

KISA BİLDİRİ:
STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE VE HAEMOPHILUS INFLUENZAE
KLİNİK İZOLATLARININ TEDAVİDE KULLANILAN
ANTİBİYOTİKLERE KARŞI İN VİTRO DİRENÇ ORANLARI*

SHORT COMMUNICATION:
 IN VITRO RESISTANCE RATES OF *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* AND
HAEMOPHILUS INFLUENZAE CLINICAL ISOLATES TO THE
 ANTIBIOTICS USED IN THERAPY

Hikmet UNCU¹, Şule ÇOLAKOĞLU¹, Tuba TURUNÇ²
Yusuf Ziya DEMİROĞLU², Hande ARSLAN²

ÖZET: Tüm dünyada morbidite ve mortalitesi yüksek enfeksiyonlara yol açan *Streptococcus pneumoniae* ve *Haemophilus influenzae*, özellikle toplum kökenli pnömonilerin en önemli bakteriyel etkenleridir. Son yıllarda *S.pneumoniae* izolatlarında çeşitli antibiyotiklere karşı gittikçe artan direnç oranları tespit edilmektedir. Çalışmamızda, Başkent Üniversitesi Adana Uygulama ve Araştırma merkezinde, Ocak 2005-Mayıs 2006 tarihleri arasında, çoğu alt solunum yolu olmak üzere çeşitli klinik örneklerden izole edilen 77 *S.pneumoniae* (44 balgam, 20 kan, 8 bronkoalveolar lavaj, 4 plevral sıvı, 1 trakeal aspirat) ve 31 *H.influenzae* (30 balgam, 1 bronkoalveolar lavaj) suşunun tedavide kullanılan antibiyotiklere karşı in vitro direnç oranlarının belirlenmesi amaçlanmıştır. İzolatların antibiyotik duyarlılık testleri CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute; M100-S13) önerilerine göre disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Bu yöntemde zon çapı ≥ 19 mm olarak bulunan *S.pneumoniae* suşlarının penisilin MİK değerleri E-test (AB Biodisk, İsveç) yöntemi ile belirlenmiştir. *S.pneumoniae* izolatlarının %38.9'unda (30/77) orta düzey, %10.4'ünde (8/77) ise yüksek düzey olmak üzere toplam %49.4'ünde penisilin direnci saptanmıştır. Pnömonoklarda yüksek direnç oranlarının saptandığı diğer antibiyotikler ise sırasıyla trimetoprim-sülfametoksazol (TMP/SMX; %42.8), eritromisin (%37.6), tetrasiklin (%31.1), klindamisin (%23.3) ve kloramfenikol (%10.3) olmuştur. *H.influenzae* izolatları değerlendirildiğinde; bir suşun (%3.2) beta-laktamaz ürettiği ve ampisilin ve azitromisine dirençli olduğu görülmüş, sekiz suşta (%25.8) TMP/SMX, iki suşta (%6.4) ise kloramfenikol direnci belirlenmiştir. Sonuç olarak, hastanemizdeki izole edilen pnömonoklarda saptanan yüksek penisilin ve eritromisin direnci, bölgemizde ampirik olarak yaygın şekilde kullanılan bu antibiyotiklerin kullanımının kısıtlanması ve kontrol altına alınması gerektiğini vurgulamaktadır.

Anahtar sözcükler: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, antibiyotik direnci.

*XXXII.Türk Mikrobiyoloji Kongresinde (12-16 Eylül 2006, Antalya) poster olarak sunulmuştur.

¹ Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

² Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

ABSTRACT: *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* which cause infections with high morbidity and mortality all over the world, are also the most important bacterial pathogens of community-acquired pneumoniae. In recent years *S.pneumoniae* is becoming increasingly resistant to a variety of antibiotics. The aim of this study was to detect the in vitro resistance rates of *S.pneumoniae* and *H.influenzae* strains isolated from different clinical samples to the antibiotics which are used in the therapy of infections due to these pathogens. Between the period of January 2005 to May 2006, 77 *S.pneumoniae* (44 sputum, 20 blood, 8 bronchoalveolar lavage, 4 pleural fluids and 1 tracheal aspirate isolate) and 31 *H.influenzae* (30 sputum and 1 bronchoalveolar lavage isolate) strains isolated from patients who were admitted to Baskent University Hospital, Research and Practice Center of Adana (located in southern Turkey), were included to the study. The antibiotic susceptibility tests were performed by disc diffusion method according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute; M100-S13) guidelines. The MIC values of *S.pneumoniae* which gave an inhibition zone diameter of ≥ 19 mm in with disc diffusion test, were detected by E-test (AB Biodisk, Sweden). Intermediate and high resistance rates of pneumococci to penicilin were found as 38.9% (30/77) and 10.4% (8/77), respectively, with a total resistance rate of 49.4%. Trimethoprim-sulphamethoxazole (TMP/SMX), erithromycin, tetracyclin, clindamycin and chloramphenicol were the other antibiotics which followed penicillin with the resistance rates of 42.8%, 37.6%, 31.1%, 23.3% and 10.3%, respectively. Amongst *H.influenzae* strains, one (3.2%) was found to be a beta-lactamase producer and it was resistant to both ampicillin and azithromycin. Eight (25.8%) of *H.influenzae* isolates were resistant to TMP/SMX, and two (6.4%) were resistant to chloramphenicol. As a result, the high penicilin and erithromycin resistance rates of *S.pneumoniae* clinical isolates in our hospital emphasize that the empirical use of these antibiotics should be limited and well-controlled in our region.

Key words: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, antibiotic resistance.

GİRİŞ

Streptococcus pneumoniae ve *Haemophilus influenzae*, başta toplum kökenli pnömoniler olmak üzere çok sayıda enfeksiyondan sorumlu bakteriyel patojenlerdir¹. Yapılan çalışmalarda, bu mikroorganizmaların özellikle beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı giderek artan oranda direnç geliştirdiği bildirilmektedir¹⁻³. Bilindiği gibi beta-laktam antibiyotiklere karşı gelişen dirençten penisilin bağlayan proteinler (PBP) ve beta-laktamazlar sorumlu tutulmaktadır^{1,4}. Bu bakterilerdeki artan direnç oranları, ampirik antibiyotik tedavilerinin uygulandığı durumlarda sorun teşkil etmektedir. Antimikrobiyal direnç paternleri ve oranları, farklı ülkelere ve bir ülkenin farklı bölgelerine göre değişmekte ve dirençli suşların yayılımı, antibiyotik kullanımı ve yaşam koşullarına bağlı olarak farklılık göstermektedir^{1,2}. Bu nedenle, her ülkenin, her bölgenin ve hatta her hastanenin sürveyans çalışmaları ile kendi direnç durumunu belirlemesi ve izlemesi gereklidir.

Bu çalışmada, merkezimizde çoğu alt solunum yolu örneği olmak üzere klinik örneklerden izole edilen *S.pneumoniae* ve *H.influenzae* suşlarının, tedavide kullanılan antibiyotiklere karşı direnç oranlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Başkent Üniversitesi Adana Uygulama ve Araştırma Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda Ocak 2005-Mayıs 2006 döneminde izole edilen 77 *S.pneumoniae* ve 31 *H.influenzae* suşu dahil edildi. *S.pneumoniae* suşları balgam (44), kan (20), bronkoalveolar lavaj sıvısı (8), plevral sıvı (4) ve trakeal aspirat sıvısı (1) örneklerinden, *H.influenzae* suşları ise balgam (30) ve bronkoalveolar lavaj sıvısı (1) örneğinden izole edilmişti.

S.pneumoniae'nin tanımlanmasında, optokin duyarlılığı ve %2 sodyum deoksikolatın agarda üreyen kolonilerin üzerine damlatılması ile erimenin değerlendirildiği safrada erime testi kullanıldı. *H.influenzae*'nin tanımlanmasında X,V faktör içeren diskler (Oxoid, Basingstoke, İngiltere) ve bakteri tanımlama kitleri (BBL Crystall, BD Diagnostic, Maryland, USA) kullanıldı.

İn vitro antibiyotik duyarlılık testleri CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) M100-S13'de yer alan öneriler doğrultusunda disk difüzyon yöntemiyle yapıldı⁵. Klinik örneklerden izole edilen suşlar 0.5 McFarland bulanıklığına getirildikten sonra, *S.pneumoniae* suşları %5 koyun kanlı Muller-Hinton agara, *H.influenzae* izolatları *Haemophilus* test besiyerine ekildikten sonra üzerine antibiyotik diskleri yerleştirildi ve 35°C'de %5 CO₂'li ortamda 20-24 saat inkübe edildi. *S.pneumoniae*'nin penisilin duyarlılığını test etmek için 1 µg oksasilin diski (Oxoid, Basingstoke, İngiltere) kullanıldı. Zon çapı ≥19 mm olan suşların penisilin MİK değerleri E-test (AB Biodisk, Solna, İsveç) yöntemi ile belirlendi. Penisilin MİK değeri ≤0.06 µg/mL olan suşlar duyarlı, 0.12-1.0 µg/mL olan suşlar orta duyarlı (azalmış duyarlılık), ≥2 µg/mL olan suşlar yüksek düzey dirençli olarak kabul edildi. *H.influenzae* için ek olarak nitrosefin (Oxoid, Unipath Ltd, Hampshire, İngiltere) diski kullanılarak beta-laktamaz varlığı araştırıldı. Antibiyotik duyarlılık testlerinin kalite kontrolleri *H.influenzae* ATCC 49247 ve *S.pneumoniae* ATCC 49619 suşları kullanılarak yapıldı.

BULGULAR

Çalışılan 77 *S.pneumoniae* izolatının 38'i (%49.4) disk difüzyon yöntemiyle penisiline dirençli olarak saptanmış ve 38 suşa uygulanan E-test yöntemi ile belirlenen MİK değerlerine göre de, 30'u (%38.9) orta düzeyde, 8'i (%10.3) yüksek düzeyde dirençli bulunmuştur. Çalışmaya alınan 31 *H.influenzae* suşundan birisinde ise (%3.2) beta-laktamaz pozitifliği belirlenmiş, bu suşun ampisilin ve azitromisine dirençli olduğu izlenmiştir. Çalışılan izolatların test edilen antibiyotiklere karşı direnç oranları Tablo I'de görülmektedir.

TARTIŞMA

Penisilin, pnömokok enfeksiyonlarında uzun yıllar ilk seçenек antibiyotik olarak kullanılmakta iken, penisiline azalmış duyarlılık gösteren ilk izolat 1960'larda bildirilmeye başlamıştır. 1970 ve 1980'lerde penisiline dirençli *S.pneumoniae* izolatları ABD'de sadece %0.2 oranında iken, 1990'ların ortalarına doğru %35 oranında azalmış duyarlılık görülmüştür⁶. 1995 yılından günümüze

kadar bildirilen raporlarda *S.pneumoniae* izolatlarında penisilin direnç oranları ülkeler arasında değişmekle beraber %6.7-56.7 aralığındadır ve yıllar içinde gittikçe yükselen bir seyir izlemiştir^{3,7-10}. Pnömonoklarda penisilin direnci ülkemizde ilk kez 1990'lı yıllarda bildirilmeye başlamıştır^{11,12}. 1996 yılından itibaren ülkemizde yapılan çalışmalarda pnömonoklarda penisiline karşı %19-48.5 aralığında direnç oranları bildirilirken, %15-41.5 aralığında orta düzey, %0-11.5 aralığında yüksek düzey direnç rapor edilmektedir¹³⁻¹⁸. Bu çalışmada *S.pneumoniae* klinik izolatlarının %38.9'u penisilin'e orta düzeyde, %10.3'ü yüksek düzeyde dirençli olarak bulunmuştur. Oranlarımız, ülkemizden bildirilen aralıklar içerisinde olup, üst sınır değerlerine daha yakın görünmektedir. Penisiline direnç oranının yüksek oluşu bölgemiz için toplum kökenli pnömoni olgularının tedavisinde ampirik olarak başlanan penisilin kullanımının kısıtlanması gerektiğini vurgulamaktadır.

Tablo I. Çalışılan *S.pneumoniae* ve *H.influenzae* Suşlarının Antibiyotiklere Direnç Oranları

Antibiyotik	<i>S.pneumoniae</i> Sayı (%)	<i>H.influenzae</i> Sayı (%)
Penisilin	38 (49.4)	—
Ampisilin	—	1 (3.2)
Eritromisin	29 (37.6)	—
Azitromisin	—	1 (3.2)
Kloramfenikol	8 (10.3)	2 (6.4)
Klindamisin	18 (23.3)	—
Tetrasiklin	24 (31.1)	—
Ofloksasin	1 (1.2)	0
TMP/SMX	33 (42.8)	8 (25.8)
Vankomisin	0	—
İmipenem	—	0
Sefalosporinler*	—	0

* Sefaklor, sefuroksim, sefiksim, sefotaksim, seftriakson, seftizoksime, seftazidim.

Makrolidlerin alt solunum yolu enfeksiyonlarında yaygın kullanımı sonucu pnömonoklarda makrolid direnci de artmaya başlamıştır. Penisilin ve makrolidlerin etki ve direnç mekanizmaları arasında bir benzerlik bulunmasa da, penisiline yüksek düzey direnç gösteren pnömonoklarda makrolidlere karşı da direnç artışı görülmektedir¹. Pnömonoklarda eritromisin direncinin, yurt dışından bildirilen raporlarda bölgeden bölgeye değişmekle birlikte, %12.2-58.1^{3,9,10,19}, ülkemizde ise %8-25^{14,15,17,18,20} oranlarında olduğu görülmektedir. Çalışmamızda %37.6 olarak bulunan pnömonoklarda eritromisin direnci, ülkemizdeki verilerden oldukça yüksektir. Dolayısıyla, bölgemizde ampirik olarak makrolid grubu antibiyotiklerin kullanılması durumunda dikkatli olunması gerekmektedir.

Ülkemizde %0-4^{21,22} arasında bildirilen ofloksasin direnç oranı, bizim çalışmamızda da ülkemiz verilerine benzer olarak %1.2 oranında bulunmuştur. Her ne kadar bölgemizde pnömonok suşlarında kinolonlara karşı bir direnç sorunu görünmese de, bu gruptaki antibiyotiklerin dikkatli kullanılması gerekmektedir. Saptadığımız TMP/SMX direnç oranı da (%42.8) biraz düşük

olmakla birlikte ülkemizden bildirilen oranlarla (%47-64) uyumludur^{13-15,23}. Ülkemizde kloramfenikol direnci %3.8-5¹³⁻¹⁵ olarak bulunmuş ve çalışmamızda saptanan %10.3 gibi bir oranın diğer verilerden oldukça yüksek olduğu dikkati çekmiştir.

H.influenzae için yurt dışından bildirilen yayınlarda ampisilin direnci %6.2-33.4 arasındadır^{1,3,9,10}. Ülkemizde ise *H.influenzae* için ampisilin direnci %5.6-8.8^{13,24,25}, TMP/SMX direnci ise %23-27.5^{13,24} aralığında rapor edilmiştir. Çalışmamızda tümü alt solunum yolu örneklerinden izole edilen *H.influenzae* suşlarında ampisilin direnci %3.2, TMP/SMX direnci %25.8 oranlarında bulunmuş, sefalosporin grubu antimikrobiyallerin hiçbirine karşı dirence rastlanmamıştır. Ampisiline dirençli bulunan *H.influenzae* suşunun beta-laktamaz ürettiği ve azitromisine de dirençli olduğu belirlenmiştir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda azitromisine direnç oranı %0-4.5 aralığındadır²⁶. Çalışmamızda tek bir suşta (%3.2) saptanan azitromisin direnci, *H.influenzae* izolatlarımızın az olması nedeniyle tartışılmamıştır. Bölgemiz için *H.influenzae*'nin önemli bir direnç sorunu yaratmayacağı ve şüpheli olgularda ampirik tedavi protokollerinde yer alan sefalosporinlerin rahatlıkla kullanılabileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak, özellikle alt solunum yolu enfeksiyonlarının ampirik tedavisinde kullanılan penisilin ve makrolidlere karşı artmış direnç oranları nedeniyle, bölgemizde pnömokok enfeksiyonu düşünülen olgularda bu antibiyotiklerin dikkatli kullanılması ve ampirik tedaviye başlamadan önce mutlaka kültür yapılarak antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi gerektiği kanısına varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Thornsberry C, Ogilvie P, Kahn J, Mauriz Y. Surveillance of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* in the United States in 1996-1997 respiratory season. The Laboratory Investigator Group. Diagn Microbiol Infect Dis 1997; 29: 249-57.
2. 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.
3. Hoban DJ, Biedenbach DJ, Mutnick AH, Jones RN. Pathogen of occurrence and susceptibility patterns associated with pneumonia in hospitalized patients in North America: results of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Study (2000). Diagn Microbiol Infect Dis 2003; 45: 279-85.
4. Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 557-84.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests. Disc diffusion supplemental tables, M100-S13 (M2-A8), 2003. CLSI/NCCLS, Wayne, Pa.
6. Ballow CH, Jones RN, Johnson DM, Deinhart JA, Schentag JJ. Comparative in vitro assessment of sparflaxacin activity and spectrum using results from over 14,000 pathogens isolated at 190 medical centers in the USA. SPAR Study Group. Diagn Microbiol Infect Dis 1997; 29: 173-86.
7. 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. Clin Infect Dis 2001; 32 (Suppl 2): 81-93.

8. Whitney CG, Farley MM, Hadler J, et al. Active Bacterial Core Surveillance Program of the Emerging Infections Program Network. Increasing prevalence of multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* in the United States. *N Engl J Med* 2000; 343: 1917-24.
9. Doern GV, Brown SD. Antimicrobial susceptibility among community-acquired respiratory tract pathogens in the USA: data from PROTEKT US 2000-01. *J Infect* 2004; 48: 56-65.
10. Jones ME, Blosser-Middleton RS, Critchley IA, Karlowsky JA, Thornsberry C, Sahm DF. In vitro susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*: a European multicenter study during 2000-2001. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 590-9.
11. Tunçkanat F, Akan O, Gur D, Akalın HE. Penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* strains. *Mikrobiyol Bul* 1992; 26: 307-13.
12. Erbaş O, Önde U, Kurt B, Acar N, İçten B. Pnömonoklarda penisilin direncinin saptanması. *Ankara Hastanesi Tıp Bülteni* 1991, 26: 219.
13. Gur D, Ozalp M, Sumerkan B, et al. Prevalence of antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* and *Streptococcus pyogenes*: results of a multicentre study in Turkey. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 19: 207-11.
14. Gur D, Guciz B, Hascelik G, et al *Streptococcus pneumoniae* penicillin resistance in Turkey. *J Chemother* 2001; 13: 541-5.
15. Tuncer İ, Arslan U, Fındık D, Ural O. Klinik örneklerden izole edilen *S.pneumoniae* suşlarında artan penisilin direnci ve bazı antibiyotiklere karşı direnç durumu. *Ankem Derg* 2005; 19: 35-8.
16. Ögünç D, Öngüt D, Saygan MB, Gökay S, Çolak D, Gültekin M. Pnömoni etkeni *Streptococcus pneumoniae* suşlarında penisilin duyarlılığı. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2000; 30: 23-5.
17. Yenisehirli G, Sener B. Antibiotic resistance and serotype distribution of *Streptococcus pneumoniae* strains isolated from patients at Hacettepe University Medical Faculty. *Mikrobiyol Bul* 2003; 37: 1-11.
18. Sener B, Köseoğlu O, Fişenk I, Hasçelik G, Günalp A. *Streptococcus pneumoniae* strains resistance to macrolide, lincosamide, streptogramin, oxazolidinone and ketolide. *Mikrobiyol Bul* 2002; 36: 125-31.
19. Oteo J, Campos J, Cruchaga S, et al, and Spanish EARSS Group. Increase of resistance to macrolides in invasive *Streptococcus pneumoniae* in Spain (2000-2001). *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 851-4.
20. Sener B, Koseoglu O, Gur D, Bryskier A. Mechanisms of macrolide resistance in clinical pneumococcal isolates in a university hospital, Ankara, Turkey. *J Chemother* 2005; 17: 31-5.
21. Öncü S, Erdem H, Pahsa A. Therapeutic options for pneumococcal pneumonia in Turkey. *Clin Ther* 2005; 27: 674-83.
22. Erdem H, Pahsa A. Antibiotic resistance in pathogenic *Streptococcus pneumoniae* isolates in Turkey. *J Chemother* 2005; 17: 25-30.
23. Zarakolu P, Soyletir G, Gur D, Unal S. Antimicrobial resistance patterns of respiratory pathogens: a local report from Turkey. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9: 1257-8.
24. Budak F, Gur D. In vitro sensitivity to antimicrobial agents of *Haemophilus influenzae* strains isolated from clinical specimens. *Mikrobiyol Bul* 2003; 37: 19-25.
25. Berkiten R. Türkiye'de *Haemophilus influenzae*: Beta-laktamaz pozitifliği ve antibiyotiklere direnç (1987-2002). *Ankem Derg* 2004; 18: 53-60.
26. Gür D, Baysallar M, Küçükbaraşlan A, Özyurt M. *Haemophilus influenzae*'da in vitro makrolid direncinin araştırılması ve yorumlama kriterlerinin değerlendirilmesi. *İnfeksiyon Derg* 2002; 16: 43.