içerisinde artış gösterdiği izlenmektedir. 2003 yılında hiç beta-laktamaz pozitif suş gözlenmezken son iki yılda beta-laktamaz üreten suşlar tüm suşların % 8 ve % 7'sini oluşturmuştur ( $p < 0.05$ ). Trimetoprim-sulfametoksazole dirençli suşlar az miktarda ancak sürekli biçimde artmış ve 2006 yılında % 36'ya ulaşmıştır ( $p > 0.05$ ).

İzole edilen tüm suşların 17'si (% 5.9) ampiciline, 92'si (% 31.8) trimetoprim-sulfametoksazole dirençli bulunurken, 2. ve 3. kuşak sefalosporine ve amoksisilin-klavulanata direnç saptanmamıştır. Ampisiline dirençli suşların hepsi beta-laktamaz oluşturulmuş, izolatlar arasında BLNAR suş bulunmamıştır.

Farklı klinik örneklerden izole edilen *H.influenzae* suşların antibiyotik duyarlılık oranlarının da benzer olduğu saptanmıştır.

## TARTIŞMA

*H.influenzae*, menenjit, sepsis, çeşitli doku infeksiyonları ve toplum kökenli pnömonilerde etken olarak izole edilen bir bakteridir. *H.influenzae* infeksiyonların sıklığı ve antibiyotik duyarlılık özellikleri toplumlar arasında farklılık göstermektedir<sup>(12,13)</sup>. Birçok ülkede beta-laktamaz oluşturan *H.influenzae* suş oranlarında artış olduğu bildirilmektedir<sup>(11)</sup>.

Ampisiline dirençli *H.influenzae* suşlarının büyük çoğunluğu ampicilini inaktive eden TEM-1 beta-laktamaz oluşturmaktadır<sup>(3)</sup>. Bu suşların kullandığı diğer direnç mekanizmaları, ROB-1 beta-laktamaz üretilmesi veya PBP değişimidir<sup>(7,14,15)</sup>. Sonuncu mekanizma ile direnç geliştiren beta-laktamaz negatif-ampisilin dirençli suşlar genellikle düşük oranda (% 0.04 - 2.5) izole edilmektedir<sup>(12)</sup>. Fakat İspanya (% 12) ve Japonya'da (% 3.4) yapılan surveyans çalışmalarında BLNAR izolatları için bu oranının daha yüksek olduğu bildirilmiştir<sup>(16,18)</sup>. Ayrıca çalışmalarda BLPACR izolatların saptandığı da bil-

dirilmiştir<sup>(12,15,16,18)</sup>.

*H.influenzae* suşlarının sefaklor, sefuroksim ve sefotaksim duyarlılığında azalma görüldüğünü bildiren çalışmalar da bulunmaktadır. Wooten ve ark.<sup>(22)</sup>, sefuroksime dirençli ve duyarlı suşların sefotaksim duyarlılıklarını sırasıyla % 95 ve % 92 olarak bildirmişlerdir.

Blosser-Middleton ve ark.<sup>(4)</sup>, dört Avrupa ülkesinden toplanan *H.influenzae* izolatları ile yaptıkları çalışmada beta-laktamaz prevalansının Avrupa ülkeleri arasında değişkenlik gösterdiğini bildirmişlerdir. Jansen ve ark.<sup>(13)</sup>, çeşitli Avrupa ülkelerinden ve Amerika Birleşik Devletleri'nden 2004 ve 2005 yılları arasında toplanan toplam 578 *H.influenzae* izolatını incelemişler, 44 (% 7.6) suşun beta-laktamaz pozitif, 51 (% 8.8) suşun ise BLNAR olduğunu saptamışlar, ayrıca bu oranların ülkeler arasında büyük farklılık gösterdiğini bildirmişlerdir. Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan çalışmalarda, 2000-2001 yılları arasında toplanan 1434 *H.influenzae* suşunun % 28.3'ünün beta-laktamaz pozitif olduğu ve bu suşlar arasında % 1.4 oranında BLNAR izolat bulunduğu<sup>(15)</sup>; 2002-2003 yılları arasında incelenen 986 izolattan ise % 26.2'sinin beta-laktamaz pozitif olduğu ve negatif izolatların % 3.3'ünün ampiciline dirençli olduğu bildirilmiştir<sup>(11)</sup>.

Fransa'da Dabernat ve ark.<sup>(7)</sup>, 688 izolatın % 44.5'inin TEM tipi beta-laktamaz ürettiğini, beta-laktamaz negatif suşların % 1.3'ünün ampiciline dirençli olduğunu saptamıştır. İspanya'da 1730 *H.influenzae* izolatın % 23'ü beta-laktamaz pozitif bulunurken, beta-laktamaz negatif suşların % 12'sinin ampiciline karşı azalmış duyarlılığa sahip olduğu görülmüştür<sup>(16)</sup>. Brezilya'da ise Almeida ve ark.<sup>(1)</sup>, 174 izolatın % 17'sinin beta-laktamaz ürettiğini ve tüm izolatların amoksisilin-klavulanat ve seftriaksona duyarlı olduğunu belirlemiştir. 1998-2000 Alexander Projesinde çalışılan 8523 *H.influenzae* suşunun % 16.9'unun beta-laktamaz pozitif olduğu, beta-laktamaz prevalansı en düşük ülkenin Rusya, en yüksek ülkenin Amerika Birleşik Devletleri olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada 21 BLNAR ve 6 BLPACR izolat varlığı tanımlanmıştır. BLNAR suşların 12'si ve BLPACR suşların 5'i Japonya'da izole edilmiştir. Ülkeler ara-

sında trimetoprim-sulfametoksazol direnç prevalansı yönünden de değişiklikler olduğu saptanmıştır. Trimetoprim-sulfametoksazol direnç prevalansı en yüksek ülkenin Kenya (% 55.2) olduğu bildirilmiştir<sup>(12)</sup>.

Ülkemizde yapılan çalışmalarda da direnç oranları değişiklik göstermektedir. Budak ve Gür<sup>(5)</sup> inceledikleri 127 suşun % 5.6'sını ampisiline, % 27.5'i trimetoprim-sulfametoksazole dirençli bulmuşlardır. Manisa'da 2002-2003 yılları arasında nazofaringeal sürüntü örneklerinden izole edilen 162 *H.influenzae* suşunun 32'sinin (% 19.7) beta-laktamaz pozitif ve 2'sinin BLNAR olduğu saptanmıştır<sup>(9)</sup>. Söz konusu çalışmada bildirilen beta-laktamaz pozitiflik yüzdesi diğer çalışmalara kıyasla çok yüksektir. İstanbul'dan Kansak ve ark.<sup>(14)</sup>, 50 suşun hiçbirinde beta-laktamaz aktivitesi ve ampisilin direnci saptanmıştır. Ampisilin direncini İstanbul'dan Berkiten ve Gürol<sup>(3)</sup> % 3, Ankara'dan Gür ve ark.<sup>(10)</sup> % 8 olarak bildirmişlerdir.

Çalışmaya aldığımız 289 *H.influenzae* suşunun 17'sinde (% 5.9) ampisiline direnç saptanmış ve ampisiline dirençli tüm suşların da beta-laktamaz enzimi ürettikleri belirlenmiştir. Çalışmamızda BLNAR *H.influenzae* suşu bulunmamıştır. Buna karşılık, Jansen ve ark.<sup>(13)</sup>'ün çok merkezli olarak yaptıkları çalışmada Türkiye'den 2004-2005 yıllarında izole edilmiş 82 *H.influenzae* izolatu incelenmiş ve bu izolatlar arasında % 11 oranında BLNAR varlığı saptanmıştır. Bu durum, özellikle oral antibiyotik kullanma alışkanlığının ülkelerin coğrafik bölgelerine göre değişkenlik göstermesinden kaynaklanıyor olabilir. Ampisiline dirençli suşların oranında 2003-2006 yılları arasında belirgin bir artış olduğu dikkat çekmektedir. Bununla birlikte, % 7'lik direnç oranı gerek ulusal, gerekse uluslararası çalışmalarda birçok merkez için bildirilen direnç oranlarından daha düşüktür<sup>(12)</sup>.

Uluslararası çalışmalarda ampisilinden sonra direnç oranı en yüksek bulunan antibiyotik trimetoprim-sulfametoksazoldür. Ülkemizde yapılan çalışmalarda % 1-98 arasında değişen oranlarda direnç bildirilmiştir<sup>(2,12)</sup>. Çalışmamızda da trimetoprim-sulfametoksazol direnci % 31.8 olarak bulunmuştur.

*H.influenzae* suşlarının izolasyon sıklığının

ve antibiyotik direnç oranlarının periyodik olarak belirlenmesi, epidemiyolojik veri toplanması açısından gereklidir. Direnç oranları coğrafik bölgeye göre değiştiği için ampirik tedavinin seçiminde yerel duyarlılık paternlerinin bilinmesi önem taşımaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Almeida AEC, Filippis I, Ferreira D et al: Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae* isolates collected from 4 centers in Brazil (1990-2003), *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006;54(1):57-62.
2. Berkiten R: Türkiye'de *Haemophilus influenzae*: Beta-laktamaz pozitifliği ve antibiyotiklere direnç (1987-2002), *ANKEM Derg* 2004;18(1):53-60.
3. Berkiten R, Gürol SD: Solunum yolu infeksiyonlarından izole edilen *Haemophilus influenzae* suşları ve çeşitli antimikrobik maddelere direnç, *ANKEM Derg* 2001;15(4):718-23.
4. Blosser-Middleton R, Sahm DF, Thornsberry C et al: Antimicrobial susceptibility of 840 clinical isolates of *Haemophilus influenzae* collected in four European countries in 2000-2001, *Clin Microbiol Infect* 2003;9(5):431-6.
5. Budak F, Gür D: Klinik örneklerden izole edilen *Haemophilus influenzae* suşlarının çeşitli antimikrobik ilaçlara in-vitro duyarlılığı, *Mikrobiyol Bül* 2003;37(1):19-25.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 15th Informational Supplement (M100-S15), Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa (2005).
7. Dabernat H, Plisson-Saune MA, Delmas C et al: *Haemophilus influenzae* carriage in children attending french day care centers: a molecular epidemiological study, *J Clin Microbiol* 2003;41(4):1664-72.
8. Doern GV, Jones RN, Gerlach EH et al: Multicenter clinical laboratory evaluation of beta-lactamase disk assay employing a novel chromogenic cephalosporin, *J Antimicrob Chemother* 1995;33(6):1665-7.
9. Gazi H, Kurutepe S, Sürücüoğlu S, Teker A, Özbakkaloğlu B: Antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens in the oropharynx of healthy school children in Turkey, *Indian J Med Res* 2004;120(5):489-94.
10. 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 1995;9(2):115.
11. Heilmann KP, Rice CL, Miller AL et al: Decreasing prevalence of beta-lactamase production among respiratory tract isolates of *Haemophilus influenzae* in the United States, *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(6):2561-4.
  12. Jacobs MR, Felmingham D, Appelbaum PC, Gruneberg RN, Alexander Project Group: The Alexander Project 1998–2000: susceptibility of pathogens isolated from community-acquired respiratory tract infection to commonly used antimicrobial agents, *J Antimicrob Chemother* 2003;52(2):229-46.
  13. Jansen WTM, Verel A, Beitsma M, Verhoef J, Milatovic D: Longitudinal European surveillance study of antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae*, *J Antimicrob Chemother* 2006;58(4):873-7.
  14. Kansak N, Öksüz L, Kaygusuz A, Öngen B, Töreci K: *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae* suşlarında antibiyotik direnci, ANKEM Derg 1998;12(1):1-7.
  15. Karlowsky JA, Critchley IA, Blosser-Middleton RS et al: Antimicrobial surveillance of *Haemophilus influenzae* in the United States during 2000–2001 leads to detection of clonal dissemination of a beta-lactamase-negative and ampicillin-resistant strain, *J Clin Microbiol* 2002;40(3):1063-6.
  16. Marco F, Garcia-Lomas J, Garcia-Rey C et al: Antimicrobial susceptibilities of 1,730 *Haemophilus influenzae* respiratory tract isolates in Spain in 1998-1999, *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(11):3226-8.
  17. Markowitz SM: Isolation of an ampicillin-resistant, non-beta-lactamase producing strain of *Haemophilus influenzae*, *Antimicrob Agents Chemother* (1980);17(1):80-3.
  18. Ohkusu K, Nakamura A, Sawada K: Antibiotic resistance among recent clinical isolates of *Haemophilus influenzae* in Japanese children, *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;36(4):249-54.
  19. Qin L, Watanabe H, Asoh N et al: Antimicrobial susceptibility and genetic characteristics of *Haemophilus influenzae* isolated from patients with respiratory tract infections between 1987 and 2000, including beta-lactamase-negative ampicillin-resistant strains, *Epidemiol Infect* 2006;134(4):665-8.
  20. Sanbongi Y, Suziki T, Osaki Y, Senju N, Ida T, Ubukata K: Molecular evolution of beta-lactam-resistant *Haemophilus influenzae*: 9-year surveillance of penicillin-binding protein 3 mutations in isolates from Japan, *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50(7):2487-92.
  21. Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K et al: Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with beta-lactam resistance in beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*, *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(6):1693-9.
  22. Wooten 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* 1999;44(4):445-53.