(Mikrobiyol Bült, 25: 305-312, 1991)

ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN HAEMOPHILUS INFLUENZAE SUŞLARI VE ANTİBİYOTİKLERE DUYARLILIKLARI

HAEMOPHILUS INFLUENZAE STRAINS ISOLATED FROM VARIOUS CLINICAL SPECIMENS AND THEIR ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITIES

Gül DURMAZ*, Tülay KOÇOĞLU, Yurdanur AKGÜN*****

Özet: Bu çalışmada 0-6 yaş grubunda 135,6 yaş üzeri grupta 335 hastadan alınan burun, kulak ve konjonktiva örneklerinden H.influenzae izolasyonuna yönelik bakteriyolojik inceleme yapıldı. Altısı tip b olmak üzere 10 H.influenzae izole edildi. İzolasyonların 7'si 6 yaş altındaki gruptandı (% 5.2). Kirby-Bauer disk diffüzyon yöntemi ile yapılan antibiyotik duyarlılık deneyinde tüm suşlar kloramfenikole duyarlı, 3 suş ampisiline dirençli bulundu.

Summary: In this study, a bacteriological examination was performed in the specimens of nose, ear and conjunctiva taken from 135 patients aged between 0-6 years old and 335 patients aged more than six years old for the isolation of H.influenzae. Ten H.influenzae strains were isolated, six of them were type b. Seven isolates were from 0-6 years old group (5.2%). All strains were susceptible to chloramphenicol, three strains were resistant to ampicillin with Kirby-Bauer disc diffusion method.

G İ R İ Ş

H.influenzae, 2 ay-5 yaş arası çocuklarda ciddi ve tedavi edilmediğinde fatal sonlanabilen infeksiyonlara yol açan, kuruluk, soğuk gibi dış koşullara dayanıksız, çok hassas bir bakteridir. Üretilmeleri için özel besiyerlerine gereksinimleri vardır (1, 2). Bu çalışmada küçük çocuklarda sıklıkla ciddi infeksiyonlara neden olabilen, izolasyonu özel bir ilgi ve dikkat isteyen bu bakterinin uygun transport ve kültür besiyerleri kullanarak, sık izole edilmesi beklenen bazı klinik örneklerden izolasyon oranı ve üretilen suşların antibiyotiklere duyarlılığı araştırıldı.

* Uzm. Dr., Anadolu Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı.

** Yard. Doç., Anadolu Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı.

*** Doç. Dr., Anadolu Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı.

GEREÇ ve YÖNTEM

Anadolu Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına Mayıs 1989-Ocak 1990 tarihleri arasında 0-6 yaş arası 135 ve 6 yaş üzeri 335 hastadan gönderilen burun, kulak akıntısı ve konjonktiva sürüntüsü örnekleri çalışmaya alındı. Burun ve konjonktiva örnekleri, akut sinüzit ve konjonktivitli hastalardan; kulak akıntısı örneklerinin büyük çoğunluğu akut otitis media tanılı ve kalan bölümü kronik otitis media ve otitis eksterna tanılı hastalardan alındı. Burun örnekleri spekülum yardımıyla sinüs ağzından alındı. Tüm örnekler steril eküvyonla alınarak modifiye Stuart transport besiyerinde (Difco) laboratuvara ulaştırıldı. Örneklerin bir kısmının transportunda adi buyyon kullanıldı. 220 örnek kanlı ve EMB agar dışında çukulata, Fildes (Difco) ve GC medium base + Hemoglobin + Supplement BVX-Bacitracin, Factor V ve X (Difco) içeren besiyerlerine ekildi. 250 örnek rutin besiyerlerinin yanısıra yalnızca çukulata agara ekildi. Kulak örnekleri ayrıca Sabouraud dextrose agara da ekildi. Kültürler 37 °C'de 48 saat aerob koşullarda inkübe edildi. İnkübasyonda H.influenzae izolasyonu için mutlak gerekli olmaması nedeniyle CO_2 kavanozu kullanılmadı (1, 2).

Koloni ve mikroskopik özellikleriyle H.influenzae olduğu düşünülen suşlar Brain-Heart infüzyon agara pasajlanarak üzerine BV, BX ve BVX (Difco) diskleri 2 cm aralıklarla yerleştirildi. BV ve BX diskleri etrafında üremeyip yalnızca BVX diskleri etrafında üreyenler H.influenzae polivalan antiserumu (Difco) ile muamele edildiler. Aglütinasyon verenler tip b antiserumu ile test edildiler. Tip b ile reaksiyon vermeyenler diğer tipler için serumlarımız bulunmadığından tiplendirilemeyen ve polivalan serum ile reaksiyon vermeyen suşlar kapsülsüz olarak belirlendi (2). Diğer mikroorganizmalar standart mikrobiyolojik yöntemlerle tanımlandı.

İzole edilen suşların antibiyotik duyarlılıkları, çukulata agarda, Kirby-Bauer disk diffüzyon yöntemi ile belirlendi.

B U L G U L A R

0-6 yaş grubuna ait toplam 135 örnekte, burundan 1, konjonktivadan 4, kulaktan 2; 6 yaş üzeri gruba ait 335 örnekte ise, burundan 3 H.influenzae izolasyonu yapılmıştır. 0-6 yaş grubunda izolasyon oranı % 5.2, 6 yaş üzeri grupta % 0.8'dir (Tablo 1).

Burun, kulak akıntısı ve konjonktiva sürüntüsü örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar Tablo 2, 3 ve 4'de gösterilmektedir. Antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo 5'de gösterilmiştir.

İzolasyonlar yalnızca çukulata agara ekilmiş örnek grubundan yapılmış olduğu için diğer besiyerleri ile çukulata agarın üstünlük yönünden karşılaştı-

rılması yapılamamıştır. Suşlardan biri kanlı agarda stafilokok koloniler etrafında, biri pnömokok kolonileri etrafında ve geriye kalan 8 suş ise yalnızca çukulata agarda saf olarak üremiştir.

Tablo 1

İzole Edilen H.influenzae Suşlarının Klinik Örnek ve Yaş Gruplarına Dağılımı

	0 - 6 Yaş		6 Yaş Üzeri	
Örnek	Sayı	H.inf tip b Üretilen	Sayı	H.inf tip b Üretilen
Burun	54	1	140	3*
Kulak	30	2	36	–
Konjonktiva	51	4**	159	–
Toplam	**135**	**7 (% 5.2)**	**335**	**3 (% 0.8)**

* Bunlardan biri tiplendirilemeyen.
** İkisi tiplendirilemeyen, biri kapsülsüz.

Tablo 2

Burun Kültürlerinde Üreyen Bakteriler

	Sayı	%
S.aureus	20	10.3
Pnömokok	12	6.1
Proteus	6	3.1
Koliform	3	1.6
H.influenzae	3	1.6
Beta hemolitik strep.	1	0.5
Normal flora	149	76.8
Toplam	**194**	**100.0**

Tablo 3

Kulak Akıntısı Örneklerinde Üreyen Mikroorganizmalar

	Sayı	%
Psödomonas	8	12.1
Koliform	4	6.1
E.coli	3	4.6
Proteus	2	3.0
S.aureus	2	3.0
Pnömokok	2	3.0
H.influenzae	2	3.0
A Gr.beta hem.strep.	1	1.5
A.niger	1	1.5
Normal flora	37	56.1
Üreme yok	4	6.1
Toplam	**66**	**100.0**

Tablo 4

Konjonktiva Örneklerinde Üreyen Mikroorganizmalar

	Sayı	%
Pnömokok	14	6.7
Koag (−) Staf.	10	4.8
S.aureus	5	2.4
H.influenzae	4	1.9
Psödomonas	4	1.9
A Gr.beta hem.strep.	1	0.5
Candida + Neisseria	1	0.5
Normal flora	36	17.1
Üreme yok	135	64.2
Toplam	**210**	**100.0**

Tablo 5

H.influenzae Suşlarının Antibiyotiklere Duyarlılıkları

	C	AMP	AMC	CTX	SXT
Duyarlı	10	7	8	6	6
Dirençli	0	3	2	4	4

C: Kloramfenikol, AMP: Ampisilin, AMC: Amoksisilin-Klavulanik asit, CTX: Sefotaksim, SXT: Trimetoprim sulfametoksazol.

T A R T I Ş M A

Haemophilus influenzae, özellikle küçük çocuklarda menenjit, epiglottit ve bakteriyemi gibi invazif ve tedavi edilmediği zaman ölümle sonlanabilen, oldukça ciddi infeksiyonlara neden olmaktadır. Ayrıca tüm yaş gruplarında otitis media, sinüzit ve konjonktivit etyolojisinde rolü büyük olup pnömokoktan sonra ikinci sırada yer almaktadır (1, 3-6). Ancak H.influenzae, organizma dışında oldukça dayanıksız, kuruluk ve soğuğa son derece duyarlı, oda ısısında bekletilen hasta örneklerinde bile hızla ölen, özel üreme koşulları gerektiren nazik bir bakteridir (1, 2). Bu nedenle de üst solunum yolları ve çevresini ilgilendiren infeksiyonlarda ve komplikasyonlarında bu denli önemi olan H.influenzae'nın izolasyon oranı beklenen düzeyde olmamaktadır.

Çalışmamızda H.influenzae izolasyon sıklığı tüm yaş gruplarında % 2.1, 0-6 yaş grubunda ise % 5.2 olarak saptanmıştır. Ülkemizde daha önce yapılan ve H.influenzae'nın etyolojide önemli rol oynadığı çeşitli infeksiyonlarla ilişkili çalışmalarda izolasyon oranının % 0-13.5 arasında değiştiği bildirilmiştir (7-15). Bu çalışmaların bir kısmında izolasyon azlığına dikkat çekilmiştir (7-10). Bizim çalışmamız da dahil olmak üzere, H.influenzae izolasyon oranının beklenen düzeyde olmayışının çeşitli nedenleri olabilir. Bunların başında, örneklerin alındıktan sonra laboratuvara ulaştırılmasındaki gecikme olasılığı gelmektedir. Örneğin, konjonktiva sürüntülerinin hasta başında ekilmesi önerilmektedir (6). Gecikme olasılığının ortadan kaldırılabilmesi için klinisyen-laboratuvarcı işbirliği şarttır. Ayrıca örneklerin laboratuvara gönderilmesinde transport besiyerlerinin gereği vurgulanmaktadır (2). Çalışmamızda hasta başı ekimi uygulanmamakla birlikte örneklerin çoğu Stuart transport besiyerinde laboratuvara gönderilmiştir.

Diğer taraftan bakterinin hassasiyeti yanında, H.influenzae'nın bazı infeksiyonlarının sıklığı bakımından ülkeler arasında farklılıklar olabileceği yorumu da yapılabilir. Nitekim 1 ay-6 yaş arası akut bakteriyel menenjitlerde

etyolojik sıralamada A.B.D.'de H.influenzae birinci sırada yer alırken İngiltere'de ilk sırada N.meningitidis bulunmaktadır (16).

En yüksek oranların bildirildiği Mamal'ın çalışmasında (15), çeşitli klinik örneklerde Haemophilus türleri kapsamlı bir şekilde araştırılmış ve üretilen H.influenzae suşlarının biyotip ve serotiplendirilmeleri yapılmıştır. Basitrasinli balıklı çukulata agarın kullanıldığı bu çalışmada H.influenzae izolasyonlarının yarısı 196 boğaz kültüründen yapılmıştır (% 9.7). İzolatların yaklaşık yarısı tip b'dir. Üst solunum yollarından H.influenzae izolasyonu normal bir bulgu olarak değerlendirilmekte ve taşıganlık şeklinde yorumlanmaktadır. A.B.D.'de üst solunum yolunda H.influenzae taşıganlığı % 50-80 ve Hib taşıganlığı % 2-4 civarındadır (3). Ülkemizde Berkman'ın 1249 kişiyi kapsayan çalışmasında boğazda taşıganlık oranı H.influenzae için % 2.9, Hib için % 0.9 olarak bulunmuştur (9). Ancak üst solunum yolunda taşıganlık oranı yaşla değişmekte, çocuklarda daha yüksek oranlarda olmaktadır (1). Her iki çalışma arasında yaş grupları, çalışmanın yapıldığı mevsim ve yöntem bakımından farklılıklar olabilir. Mamal'ın tip b sonucu dışında diğer çalışmaların sonuçları ve bizim bulgularımız H.influenzae taşıganlığı / infeksiyonunun ülkemizde A.B.D.'ye oranla daha az sıklıkta olabileceğini düşündürse de sanırız daha kapsamlı ve dikkatli araştırmaların yapılmasına gerek vardır.

Çalışmamızda 220 hasta örneği çukulata ve Fildes agar ile içeriğinde GC medium base + Hemoglobin + Supplement BVX bulunan besiyerine ekilmiş, 250 örnek ise yalnız çukulata agara ekilmiştir. İzolasyonlarımızın tümü de bu ikinci gruptan olduğu için besiyerlerinin üstünlük yönünden karşılaştırılması mümkün olmamıştır. İzole edilen 10 suştan 6'sı, H.influenzae'ya bağlı akut infeksiyonların çoğunluğundan sorumlu olan tip b'dir (1). Mamal'ın çalışmasında da tip b, çeşitli klinik örneklerden en çok izole edilen serotip olarak bulunmuştur (15).

Antibiyotik duyarlılık sonuçları gözden geçirildiğinde (Tablo 5), suşların tümünün kloramfenikole duyarlı, üçünün ampisiline dirençli olduğu görülmektedir. 1970 yılı başlarına kadar H.influenzae suşlarının ampisilin ve kloramfenikole duyarlı olduğu ancak son yıllarda değişen oranlarda direnç geliştiği bildirilmektedir (2, 3). Ampisilin direnci A.B.D.'de % 20 oranındadır ve esasen beta laktamaza bağlıdır. Kromozomal direnç daha düşük oranda ve penisilin bağlayan proteinlerdeki değişiklikle ilişkilidir (2). Bizim çalışmamızda 2 suşun beta laktamaz inhibitörlü bir ilaç olan amoksisilin-klavulanik aside dirençli olduğu bulunmuştur. Bu durum çeşitli beta laktamazların varlığı ve beta laktamaz inhibitörlerine duyarlılıklarının farklılığı ile açıklanabilir. Mamal'ın çalışmasında 41 H.influenzae suşunun

kloramfenikol duyarlılığı % 90, amoksisilin duyarlılığı % 87.5 bulunmuştur (17). Bu sonuçlar bizim sonuçlarımıza yakındır. Bir başka çalışmada da 81 Haemophilus cinsi bakterinin ampisiline direnci % 7 bulunurken ampisilin-sulbaktama direnç saptanmamıştır (18).

Sonuçta izolasyon oranımız beklenen düzeyde olmasa da H.influenzae'nın 0-6 yaş grubunda % 5.2'ye varan prevalansı, bu bakterinin izolasyon için biraz daha fazla çabayı hakettiğini düşündürmektedir. Önerimiz hiç olmazsa 0-6 yaş grubunda, H.influenzae'nın etyolojide rol oynadığı infeksiyonlara ait klinik örneklerde çukulata besiyerine ekimin ihmal edilmemesi ve mümkün olan hallerde hasta başı ekimlerinin yapılmasıdır. Ayrıca suş sayımız az olmakla birlikte diğer bilgilerin de ışığında kloramfenikol, özellikle invazif infeksiyonlarda ampirik tedavide ilk seçenek ilaç gibi görünmektedir.

KAYNAKLAR

1. Joklik WK, Willett HP, Amos DB (eds) p.507-517: Zinsser Microbiology, 1984. 18th ed. Appleton-Century-Crofts / Norwalk, Connecticut.
2. Howard BJ. Haemophilus: 279-288. In Howard BJ (ed), Clinical and Patogenic Microbiology, 1987. The C.V. Mosby Company, St. Louis, Washington DC, Toronto.
3. Moxon ER: Haemopilus influenzae. 1722-1729. In Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE (eds), Principles and Practice of Infectious Diseases, 1990, 3rd ed. Churchill Livingstone New York, Edinburgh, London, Melbourne.
4. Klein JO: Otitis externa, otitis media, mastoiditis. p.505-510. In Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE (eds), Principles and Practice of Infectious Diseases, 1990, 3rd ed. Churchill Livingstone, New York, Edinburgh, London, Melbourne.
5. Gwaltey JM: Sinusitis. p.510-514. In Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE (eds), Principles and Practice of Infectious Diseases, 1990, 3rd ed. Churchill Livingstone, New York, Edinburg, London, Melbourne.
6. Lochater-Khorozo D, Seegal BC (eds) p.13-76: Microbiology of The Eye, 1972. The C.V. Mosby Company, Saint Louis.
7. Ulutan F, Günalp A: Çocuklarda akut bakteriyel menenjit etkenleri, hasta başında yapılan kültürün önemi. Mikrobiyol Bült, 18: 29-36, 1984.
8. Gür D, Yuluğ N: Göz infeksiyonlarında bakteriyel etkenler. Mikrobiyol Bült, 20: 145-159, 1986.
9. Berkman E: Boğaz kültürlerinde Haemophilus influenzae insidansının araştırılması. Mikrobiyol Bült, 20: 76-83, 1986.
10. Çaprak S. Akut ve kronik maksiller sinüzitlerde nazofarenks, burun ve sinüs ponksiyonu kültür sonuçlarının karşılaştırılması. Uzmanlık tezi, Eskişehir, 1990.
11. Belen A, Günalp A: Çocukluk çağı bakteriyel kökenli akut otitis media enfeksiyonlarında boğaz ve nazofarenks kültürlerinin değeri. Mikrobiyol Bült, 15: 131-139, 1981.
12. Cengiz AT, Kıyan M, Dikmen M, Çiftçioğlu N: Maksiller sinüzitli olguların boğaz ve burun kültürlerinde üretilen mikroorganizmalar ve serum anti-streptolizin (ASO) titreleri. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 17 (3-4): 180-192, 1987.

13. Şaylı T: Akut bakteriyel menenjitin erken tanı ve takibinde serum ve beyin omurilik sıvısı C-reaktif protein, beyin omurilik sıvısı immünglobulin düzeyleri ve lateks aglütinasyonu ile etken saptanması. Uzmanlık tezi, Eskişehir, 1989.

14. Yıldırım N, Akgün Y, Topbaş S, Başmak H, Kiraz N, Yurdakul S: Çeşitli göz infeksiyonlarında konjonktiva kültürlerinin değerlendirilmesi. Mikrobiyol Bült, 24: 71-78, 1990.

15. Mamal M: 1985 Haziran-Aralık döneminde hastanemiz muayene maddelerinden ayrılan Haemophilus cinsi bakterilerin türleri, biyotip ve serotipleri. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 19 (4): 347-356, 1989.

16. Finegold SM, Baron EJ (eds) p.225-236: Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, 1986. 7th ed. The C.V. Mosby Company, St Louis, Toronto, Princeton.

17. Mamal M: İnsandan izole edilen Haemophilus cinsi bakteriler üzerine çalışmalar. Türk Mikrobiyol Cem Derg, 17 (1-2): 1-9, 1987.

18. Candan İ, Töreci K: Muayene maddelerinden izole edilen suşların ampisiline ve ampisilin-sulbaktam kombinasyonuna duyarlılıkları. Ankem Derg, 2 (3): 251-257, 1988.