

İSTANBUL'DA ÇOCUK HASTALARDAN İZOLE EDİLEN HAEMOPHILUS INFLUENZAE VE HAEMOPHILUS PARAINFLUENZAE SUŞLARINDA ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇ*

Arif KAYGUSUZ, Müge ÖZALP, Betigül ÖNGEN,
Nezahat GÜRLER, Kurtuluş TÖRECI

ÖZET

Çocuk hastalardan izole edilen 58 *H.influenzae* ve 127 *H.parainfluenzae* suşunun *Haemophilus* Test Medium'da disk difüzyon yöntemi ile çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları ve nitrocefim diski ile beta-laktamaz oluşturmaları aranmıştır. *H.influenzae* suşlarının 13'ü (% 22) ve *H.parainfluenzae* suşlarının 8'i (% 6) beta-laktamaz oluşturmuş ve ampisiline dirençli bulunmuştur. Kloramfenikole yalnız 1 *H.influenzae* suşu dirençli bulunmuş, ampisilin-sulbaktam amoksisilin-klavulanik asit, sefaklor, sefuroksim, sefotaksim, seftriakson, seftazidim, ofloksasin, siprofloksasine dirençli suşa rastlanmamıştır.

SUMMARY

Antibiotic resistance in Haemophilus influenzae and Haemophilus parainfluenzae strains isolated from pediatric patients in Istanbul.

Antibiotic susceptibility by disk diffusion method in *Haemophilus* Test Medium and beta-lactamase production by nitrocefim disk method were determined in 58 *H.influenzae* and 127 *H.parainfluenzae* strains isolated from pediatric patients. Thirteen (22 %) *H.influenzae* and 8 (6 %) *H.parainfluenzae* strains were found as ampicillin resistant and beta-lactamase producers. Only 1 *H.influenzae* strain was found to be resistant to chloramphenicol and no resistance was recorded for ampicillin-sulbactam, amoxycillin-clavulanic acid, cefaclor, cefuroxime, cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime, ofloxacin or ciprofloxacin.

GİRİŞ

Haemophilus cinsinden bakteriler penisilin ve türevleri, kloramfenikol, sulfonamidler, tetrasiklinler ve sefalosporinlere doğal olarak duyarlı iken konjugatif plazmidlerin yayılması ile bugün klinik örneklerden izole edilen *Haemophilus* suşlarında gittikçe artan oranda antibiyotiklere direnç saptanmaktadır (2, 17, 26).

H.influenzae meninjitinin ampisilinle tedavisinde ilk başarısız kalınan olgu 1968'de bildirilmişse (30) de, ampisiline dirençli ilk suş 1972'de meninjitli bir çocuğun beyin omurilik sıvısından izole edilmiş ve 1974'de yayınlanmıştır (13). 1980'lerde beta-laktamaz oluşturmeyen suşlarda da düşük oranlarda ampisilin direnci bildirilmeye başlanmıştır (19, 26). Kloramfenikole dirençli ilk suş da 1972'de bildirilmiştir (1).

* 9. Türkiye Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresinde sunulmuştur (19-25 Haziran 1994, Ürgüp) İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Çapa, İstanbul.

GEREÇ VE YÖNTEM

8.2.1994 - 5.4.1994 tarihleri arasında laboratuvarımıza gönderilen çocuk hastalara ait 302 boğaz salgısı, 30 balgam, 20 burun salgısı, 3 kulak akıntısı ve 195 beyin omurilik sıvısı örneğinden izole edilen *Haemophilus* cinsinden bakteriler ile çalışılmıştır.

Muayene maddeleri, *Haemophilus* cinsinden bakteri izole etmek amacıyla, basitrasinli (300 mg/l) çukulata agar besiyerine ekilmiştir. Kültürler 37 °C'de % 5-10 CO₂'li ortamda bir gece inkübe edilmiş ve bakteriler Gram boyama, koloni morfolojileri, X ve V faktörlerine olan ihtiyaçları ve at kanlı jelozda hemoliz oluşturma özelliklerine göre idantifiye edilmiştir.

Antibiyotiklere duyarlık deneyleri NCCLS standartlarına uygun olarak disk difüzyon yöntemi ile *Haemophilus* Test Medium (HTM)'da yapılmıştır (22). Zenginleştirilmiş çukulata agardaki bir gecelik kültürden alınan koloniler Mueller-Hinton buyyonunda süspansiyon edilmiş ve bulanıklık 0.5 McFarland'a ayarlanmıştır. Süspansiyon HTM'a yayılarak ampisilin (10 µg), ampisilin-sulbaktam (10+10 µg), amoksisilin-klavulanik asit (20+10 µg), sefaklor (30 µg), sefuroksim (30 µg), sefotaksim (30 µg), seftriakson (30 µg), seftazidim (30 µg), kloramfenikol (30 µg), ofloksasin (5 µg) ve siprofloksasin (5 µg) diskleri denenmiştir. Sonuçlar 35 °C'de 18 saat inkübe edildikten sonra okunmuştur. Beta-laktamaz oluşturma nitrosefin (BBL-Cefinase) diski ile araştırılmıştır. Kontrol olarak *H.influenzae* ATCC 49247 suşu kullanılmıştır.

BULGULAR

İncelenen 302 boğaz salgısının % 16'sından *H.influenzae*, % 40'ından *H.parainfluenzae* izole edilmiştir. Balgamda bu oranlar sırasıyla % 10 ve % 7, burun salgılarında ise % 15 ve % 25'tir. İncelenen 195 BOS'nun 2'sinden, 3 kulak akıntı materyalinin 1'inden *H.influenzae* üretilmiştir (Tablo 1). Üretilen 1 *H.haemolyticus* ve 2. *H.paraahaemolyticus* suşu sayılarının azlığı nedeniyle değerlendirilmeye alınmamıştır.

Onbiri boğaz salgısı, ikisi burun salgısından izole edilen 13 (% 22) *H.influenzae*, yedisi boğaz salgısı, biri burun salgısından izole edilen 8 (% 6) *H.parainfluenzae* suşu ampisiline dirençli bulunmuştur. Ampisiline dirençli suşların hepsi beta-laktamaz oluşturmıştır.

Tablo 1. Çeşitli muayene maddelerinden izole edilen *H.influenzae* ve *H.parainfluenzae* suşları.

İncelenen örnek	(n)	<i>H.influenzae</i> n (%)	<i>H.parainfluenzae</i> n (%)
Boğaz salgısı	302	49 (16)	120 (40)
Balgam	30	3 (10)	2 (7)
Burun salgısı	20	3 (15)	5 (25)
Kulak akıntısı	3	1 (33)	0
BOS	195	2 (1)	0
Toplam	550	58 (11)	127 (23)

Kloramfenikole direnç yalnız 1 *H.influenzae* suşunda saptanmıştır. Denenen sefalosporinlere ve kinolonlara direnç saptanmamıştır (Tablo 2).

Tablo 2. İzole edilen *H.influenzae* ve *H.parainfluenzae* suşlarında antibiyotiklere direnç.

Denenen antibiyotikler	<i>H.influenzae</i> (n= 58)	<i>H.parainfluenzae</i> (n= 127)
Ampisilin	13 (% 22)	8 (% 6)
Kloramfenikol	1 (% 2)	0
Amp.-sulb., Amok.-klav. asit, Sefaktor, Sefuroksim, Sefotaksim, Seftriakson, Seftazidim, Ofloksasin, Siprofloksasin	0	0
Beta-laktamaz oluşturma	13 (% 22)	8 (% 6)

TARTIŞMA

Ampisiline dirençli *Haemophilus* suşlarının çoğu ampisilini inaktive eden TEM-1 beta-laktamaz enzimi oluştururlar (17, 27). Bu enzim ayrıca diğer penisilinleri ve bazı sefalosporinleri de inaktive eder (19).

Bugün birçok ülkede beta-laktamaz oluşturan *H.influenzae* suşlarının oranı gittikçe artmaktadır. Amerika'da *H.influenzae* suşlarının % 17-29.5 kadarının beta-laktamaz oluşturduğu ve kapsüllü b tipi suşlarda bu oranın daha yüksek olduğu bildirilmiştir (12, 16, 21). İngiltere'de beta-laktamaza bağlı ampisilin direncinin 1977'de % 1.6'dan 1991'de % 8.3'e çıktığı saptanmıştır. Aynı süreçte tetrasiklin direnci % 3.1'den % 1.4'e düşmüş, kloramfenikol direnci sabit kalmıştır (ortalama %1) (25, 26). Avrupa'da en yüksek beta-laktamaz pozitif *H.influenzae* oranı İspanya'da (% 30.6) ve Belçika'da (% 26.7) saptanırken, Almanya'da en düşük (% 1.6) bulunmuştur (19). Kloramfenikole direnç genellikle CAT enzimi ile ilgilidir (7). *H.influenzae* suşlarında kloramfenikol direnci yine b tipi kapsüllü suşlarda daha sık olarak İspanya ve Belçika'da en yüksek oranlarda saptanırken (% 31.5 ve % 11), diğer birçok Avrupa ülkesinde, Amerika ve Avustralya'da ya hiç bulunmamış veya düşük oranda saptanmıştır (% 1-2) (6, 16, 25).

Bazı *H.influenzae* suşları da beta-laktamaz oluşturmada farklı bir mekanizma ile ampisiline direnç geliştirmişlerdir. Bu suşlarda PBP'lerde (PBP 3A, 3B) değişiklik olduğu, ampisilin ve diğer beta-laktamlara afinitenin azaldığı DNA transformasyon çalışmalarıyla gösterilmiştir (5). Böyle ampisiline dirençli beta-laktamaz oluşturmayan suşların oranı İngiltere'de 1981'de % 2.5'den 1991'de % 5.8'e yükselmiştir (25). İspanya'da dirençli suşların % 5'inde (26), Kanada'da % 0.4'ünde (27) beta-laktamaz dışı bir mekanizma ile direnç saptanırken Avustralya'da beta-laktamaz negatif direnç saptanmamış, ancak çok az sayıda suşta orta duyarlılık saptanmıştır (6). Beta-laktamaz oluşturmayan ampisiline dirençli suşlara balgamdan izole edilen kapsülsüz suşlar arasında daha çok rastlanmaktadır (24).

Beta-laktamaz negatif olup ampisiline dirençli bulunan suşlarda 1. ve 2. kuşak sefalosporinlerin MIC₉₀ değerleri 10 kat kadar artmış (15), 3. kuşak sefalosporinler ve imipenemde önemli bir değişiklik saptanmamıştır (11, 15). İmipenem hariç bu antibiyotiklerin MIC'larındaki artış ortak bir direnç mekanizmasını düşündürmektedir. Bazı yazarlar ampisiline dirençli beta-laktamaz negatif suşların diğer beta-laktamlara dirençli kabul edilmesi gerektiğini ileri sürmüşlerdir (2). Beta-laktamaz oluşturmayan, ancak disk difüzyon deneyinde ampisiline direnç veya orta direnç işareti zon veren suşlarda bu dirençliliğin MIC belirlemesi ile doğrulanması gerektiğini ileri sürenler de vardır (14).

Ayrıca az da olsa çoğul dirençli suşlar da bildirilmektedir. İnvaziv infeksiyonlardan sorumlu çoğul dirençli mikroorganizmaların empirik tedavisinde Amerikan Enfeksiyon Hastalıkları Komitesi sefuroksim, sefotaksim ve seftriaksonu önermektedir (23).

Türkiye'de ise bugüne kadar *Haemophilus* bakterileri ile yapılmış çalışmalar genellikle izolasyon ve identifikasyona yönelik çalışmalardır ve bazılarında incelenen suşların çeşitli antibiyotiklere duyarlılığı da bildirilmiştir.

1971'de Töreci (28) *Haemophilus* cinsinden hemolitik bakterilerde (*H.haemolyticus* ve *H.parahaemolyticus*) ampisilin direncini % 11 bulurken, kloramfenikole dirence rastlamamıştır. Aynı tür bakterilerde Çetin ve ark (8) ise 21 suşun 3'ünü kloramfenikole dirençli bulmuşlardır.

Mamal (20) 1985 yılında izole ettiği *H.influenzae* suşlarında amoksisiline % 12.5, kloramfenikole % 10, *H.parainfluenzae* suşlarında ise amoksisiline % 12, kloramfenikole % 16 direnç bildirmiştir. Aynı araştırmacı *H.haemolyticus* suşlarında amoksisiline direnç bulmazken, kloramfenikol direncini % 75 oranında saptamış, her 3 türde de sefotaksim ve seftriaksona dirençli suş bulmamıştır.

Candan ve Töreci (4)'nin 1988 yılında yaptıkları çalışmada *Haemophilus* cinsi bakterilerin ampisilin direnci % 7 bulunurken, ampisilin-sulbaktama direnç saptanmamıştır.

Durmaz ve ark (10) 1991 yılında kulak, burun ve konjunktiva salgılarından izole ettikleri 10 *Haemophilus* suşundan 3'ünde ampisilin direnci, 2'sinde amoksisilin-klavulanik asit direnci saptamışlar, kloramfenikole direnç bulmamışlardır.

Çalışmamızda ise ampisilin direnci ve beta-laktamaz pozitifliği *H.influenzae* ve *H.parainfluenzae* suşlarında sırasıyla % 22 ve % 6 bulunmuştur. Kloramfenikol direnci ise 58 *H.influenzae* suşundan birinde bulunmuştur. Mamal (20)'in sonuçlarına benzer şekilde sefalosporinlere direnç saptanmamıştır.

Çalışmamıza ve ülkemizde yapılan yukarıda değinilen çalışmaların sonuçlarına karşılık çok yüksek direnç oranlarının bildirildiği Küçükparaaslan ve ark (18)'in çalışmasında *H.influenzae* suşları ampisiline % 52.5, ampisilin-sulbaktama % 36.5, sefalosporinlere % 23-69.5, kloramfenikole % 15.5, siprofloksasine % 21 ve tetrasikline % 66 oranında dirençli bulunmuştur. *H.parainfluenzae* suşlarında ise ampisilin direnci % 71.5 olarak bulunmuş, diğer antibiyotiklere de yüksek oranlarda direnç saptanmıştır.

1994 yılında Vahaboğlu ve ark (29) 106 *H.influenzae* suşunda mikrodilüsyon yöntemi ile ampisilin direncini % 25, beta-laktamaz pozitifliğini % 21 olarak

bulmuşlardır. Aynı çalışmada *H. parainfluenzae* suşlarının % 16'sının beta-laktamaz oluşturduğu ve ampisiline dirençli olduğu, kloramfenikol direncinin (% 5) ve sefuroksim ve seftriakson direncinin (% 8) sadece *H. influenzae* suşlarında saptandığı bildirilmiştir. Bu çalışmada *H. influenzae* suşlarının % 5'inde beta-laktamaz oluşmadığı halde ampisilin direnci saptanması ve suşların % 5'inin ampisilin yanında sefuroksim, seftriakson ve kloramfenikole çoğul dirençli bulunması bizim bulgularımızdan başlıca farkları oluşturmaktadır.

Bu çalışmada *Haemophilus* suşlarında ampisilin ve kloramfenikol direnci Amerika ve Avustralya'dakinden ve İspanya ile Belçika dışındaki Avrupa ülkelerindekinden yüksek bulunmuştur.

Türkiye'de yapılan çalışmalar incelendiğinde, aynı bölgeden ve birbirine yakın yıllarda yapılan çalışmalarda bile farklı sonuçlar görülmektedir. Bu farklılıklar suşların izole edildikleri vücut bölgesine, hastaların yaşına ve duyarlık testinde kullanılan yöntemlere bağlı olabilir (19). Aslında NCCLS kriterlerine göre *Haemophilus* bakterilerinin antibiyotik duyarlık deneyleri için belirli antibiyotikler standardize edilmiş ve 1990 yılından beri hemolize edilmiş at kanlı MHA yerine HTM önerilmiştir (22). Buna karşılık bu besiyerinin kullanımında bazı problemler olduğu, bazı suşların üremediği bildirilmektedir (3, 9). Ancak çalışmamızda çukulata agarda üreyip bu besiyerinde üremeyen bir suşa rastlanmamıştır. Dolayısıyla *Haemophilus* suşlarının duyarlık deneylerinde standardize edilmiş besiyeri ve antibiyotiklerin kullanılıp kullanılmadığı, kaç µg'lık disk kullanıldığı son derece önemlidir. Türkiye'de bu bakterilerin antibiyotiklere direncinin gerçek sıklığı bu kriterlere uygun olarak yapılacak daha çok sayıda çalışma ile belirlenebilecektir.

KAYNAKLAR

1. Barrett FF, Taber LH, Morris CR, Stephenson WB, Clark DJ, Yow MD: A 12 year review of the antibiotic management of *Haemophilus influenzae* meningitis, *J Pediatr* 81: 370 (1972).
2. Barry AL, Fuchs PC, Pfaller MA: Susceptibilities of beta-lactamase-producing and nonproducing ampicillin-resistant strains of *Haemophilus influenzae* to ceftibuten, cefactor, cefuroxime, cefixime, cefotaxime and amoxicillin-clavulanic acid, *Antimicrob Agents Chemother* 37: 14 (1993).
3. Barry AL, Pfaller MA, Fuchs PC: *Haemophilus* Test Medium versus Mueller-Hinton Broth with lysed horse blood for antimicrobial susceptibility testing of four bacterial species, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 12: 548 (1993).
4. Candan İ, Töreci K: Mıyane maddelerinden izole edilen suşların ampisiline ve ampisilin+sulbaktam kombinasyonuna duyarlılıkları, *ANKEM Derg* 2: 251 (1988).
5. Clairoux N, Picard M, Brochu A, Rousseau N, Gourde P, Beauchamp D, Parr Jr TR, Bergeron MG, Malouin F: Molecular basis of the non-beta-lactamase-mediated resistance to beta-lactam antibiotics in strains of *Haemophilus influenzae* isolated in Canada, *Antimicrob Agents Chemother* 36: 1504 (1992).
6. Collignon PJ, Bell JM, MacInnes SJ, Gilbert GL, Toohey M and Australian Group for Antimicrobial Resistance: A national collaborative study of resistance to antimicrobial agents in *Haemophilus influenzae* in Australian hospitals, *J Antimicrob Chemother* 30: 153 (1992).

7. Cooksey RC: Mechanisms of resistance to antimicrobial agents, "A Balows, WJ Hausler Jr, KL Herrmann, HD Isenberg, HJ Shadomy (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, 5. baskı" kitabında s.1099, Am Soc Microbiol, Washington (1991).
8. Çetin ET, Anđ, Ö, Töreci K: 1968-1969 yıllarında izole ettiğimiz 1333 bakteri suşunun antibiyotiklere hassasiyeti, *İst Tıp Fak Mecm* 33: 615 (1970).
9. Doern GV: In vitro susceptibility testing of Haemophilus influenzae: Review of New National Committee for Clinical Laboratory Standards Recommendations, *J Clin Microbiol* 30: 3035 (1992).
10. Durmaz G, Koçođlu T, Akgün Y: Çeşitli klinik örneklerden izole edilen Haemophilus influenzae suşları ve antibiyotiklere duyarlılıkları, *Mikrobiyol Bült* 25: 305 (1991).
11. Espinassi F, Nordmann P, Commare MC: In-vitro selection of ampicillin-resistant non-beta-lactamase-producing Haemophilus influenzae strains, *J Antimicrob Chemother* 30: 232 (1992).
12. George MJ, Kitch B, Henderson FW, Gilligan PH: In vitro activity of orally administered antimicrobial agents against Haemophilus influenzae recovered from children monitored longitudinally in a group day-care-center, *Antimicrob Agents Chemother* 35: 1960 (1991).
13. Gunn BA, Woodall JB, Jones JF, Thornsberrry C: Ampicillin-resistant Haemophilus influenzae, *Lancet* 2: 845 (1974).
14. Heclan 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).
15. James PA, Hossain FK, Lewis DA, White DG: Beta-lactam susceptibility of Haemophilus influenzae strains showing reduced susceptibility to cefuroxime, *J Antimicrob Chemother* 32: 239 (1993).
16. Jorgensen JH, Doern GV, Maher LA, Howell AW, Redding JS: Antimicrobial resistance among respiratory isolates of Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis and Streptococcus pneumoniae in the United States, *Antimicrob Agents Chemother* 34: 2075 (1990).
17. Kilián M: Haemophilus "A Balows, WJ Hausler Jr, KL Herrmann, HD Isenberg, HJ Shadomy (eds): *Manual of Clinical Microbiology*, 5. baskı" kitabında s.463, Am Soc Microbiol, Washington (1991).
18. Küçükaraaslan A, Kocabeyođlu Ö, Emekdaş G: Klinik örneklerden Haemophilus cinsi bakterilerin izolasyon sıklığı ve antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması, *İnfeksiyon Derg* 5: 181 (1991).
19. Machka K, Braveny I, Dabernat H, Dornbusch K, VanDyck E, Kayser FH, Van Klingeren B, Mittermayer H, Perea E, Powell M: Distribution and resistance patterns of Haemophilus influenzae: A European cooperative study, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 7: 14 (1988).
20. Mamal M: İnsandan izole edilen Haemophilus cinsi bakteriler üzerine çalışmalar, *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 17: 1 (1987).
21. Mason Jr EO, Kaplan SL, Lamberth LB, Hinds DB, Kvernlund SJ, Loiselle EM, Feigin RD: Serotype and ampicillin susceptibility of Haemophilus influenzae causing systemic infections in children: 3 years of experience, *J Clin Microbiol* 15: 543 (1982).
22. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests, *Approved Standards M2-A4*, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova (1990).
23. Plotkin SA, Daum RS, Giebink GS, Hall CB, Lepow M, Marcuse EK, McCracken Jr GH, Phillips CF, Scott GB, Wright HT (Committee on Infectious Diseases): Treatment of bacterial meningitis, *Pediatrics* 81: 904 (1988).

24. Powell M: Chemotherapy for infections caused by *Haemophilus influenzae*: current problems and future prospects, *J Antimicrob Chemother* 27: 3 (1991).
25. Powell 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).
26. Reeves DS: Trends in resistance to antibacterials, "RC Spencer, EP Wright, SWB Newsom (eds): *Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology*" kitabında s.492, Intercept, Andover (1994).
27. Scriver SR, Walmsley SL, Kau CL, Hoban DJ, Brunton J, McGeer A, Moore TC, Witwicki E (Canadian *Haemophilus* Study Group) and Low DE: Determination of antimicrobial susceptibilities of Canadian isolates of *Haemophilus influenzae* and characterization of their beta-lactamases, *Antimicrob Agents Chemother* 38: 1678 (1994).
28. Töreci K: Muayene maddelerinden izole edilen *Haemophilus* cinsinden hemolitik bakterilerin çeşitli özellikleri, *1st Tıp Fak Mecm* 34: 545 (1971).
29. Vahaboğlu MH, Mülazımoğlu L, Yıldırım İ, Avkan V, Taşer B: Nasopharyngeal carriage rate and antimicrobial resistance of *Haemophilus influenzae* in Istanbul-Türkiye, *Marmara Med J* 7: 78 (1994).
30. Young LM, Haddow JE, Klein JO: Relapse following ampicillin treatment of acute *Haemophilus influenzae* meningitis, *Pediatrics* 41: 516 (1968).