

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* SUŞLARININ ÇEŞİTLİ ANTİMİKROBİK İLAÇLARA İN-VİTRO DUYARLILIĞI

IN-VITRO ACTIVITY OF ANTIMICROBIAL AGENTS AGAINST *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* STRAINS ISOLATED FROM VARIOUS CLINICAL SPECIMENS

Fatma BUDAK*, Deniz GÜR**

ÖZET: Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarına 2000-2002 yılları arasında gelen klinik örneklerden izole edilen 127 *Haemophilus influenzae* suşunun 13 antimikrobik ilaca in-vitro duyarlılığı NCCLS standartlarına uyularak disk difüzyon yöntemi ile araştırılmış, beta-laktamaz aktivitesi nitrosefin yöntemi ile belirlenmiştir. Ampisiline %5.6, trimetoprim sulfametoksazole (TMP/SMX) %27.5, tetrasikline %8.6, klaritromisine %7, kloramfenikole %4.7 oranında direnç gözlenirken, suşların hiç birinde ampicilin-sulbaktam, sefaklor, sefuroksim, sefprozil, sefpodoksime, sefotaksim, meropenem ve siprofloksasine direnç saptanmamıştır. Ampisiline dirençli tüm suşlarda beta-laktamaz aktivitesi gösterilmiştir. Beş izolatta (%3.9) çoğul direnç saptanmıştır. Bu sonuçlar, toplum kökenli *H.influenzae* izolatlarında ampiciline direncin diğer Avrupa ülkelerine kıyasla daha düşük olduğunu, ancak TMP/SMX ve tetrasikline karşı direncin yüksek olduğunu göstermektedir.

Anahtar sözcükler: *Haemophilus influenzae*, direnç, beta-laktamaz.

ABSTRACT: In-vitro activity of several antimicrobial agents were evaluated against *Haemophilus influenzae* (n:127) isolated from clinical specimens within the years 2000 and 2002 in a children's hospital. Antimicrobial susceptibility tests were performed by disk diffusion method according to the recommendations of the NCCLS standards and beta-lactamase activity was investigated by nitrocefin test. Resistance rates for the antibiotics were as follows: ampicillin 5.6%, trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP/SMX) 27.5%, tetracycline 8.6%, clarithromycin 7%, chloramphenicol 4.7%. Five isolates (3.9%) were found multiple resistant. Beta-lactamase activities were detected in all of the ampicillin resistant isolates. None of the isolates were resistant to ampicillin-sulbactam, cefaclor, cefuroxime, cefprozil, cefpodoxime, cefotaxime, meropenem or ciprofloxacin. According to these results, resistance to ampicillin is low in our *H.influenzae* isolates compared to other

* Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli.

** Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İ. Doğanmacı Çocuk Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

European countries but resistance to TMP/SMX is very high and this finding has to be taken into account in the empirical therapy of community acquired respiratory tract infections.

Key words: Haemophilus influenzae, antibiotic resistance, beta-lactamase.

GİRİŞ

Haemophilus influenzae konjonktivit, otitis media, toplum kaynaklı pnömoni gibi sık görülen ve kolay tedavi edilebilen enfeksiyonlar yanında, menenjit, perikardit gibi ciddi enfeksiyonlara da neden olabilmektedir. Son 20 yıldır ampisilin, penisilin, kloramfenikol, TMP/SMX ve tetrasikline karşı gelişen direnç tüm dünyada bildirilmeye başlanmıştır^{1,2}. Buna karşın, direnç oranlarının coğrafi bölgeye göre farklılık göstermesi, bu mikroorganizmaların etken olabileceği enfeksiyonlarda ampirik tedaviye karar vermek için bölgesel direnç oranları ile ilgili verilere sahip olmayı gerekli kılmaktadır.

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi İhsan Doğramacı Çocuk Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında, çocuk hastaların klinik örneklerinden izole edilen *H.influenzae* suşlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılığını belirlemek amacıyla yapılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Ocak 2000 ile Şubat 2002 tarihleri arasında hastaneye başvuran çocuk hastalardan alınan klinik örneklerden üretilen 127 *H.influenzae* suşu alındı.

İzolasyon ve tanımlama: Klinik örnekler at kanlı çukulata agar besiyerine (blood agar base (Oxoid) + %5 at kanı + 300 mg/L basitrasin) ekilerek, 35°C'da ve %5 CO₂'de inkübe edildi. Balgam örnekleri doğrudan mikroskopik olarak incelendi, 100'lük büyütmede her sahada 10'dan fazla epitel hücresi içeren örnekler çalışmaya alınmadı. Koloni morfolojisi ve Gram boyanma özelliklerine göre *Haemophilus* olduğu düşünülen bakterilere X ve V diskleri (Oxoid) uygulandı ve sadece XV çevresinde üreyen bakterilere kristal testi yapılarak (BBL Crystal N/H tanı paneli, Becton Dickinson, USA) bakteri tanısı doğrulandı³.

Beta-laktamaz testi: Beta-laktamaz varlığı nitrosefin testi ile araştırıldı. Nitrosefin çözeltisi (Oxoid) üreticinin önerileri doğrultusunda hazırlandı ve 1 dakika içinde sarı olan çözeltinin rengini pembe-kırmızı renge dönüştüren bakteriler, beta-laktamaz pozitif kabul edildi⁴.

Antimikrobik duyarlılık testleri: Antimikrobik duyarlılık testleri NCCLS standartlarına göre "Haemophilus Test Medium"da (HTM, Oxoid) disk difüzyon yöntemi ile araştırıldı⁵. Duyarlılık testlerinde, ampisilin (AMP, 10 µg), ampisilin-sulbaktam (SAM, 10/10 µg), sefotaksim (CTX, 30 µg), sefuroksim (CXM, 30 µg), sefaklor (CEC, 30 µg), sefpodoksime (CPD, 10 µg), sefprozil (CPR, 30 µg), klaritromisin (CLR, 15 µg), kloramfenikol (CHL, 30 µg), trimetoprim-sulfametoksazol (TMP/SMX, 1.25/23.75 µg), meropenem (MEM, 10 µg), siprofloksasin (CIP, 5 µg) diskleri (Oxoid) kullanıldı. Kontrol suş olarak *H.influenzae* ATTC 49247 çalışıldı.

Plaklar, 35°C'de %5 CO₂ içeren etüvde 18 saat inkübe edildikten sonra inhibisyon zon çapları ölçülerek NCCLS standartlarına göre duyarlı, orta duyarlı ya da dirençli olarak yorumlandı⁶.

BULGULAR

H.influenzae izole edilen örneklerin 79'u solunum yollarından alınmış olup, suşların izole edildiği klinik örneklerle göre dağılımı Tablo I'de görülmektedir.

Tablo I: *H.influenzae* Suşlarının Klinik Örneklerle Göre Dağılımı

Klinik Örnek	n	%
Solunum yolu örnekleri		
Balgam	68	53.5
Bronkoalveolar lavaj	9	7.0
Derin trakeal aspirat	1	0.7
Torasentez mayi	1	0.7
Püy	33	25.9
Konjonktiva sürüntüsü	8	6.23
Kan	5	3.9
İdrar	1	0.7
BOS	1	0.7
Toplam	127	100

Çalışmaya alınan 127 *H.influenzae* suşundan, 7'sinin (%5.5) beta-laktamaz ürettiği saptanmış, bunların 5'i disk difüzyon testinde ampisiline orta duyarlı, 2'si ise dirençli çıkmıştır.

İzolatların antimikrobik ilaçlara direnç oranları, Tablo II'de gösterilmiştir. Antimikrobik ilaçlara "orta duyarlı" olan izolatlar da "dirençli" olarak yorumlanmıştır.

Tablo II: *H. influenzae'* nin Çeşitli Antibiyotiklere İn-vitro Duyarlılık ve Direnç Oranları (n:127)

Antibiyotik	Duyarlı		Orta Duyarlı		Dirençli	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Ampisilin	120	94.4	5	3.9	2	1.5
Ampisilin-sulbaktam	127	100	0	—	0	—
Sefotaksim	127	100	0	—	0	—
Sefuroksim	127	100	0	—	0	—
Sefaklor	127	100	0	—	0	—
Sefpodoksım	127	100	0	—	0	—
Sefprozil	127	100	0	—	0	—
Klaritromisin	118	92.9	9	7.0	0	—
Meropenem	127	100	0	—	0	—
TMP/SMX	92	72.4	2	1.5	33	25.9
Kloramfenikol	121	95.2	0	—	6	4.7
Siprofloksasin	127	100	0	—	0	—
Tetrasiklin	116	91.3	2	1.5	9	7.0

Ampisiline dirençli bulunan 7 suşun 6'sında, aynı anda bir veya birden fazla antibiyotiğe direnç bulunmuştur. Otuz beş izolat, TMP/SMX'e dirençli çıkmış, bunların 28'inde direnç sadece bu antibiyotiğe karşı iken, 7 izolatta diğer antibiyotiklere direnç ile birlikte gözlenmiştir. Tetrasikline direnç gösteren 11 izolatın 7'sinde, kloramfenikole dirençli 6 izolatın tümünde aynı zamanda başka bir antibiyotiğe de direnç gözlenmiştir. Klaritromisine, sadece 9 izolatta "orta derecede" direnç saptanmış ve bunların hiç birinde çoğul direnç gözlenmemiştir. *H.influenzae*'da gözlenen çoğul direnç paternleri Tablo III'de gösterilmiştir.

Tablo III: *H.influenzae*'da Gözlenen Antibiyotiklere Direnç Paternleri

Direnç Paterni	İzolat Sayısı
Amp, T/S, Chl, Tet*	4
T/S, Tet	2
Amp, Chl, Tet	1
Amp, T/S	1
Amp, Chl	1

* Amp: ampisilin, T/S: trimetoprim sulfametoksazol,
Chl: kloramfenikol, Tet: tetrasiklin

TARTIŞMA

H.influenzae'da, ilk kez 1970 yılında tetrasikline direnç, 1972 yılında kloramfenikol, 1974 yılında ise ampisiline direnç bildirilmiştir⁷. Ampisiline karşı direncin en önemli mekanizması, beta-laktamaz üretimidir. Tanımlanan iki enzimden TEM-1, beta-laktamaz pozitif türlerin %90'ında bulunurken, ROB-1 daha az sıklıkta bildirilmektedir⁷⁻¹⁰. Her iki enzim de beta-laktamaz inhibitörleri ile inhibe olmakta ve sefalosporinleri etkilememektedir⁹.

Beta-laktamaz üretmeyip ampisiline dirençli olan suşlar (BLNAR), penisilin bağlayan proteinler (PBP), özellikle de PBP3A ve PBP3B'nin duyarlılıklarındaki değişimler sonucu ortaya çıkmıştır¹¹. Bu tip dirençte ampisiline direncin yanında sefalotin, sefaklor ve sefaklor gibi sefamlerin yanında imipeneme karşı da direnç oluşabilmektedir⁹. Çalışmamızda 7 (%5.6) suş ampisiline in-vitro olarak dirençli bulunmuştur. İnhibisyon zon çaplarına göre bunların 5'i orta duyarlı, 2'si dirençli olarak yorumlanmıştır. Dirençli bulunan tüm suşlarda beta-laktamaz aktivitesi gösterilmiş, BLNAR izolata rastlanmamıştır.

Bazı çalışmalarda beta-laktamaz pozitif olmasına karşın, disk difüzyon testinde ampisiline duyarlı görünen izolatlar bildirilmiş ve bu sonuç 10µg'lık ampisilin disklerinin kullanımı sonucunda beta-laktamaz miktarının az olduğu suşlarda uyumsuz sonuçlar alınabilmesine bağlanmıştır¹². Bu nedenle *H.influenzae*'da ampisiline direnç araştırılırken beta-laktamaz varlığının da belirlenmesi önerilmektedir⁶. Bu çalışmada ampisiline direnç ile beta-laktamaz varlığı uyumlu bulunmuştur.

H.influenzae için yapılan antimikrobik duyarlılık testlerinde "Haemophilus test medium" (HTM) kullanılması ve plakların CO₂'li ortamda inkübe edilmesi gerekmektedir. Bu önerilere uyulmayan araştırmalarda alınan sonuçlar yanıltıcı olmaktadır⁶. Ülkemizde *H.influenzae*'nin ampisiline direnç oranları NCCLS standartlarına uyularak yapılan çeşitli araştırmalarda, %4 ile %12.7 arasında bulunmuştur¹³⁻¹⁸. Berkiten ve arkadaşlarının¹⁵ araştırmasında, 1994-1997 yılları arasında toplanan ve tümü solunum yolu izolatu olan 314 izolatu ampisiline direnç oranı %9 olarak verilmiştir. Ülkemizde yapılan ve dört merkezin katıldığı diğer bir çalışmada, 272 izolatta ampisiline genel direnç %8.8 olarak bulunmuş, bunlardan %7'sinde beta-laktamaz varlığı saptanmış, %3 oranında BLNAR bildirilmiştir¹⁸.

H.influenzae'da ampisilin direnci, tüm dünyada 1980'lerden itibaren artmaya başlamış olup, coğrafi farklılıklar göstermektedir^{9,19}. Bu oran 1998 yılında yapılan bir çalışmada, Fransa'da %22.2, İngiltere'de %19, Almanya'da %6.7 ve İtalya'da %2 olarak bulunmuştur². Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan bir çalışmada ise, 1562 izolatu %28.9'unda beta-laktamaz aktivitesi saptanmıştır¹⁹. BLNAR izolatların oranı ise düşük düzeydedir^{2,19}.

Bu çalışmada TMP/SMX direnci, orta dirençli izolatlar ile birlikte %27.5 oranında bulunmuştur. Bu oran ülkemizde daha önce yapılan çalışmalarda oranlara çok yakındır^{14,17,18}. SENTRY çalışmasında, 1997-1999 yılları arasında toplanan izolatlarda A.B.D.'de TMP/SMX'e direnç oranı %14.6, Latin Amerika'da %30.8, Avrupa'da ise %17.8 olarak bildirilmiştir²⁰. Tetrasikline direnç 11 suşta (%8.6) saptanmıştır. Bu oran ülkemizde son yıllarda bildirilen oranlara yakındır^{16,17}. Ancak, Avrupa ülkelerinde %2.6 civarında, A.B.D.'de ise %0.7 oranında bildirilen dirençten oldukça yüksektir²⁰. İzolatların %4.7'si kloramfenikole dirençli bulunmuştur. Bu oran Gür ve arkadaşlarının¹⁸ çok merkezli araştırmalarında bulduğu direnç oranı ile tamamen aynıdır. Berkiten'in¹⁵ çalışmasında, %2 oranında kloramfenikol direnci bulunmuştur. Buna karşın Avrupa'da %1.6, A.B.D.'de ise %0.4 olarak bildirilmiştir²⁰.

Çalışmamızda ampisilin-sulbaktam, sefaklor, sefuroksim, sefprozil, sefpodoksime, sefotaksim ve meropenem direnç saptanmamıştır. Ampisilin-sulbaktam, sefaklor, sefuroksim, sefprozil, sefpodoksime direnç BLNAR izolatlarda ortaya çıkabilmektedir, buna karşın bizim çalışmamızda BLNAR izolat saptanmadığından bu antibiyotiklere karşı direnç gözlenmemesi de beklenen bir sonuçtur. Üçüncü kuşak sefalosporinlere direnç ise henüz *H.influenzae*'da bildirilmemiştir^{9,21}. Dünyada kinolon antibiyotiklere karşı dirençli ilk suş, 1994 yılında bildirilmiştir, ancak dirençli suşlar hala çok ender bulunmaktadır^{2,20}. Avrupa'da toplanan 1283 suşun hiçbirinde kinolon grubu antibiyotiklere direnç gözlenmemiştir²⁰. Bizim çalışmamızda da siprofloksasine karşı direnç bulunmamıştır.

Ampisiline dirençli suşlarımızın çoğunda, kloramfenikol ve tetrasikline de direnç bulunmuştur. Suşların 4'ünde dört farklı antibiyotik, birinde ise üç farklı antibiyotik çoğul direnç olduğu belirlenmiştir. Çoğul direncin bu çalışmada düşük olmasına karşın, bir çok antibiyotik karşı direnç geninin ampisiline direnç geni ile aynı transpozonda bulunması, ampisiline dirençli izolatlarda artış olduğunda çoğul direncin de artacağını düşündürmektedir²².

Sonuç olarak bu çalışma, *H.influenzae* izolatlarında ampicilin direncinin ülkemizde henüz çok yüksek olmadığını bir kez daha göstermiştir. Buna karşın TMP/SMX, tetrasiklin ve kloramfenikole karşı direncin, bizim suşlarımızda Avrupa'ya kıyasla daha yüksek bulunması, ülkemizde bu etkene yönelik ampirik tedavi açısından dikkate alınmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Grünberg RN, Felmingham D and the Alexander Project Group: Results of the Alexander Project: A continuing, multicenter study of the antimicrobial susceptibility of community-acquired lower respiratory tract bacterial pathogens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996, 25: 169-181.
2. Schito GC, Debbia EA, Marchese A: The evolving threat of antibiotic resistance in Europe: New data from the Alexander Project. *J Antimicrob Chemother* 2000, 46: 3-9.
3. Konemann EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr.WC: *Haemophilus*, pp: 363-393. In: *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 1997, 5th ed. Lippincott Philadelphia, New York.
4. Doern GV, Jones RN, Gerlach EH, et al: Multicenter clinical laboratory evaluation of beta-lactamase disk assay employing a novel chromogenic cephalosporin. *J Clin Microbiol* 1995, 33: 1665-1667.
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 1997, 6th ed. Approved Standards NCCLS Document M-2-A6. NCCLS, Wayne Pa.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 2002, 12th Informational Supplement M-100-S12. NCCLS, Wayne Pa.
7. Medeiros AA, O'Brien TE: Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b possessing a TEM-type enzyme but little permeability barrier to ampicillin. *Lancet* 1975, i: 716-719.
8. Anderson JR Smith MD, Kibbler CC, Holton J, Scott GM: A nosocomial outbreak due to non-encapsulated *Haemophilus influenzae*. Analysis of plasmids coding for antibiotic resistance. *J Hospital Infect* 1994, 27: 17-27.
9. Goldstein FW, Acar JF: Epidemiology of antibiotic resistance in *Haemophilus influenzae*. *Microbial Drug Resistance* 1995, 1: 131-135.
10. Felmingham D: Respiratory pathogens: Assessing resistance patterns in Europe and the potential role of grepafloxacin as treatment of patients with infections caused by these organisms. *J Antimicrob Chemother* 2000, 45: T2,1-8.
11. Clairoux N, Picard M, Brochu A, et al: Molecular basis of the non beta-lactamase mediated resistance to beta-lactam antibiotics in strains of *Haemophilus influenzae* isolated in Canada. *Antimicrob Agents Chemother* 1992, 36: 1504-1513.
12. Livermore DM: Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995, 8: 557-584.
13. Saydam C, Tünger A, Özinel MA, Tokbaş A: *Haemophilus influenzae* kökenlerinin serotipleri, beta-laktamaz salgılama özellikleri ve antibiyotik duyarlılıkları. *ANKEM Derg* 1996, 10: 415-418.
14. Torun MM, Alkan E, Altinkum SM, Aksın E, Kulaksız B, Yüksel P: *Haemophilus influenzae*'da antimikrobiklere direnç sıklığı. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 1998, 28: 49-57.
15. Berkiten R, Gürol DS: Solunum yolu örneklerinden izole edilen *Haemophilus influenzae* suşlarında antibiyotiklere direnç. *ANKEM Derg* 1998, 12: 492-496.
16. Dündar G, Pakize İ: *Haemophilus* kökenlerinin antimikrobik maddelere duyarlılıkları ve beta-laktamaz aktiviteleri. 9. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi, 3-8 Ekim 1999, Antalya.
17. Eşel D, Karaca N, Sümerkan B: Klinik örneklerden izole edilen *Haemophilus influenzae* suşlarında antibiyotiklere duyarlılık. *ANKEM Derg* 2000, 14: 555-559.

18. Gür D, Özalp M, Sümerkan B, et al: Prevalence of antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* and *Streptococcus pyogenes*: Results of a multicenter study in Turkey. *Int J Antimicrob Agents* 2002, 19: 207-211.
19. Karlowsky JA, Draghi DC, Thornsberry C, Jones ME, Critchley IA, Sahm DF: Antimicrobial susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* isolated in two successive respiratory seasons in the US. *Int J Antimicrob Agents* 2002, 20: 76-85.
20. Hoban DJ, Doern GV, Fluit AC, Roussel-Delvallez M, Jones RN: Worldwide prevalence of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *CID* 2001, 32 (Suppl 2): 81-93.
21. Baquero F, Barrett JF, Courvalin P, Morrissey I, Piddock L, Novick WJ: Epidemiology and mechanisms of resistance among respiratory tract pathogens. *Clin Microbiol Infect* 1998, 4 (Suppl.2): 19-26.
22. Levy J, Verhaegen G, de Mol P, Couturier M, et al: Molecular characterization of resistance plasmids in epidemiologically unrelated strains of multiresistant *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis* 1993, 168: 177.