TAŞIYICI ÇOCUKLARDAN İZOLE EDİLEN *MORAXELLA CATARRHALIS* SUŞLARINDA BRO BETA-LAKTAMAZLARIN MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMESİ*

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF BRO BETA-LACTAMASES OF *MORAXELLA CATARRHALIS* STRAINS ISOLATED FROM CARRIER CHILDREN

Özgen KÖSEOĞLU**, Alper ERGİN***
Nazlı GÜRKAN AYDIN**, Gülşen HASÇELİK**

ÖZET: *Moraxella catarrhalis*'in nazofarinkste kolonize olması üst solunum yolu enfeksiyonları (ÜSYE) ve otitis media açısından bir risk faktörüdür. Bu çalışmada, solunum yolu yakınması olmayan sağlıklı 64 çocuktan izole edilen *M.catarrhalis* suşlarında BRO beta-laktamazların moleküler tanımlanması amaçlanmıştır. *M.catarrhalis* seçici besiyerinde üreyen Gram-negatif diplokok şeklinde olan bakterilerden katalaz, oksidaz, DNaz, nitrat redüksiyonu pozitif ve glukoz, maltoz, sükroz, laktoz fermentasyonu negatif koloniler *M.catarrhalis* olarak tanımlanmıştır. İzolatların antibiyotik duyarlılıkları NCCLS önerilerine göre agar dilüsyon yöntemi ile tespit edilmiştir. BRO beta-laktamazlar restriksiyon enzim analizi ile belirlenmiştir. Çalışılan izolatlarda ampisiline %18.8 direnç bulunurken, amoksisilin/klavulanat, sefazolin, sefaklor, azitromisin ve siprofloksasine direnç saptanmamıştır. *M.catarrhalis* izolatlarının 57'sinde (%89) nitrosefin disk testi (Remel, USA) ile beta-laktamaz pozitifliği belirlenmiştir. Bu 57 izolatta (%89) restriksiyon enzim analizi ile de BRO beta-laktamaz varlığı gösterilmiş, 7 izolat ise (%11) beta-laktamaz negatif bulunmuştur. BRO beta-laktamazların 47'si (%73.4) BRO-1, 10'u (%15.6) BRO-2 olarak tiplendirilmiştir. *M.catarrhalis* taşıyıcılığı yüksek olan çocuklarda bu bakteriye bağlı ÜSYE'na daha sık rastlandığı için, bu çocuklarda *M.catarrhalis* izolatlarının BRO beta-laktamaz karakterizasyonu önem taşımaktadır. Sonuç olarak, BRO beta-laktamazların tanımlanması, taşıyıcı çocuklarda bu bakteriye bağlı olarak gelişebilecek solunum yolu enfeksiyonlarının tanı ve tedavisinde yol gösterici olacaktır.

Anahtar sözcükler: Moraxella catarrhalis, antimikrobiyal duyarlılık, BRO beta-laktamaz.

---

* Bu çalışmanın bir bölümü 3.Tanısal ve Moleküler Mikrobiyoloji Kongresi'nde (28 Haziran-1 Temmuz, Ankara) poster olarak sunulmuştur.

** Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

*** Hacettepe Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar Programı, Ankara.

Geliş Tarihi: 13.9.2004 Kabul Ediliş Tarihi: 26.10.2004

ABSTRACT: Nasopharyngeal carriage of *Moraxella catarrhalis* is a risk factor for upper respiratory tract infections and otitis media. In this study, we aimed to characterize BRO beta-lactamases of *M.catarrhalis* strains isolated from 64 children without any symptoms of respiratory disease. Gram negative diplococci grown on selective media and which are catalase, oxidase, DNase, nitrate reduction positive, glucose, maltose, sucrose and lactose fermentation negative, were diagnosed as *M.catarrhalis*. Antibiotic susceptibility testing was performed by agar dilution method recommended by NCCLS. BRO beta-lactamases were differentiated by restriction enzyme analysis method. The resistance rate for ampicillin was 18.8% and all the isolates were found to be sensitive to amoxicillin-clavulanate, cefazolin, cefaclor, azithromycin and ciprofloxacin. Out of 64 *M.catarrhalis* isolates, 57 (89%) were found beta-lactamase positive with nitrocefin disk test (Remel, USA). The presence of BRO beta-lactamases in these 57 strains (89%) was also confirmed by restriction enzyme analysis, while 7 (11%) of them were found to be negative. Among the positive strains, 47 (73.4%) were typed as BRO-1, and 10 (15.6%) were typed as BRO-2. The characterization of BRO beta-lactamases of *M.catarrhalis* strains in carrier children is important since the high rate of carriage predisposes to respiratory tract infections. As a result, BRO beta-lactamase typing will guide the treatment regimen against the respiratory infections that can occur due to *M.catarrhalis* in carrier children.

Key words: Moraxella catarrhalis, antimicrobial susceptibility, BRO beta-lactamase.

G İ R İ Ş

Doğal rezervuarı insan olan *Moraxella catarrhalis,* farinks ve nazofarinksten sıklıkla, konjunktiva ve genital bölgeden de daha nadir olarak izole edilebilmektedir. Çocuklarda ve yaşlılarda üst solunum yolunda *M.catarrhalis* kolonizasyonu sık görülen bir durumdur. Bakteri, solunum yolu yakınması olmayan çocukların nazofarinksinden %10-36 oranında izole edilmekte, ancak bu oran ilk iki yaş için %66-75 gibi yüksek düzeylere ulaşabilmektedir[1]. *M.catarrhalis*'in nazofarinkste kolonize olması solunum yolu enfeksiyonları ve otitis media açısından bir risk faktörüdür[2,3].

M. catarrhalis'de beta-laktamaz yapımı ilk kez 1977 yılında tanımlanmıştır. Beta-laktamaz enzimi bakteriyi beta-laktam antibiyotiklerden korumak dışında, enfeksiyona eşlik eden *Streptococcus pneumoniae* gibi solunum yolu patojenlerinin tedavisini engelleyerek dolaylı yolla patojeniteyi artırmaktadır[4]. Beta-laktamaz prevalansında en hızlı artışın saptandığı mikroorganizma *M.catarrhalis* olup, bugün için izolatların %90'ından fazlasında beta-laktamaz üretimi saptanmaktadır[5]. *M.catarrhalis* izolatlarında klinik olarak önemli iki BRO beta-laktamaz geni bulunmaktadır. BRO-1 ve BRO-2 olarak adlandırılan bu iki gen aynı kromozomda yer almakta ve aralarında beş baz farkı bulunmaktadır[4]. *M.catarrhalis*'in bazı suşları BRO-2 beta-laktamazların varlığı nedeniyle beta-laktamaz pozitif olmalarına rağmen ampisiline düşük direnç gösterebilmektedir. *M.catarrhalis* taşıyıcılığı yüksek olan çocuklarda bu bakteriye bağlı üst solunum yolu enfeksiyonlarına daha sık rastlanıldığı için *M.catarrhalis* izolatlarının BRO-1 ve BRO-2 beta-laktamaz karakterizasyonu önem taşımaktadır[2].

Bu çalışmada, solunum yolu yakınması olmayan sağlıklı 64 çocuktan izole edilen *M.catarrhalis* izolatlarında BRO beta-laktamazların moleküler olarak tanımlanması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Örnekler: Boğaz sürüntü örnekleri, Ankara Çankaya İlçesi ilköğretim okullarında okuyan, sağlıklı öğrencilerden üst solunum yolu muayenesi yapıldıktan sonra her iki tonsil üzerine ve farinks arka duvarına eküvyon sürülerek alındı. Örnekler Stuart taşıyıcı besiyerine konularak, alındıktan 6-8 saat içinde direk güneş ışığından korunarak laboratuvara ulaştırıldı.

Mikrobiyolojik Değerlendirme: M.catarrhalis izolasyonu için örnekler 10 µg/ml vankomisin, 5 µg/ml trimetoprim, 2 µg/ml amfoterisin B, 10 µg/ml asetazolamit içeren %5 koyun kanlı triptik soy agara ekildi ve normal atmosferde 37°C'da 24-48 saat inkübe edildi. *M.catarrhalis* seçici besiyerinde üreyen pigmentsiz, gri beyaz, opak, hemoliz yapmayan, hemisferik agar yüzeyinde kayan koloniler değerlendirmeye alındı. Gram negatif diplokok olarak tespit edilen bu kolonilere DNaz testi uygulandı. DNaz, katalaz, oksidaz ve nitrat redüksiyon testi pozitif, glukoz, maltoz, laktoz ve sükroz karbonhidrat fermentasyon testleri negatif olan izolatlar *M. catarrhalis* olarak tanımlandı.

Antibiyotik Duyarlılık Testi: İzolatların ampisilin, amoksisilin/klavulanat, sefazolin, sefaklor, azitromisin ve siprofloksasin duyarlılıkları NCCLS tarafından önerilen şekilde agar dilüsyon yöntemiyle gerçekleştirildi[6]. *M.catarrhalis* izolatlarına ait antibiyotik duyarlılık testlerinin değerlendirilmesi amacıyla *Haemophilus influenzae* için NCCLS tarafından önerilen MİK sınır değerleri kullanıldı[7].

Beta-laktamaz Testi: M. catarrhalis olarak tanımlanan 64 izolatta beta-laktamaz varlığı nitrosefin disk testi (Remel, Lenexa, Kansas, USA) ile araştırıldı.

BRO Beta-laktamaz Tiplendirmesi: BRO beta-laktamazlar, Plessis M tarafından geliştirilen restriksiyon enzim analizi ile saptandı[8]. BRO genlerini çoğaltmak amacıyla BRO-F 5'-ATA ATG ATG CAA CGC CGT CAT-3' ve BRO-R 5'-GGC TTG TTG GGT CAT AAA TT-3' primerleri kullanıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) için hazırlanan karışım 50 µl; 50 ng DNA, 2mM $MgCl_2$, 200 µM (herbiri) dNTP, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH: 8.0), 1.0 µM (herbiri) primer ve 2 U Taq polimeraz olacak şekilde hazırlandı. Karışım "thermal cycler" da, 30 döngü olacak şekilde 93°C, 52°C ve 72°C'de birer dakika ve 72°C'de 1 dakika bekletilerek amplifiye edildi. PCR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. Restriksiyon enzim analizi BcgI (New England, Biolabs, Inc) enzimi kullanılarak gerçekleştirildi. Restriksiyon enzim analizi ürünleri %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütüldü ve 996 baz çiftlik bölgede bant görülmesi BRO-1 geni, 698 ve 266 baz çiftlik bölgede bantların görülmesi BRO-2 geni olduğunu, bant görülmemesi ise BRO geni olmadığını gösterdi. Molekül ağırlık standartı olarak HaeIII ile kesilmiş fX174 marker'ı kullanıldı.

BULGULAR

Toplam 42 farklı ilköğretim okulunda okumakta olan sağlıklı öğrencilerden izole edilen 64 *M.catarrhalis* izolatı çalışmaya alınmıştır. Çocukların yaş ortalaması 11.2 yıl, cinsiyet dağılımı ise 37 kız, 27 erkek olarak tespit edilmiştir.

Çalışılan tüm izolatlar amoksisilin/klavulanat, sefazolin, sefaklor, azitromisin ve siprofloksasine duyarlı bulunurken, ampisilin direncinin %18.8 olduğu saptanmıştır. İzolatların antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo I'de gösterilmiştir.

İzole edilen suşların 57'sinde (%89) nitrosefin disk testi ile beta-laktamaz varlığı saptanmıştır. Bu 57 izolatta BRO beta-laktamaz varlığı restriksiyon enzim analizi ile de gösterilmiş, bunların 47'sinin (%73.4) BRO-1, 10'unun (%15.6) BRO-2 geni taşıdığı bulunmuştur. İzolatların 7'sinde (%11) BRO beta-laktamaz varlığı saptanmamıştır.

Tablo I: *M.catarrhalis* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları (n=64)

Antibiyotik	MIK_{50} (µg/ml)	MIK_{90} (µg/ml)	Aralık (µg/ml)	Direnç %
Ampisilin	1	8	0.12-16	18.8
Amoksisilin/klavulanat	0.12	0.5	0.12-0.5	0
Sefazolin	2	8	2-8	0
Sefaklor	4	4	0.12-8	0
Azitromisin	0.03	0.06	0.03-0.06	0
Siprofloksasin	0.03	0.06	0.004-2	0

TARTIŞMA

M.catarrhalis'in nazofarinkste kolonize olması üst solunum yolu enfeksiyonları ve otitis media açısından bir risk faktörüdür[2]. *M.catarrhalis* taşıyıcılığı yüksek olan çocuklarda bu bakteriye bağlı üst solunum yolu enfeksiyonlarına daha sık rastlandığı için, *M.catarrhalis* izolatlarının BRO-1 ve BRO-2 beta-laktamaz karakterizasyonu önem taşımaktadır. BRO-1 beta-laktamaz içeren izolatlardaki penisilin direnci genellikle BRO-2 üreten izolatlardan daha yüksek olmaktadır[9]. *M.catarrhalis* izolatlarının antibiyotiklere duyarlılık durumu, beta-laktamaz varlığı veya yokluğuna göre değerlendirilmelidir. Bu nedenle beta-laktamazları tanımlayacak güvenilir yöntemlere ihtiyaç vardır. Nitrosefin pratik olması nedeniyle rutin laboratuvarlarda çok kullanılan bir yöntemdir. İzoelektrik odaklama yöntemi, daha pahalı ve uygulaması zor bir yöntemdir. Restriksiyon enzim analizi ise her iki yöntemin avantajlarını içermektedir[8,10]. Bu nedenle çalışmamızda restriksiyon enzim analiz yöntemi kullanılarak taşıyıcı çocuklardan izole edilen *M.catarrhalis* suşlarında BRO beta-laktamazlar tiplendirilmiştir.

Bandak ve arkadaşlarının[11] 15 ülkeyi kapsayan çalışmasında, 1486 *M.catarrhalis* izolatının ampisilin $MİK_{90}$ değeri 4 µg/ml olarak bulunurken, amoksisilin-klavulanat, sefaklor, loracarbef, sefuroksim, azitromisin ve siprofloksasin $MİK_{90}$ değerleri düşük seviyelerde tespit edilmiştir. Doern ve arkadaşlarının[12] çalışmasında, incelenen 503 *M.catarrhalis* izolatının beta-laktamaz pozitifliği %92.2 olarak bulunurken, beta-laktamaz üreten izolatların amoksisilin direnci %22.2 olarak belirlenmiş, çalışılan diğer 19 antibiyotiğe karşı direnç saptanmamıştır. Çalışmamızda benzer şekilde beta-laktamaz pozitifliği %89, ampisilin direnci %18.8 olarak bulunmuştur. Bu durum literatürde de belirtildiği gibi, bazı beta-laktamaz pozitif BRO-2 içeren *M.catarrhalis* izolatlarının aminopenisilinlere düşük afinite göstermelerinden kaynaklanabilmektedir. Diğer yandan, penisilin için 10^4 ve 10^5 cfu/ml inokulüm

dozunda çalışılan antibiyotik duyarlılık testlerinde, düşük inokulüm etkisi nedeniyle MİK düzeyleri düşük bulunmaktadır. Yeni sefalosporinler için ise inokulüm etkisi söz konusu olmamaktadır[13,14]. BRO-2 üreten izolatların ampisilin ve amoksisilin MİK'leri genellikle düşük olmakta ve beta-laktamaz üretiminin her zaman amoksisilin ve ampisilin direncini göstermediğine kanıt oluşturmaktadır. Bununla birlikte BRO-2 prevalansı *M.catarrhalis* izolatlarında düşük seviyede bulunduğundan, tedavide penisilin, ampisilin veya amoksisilinin kullanılmaması gerektiği belirtilmektedir[15-19].

Diğer antibiyotikler açısından bakıldığında, *M.catarrhalis* izolatlarının genellikle eritromisin, kloramfenikol, tetrasiklin, gentamisin ve rifampisine duyarlı olduğu, trimethoprim, vankomisin ve klindamisine intrinsik olarak dirençli oldukları belirlenmiştir[17]. Bizim çalışmamızda da beklendiği gibi amoksisilin/klavulanat, sefalosporinler, azitromisin ve siprofloksasine karşı direnç tespit edilmemiştir (Tablo I).

M.catarrhalis izolatlarındaki beta-laktamaz üretimi beta-laktam antibiyotiklerin kullanımı ile artmıştır[20]. Beta-laktamaz genlerinin diğer bakterilere geçmesinde kommensal organizmaların rolü bulunmaktadır. Bu nedenle BRO beta-laktamazların *M.nonliquefaciens* ve *M.lacunata* gibi patojen olmayan türler tarafından *M.catarrhalis*'e aktarıldığı düşünülmektedir[2,21]. Bu durum, taşıyıcı izolatlarımızda %89 gibi yüksek beta-laktamaz pozitifliği bulunmasını açıklayabilir.

Aminopenisilinlere düşük direnç gösteren suşlar göz önüne alındığında, *M.catarrhalis* izolatlarında mutlaka beta-laktamaz varlığına bakılması ve buna göre ampisilin veya amoksisilin duyarlılığının değerlendirilme dışı bırakılması gerekmektedir. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında nitrosefin disk testi ile beta-laktamaz varlığının tespiti çok tercih edilen bir yöntem olmasına rağmen, restriksiyon enzim analizi ile BRO beta-laktamazların karakterizasyonu kolay ve güvenilir bir yöntem olarak kullanılabilmektedir. BRO beta-laktamazların tanımlanması, taşıyıcı çocuklarda *M.catarrhalis*'e bağlı gelişebilecek solunum yolu enfeksiyonlarının tanı ve tedavisine ışık tutacaktır.

KAYNAKLAR

1. Faden H, Harabachi Y, Hong T, Wanda T: Epidemiology of *Moraxella catarrhalis* in children during the first 2 years of life: Relationship to otitis media. J Infect Dis 1994, 169: 1312-1317.
2. McGregor K, Chang BJ, Mee BJ, Riley TV: *Moraxella catarrhalis*: Clinical significance, antimicrobial susceptibility and BRO beta-lactamases. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1998, 17: 219-234.
3. Greiner O, Day PJ, Altwegg M, Nadal D: Quantitative detection of *Moraxella catarrhalis* in nasopharyngeal secretions by real-time PCR. J Clin Microbiol 2003, 41:1386-1390.
4. Bootsma HJ, Dijk HV, Verhoef J, Fleer A, Mooi FT: Molecular characterization of the BRO beta-lactamase of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis*. Antimicrob Agents Chemother 1996, 40: 966-972.
5. Verduin CM, Hol C, Fleer A, Dijk H and Belkum A: *Morexalla catarrhalis:* From emerging to established pathogen. Clin Microbiol Rev 2002, 15: 125-144.
6. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Methods for dilution antibiotic susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved Standard M7-A5, 5th ed. 2000. NCCLS, Wayne, Pa.
7. National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Supplemental tables. M100-S12, 2002. NCCLS, Wayne, Pa.
8. Plessis M: Rapid discrimination between BRO beta-lactamases from clinical isolates of *Moraxella catarrhalis* using restriction endonuclease analysis. Diagn Microbiol Infect Dis 2001, 39: 65-77.

9. Richter SS, Winokur PL, Brueggemann AB, et al: Molecular characterization of the beta-lactamases from clinical isolates of *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis* obtained from 24 US medical centers during 1994-1995 and 1997-1998. Antimicrob Agents Chemother 2000, 44: 444-446.

10. Boostma HJ, Dijk H, Vauterin P, Verhoef J, Mooi FR: Genesis of BRO beta-lactamase-producing *Moraxella catarrhalis*: Evidence for transformation-mediated horizontal transfer. Mol Microbiol 2000, 36: 93-104.

11. Bandak SI, Turnak MR, Allen LD, et al: Antibiotic susceptibilities among recent clinical isolates of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* from fifteen countries. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001, 20: 55-60.

12. Doern GV, Jones RN, Pfaller MA, Kugler K: *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* from patients with community-acquired respiratory tract infections: Antimicrobial susceptibility patterns from the Sentry antimicrobial surveillance program (United States and Canada, 1997). Antimicrob Agents Chemother 1999, 43: 385-389.

13. Doern GV, Tubert TA: Effect of inoculum size on results of macrotube dilution susceptibility test with *Branhamella catarrhalis*. J Clin Microbiol 1987, 25: 1576-1578.

14. Yeo SF, Livermore DM: Effect of inoculum size on the in vitro susceptibility to beta-lactam antibiotics of *Moraxella catarrhalis* isolates of different beta-lactamase types. J Med Microbiol 1994, 40: 252-255.

15. Wallace RJ Jr, Nash DR, Steingrube VA: Antibiotic susceptibilities and drug resistance in *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis*. Am J Med 1990, 88: 46S-50S.

16. Wallace RJ Jr, Steingrube VA, Nash DR, et al: BRO beta-lactamases of *Branhamella catarrhalis* and *Moraxella* subgenus *Moraxella*, including evidence for chromosomal beta-lactamase transfer by conjugation in *B.catarrhalis*, *M.nonliquefaciens* and *M.lacunata*. Antimicrob Agents Chemother 1989, 33: 1845-1854.

17. Livermore DM: Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995, 8: 557-584.

18. Levy F, Walker ES: BRO beta-lactamase alleles, antibiotic resistance and test of the BRO-1 selective replacement hypothesis in *Moraxella catarrhalis*. J Antimicrob Chemother 2004, 53: 371-374.

19. Stobberingh EE, VanEck HJ, Houben AW, Van Boven CPA: Analysis of the relationship between ampicillin resistance and beta-lactamase production in *Branhamella catarrhalis*. Drugs 1986, 31: 23-27.

20. Peerbooms PGH, Engelen MN, Stokman DAJ, et al: Nasopharyngeal carriage of potential bacterial pathogens related to day care attendance, with special reference to the molecular epidemiology of *Haemophilus influenzae*. J Clin Microbiol 2002, 40: 2832-2836.

21. Bootsma HJ, Aerts PC, Posthuma G, et al: *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis* BRO beta-lactamase: A lipoprotein of Gram-positive origin? J Bacteriol 1999, 181: 5090-5093.