SS-135 - Tanımlamadan Sekansa *Haemophilus*: Antibiyotik Direnç Profilleri Ve Moleküler Karakterizasyonu

Hatice Hanım YURTTAKAL[1], Pınar SAĞIROĞLU[1], Ömür Mustafa PARKAN[1], Mustafa Altay ATALAY[1], Selma GÖKAHMETOĞLU[1]

[1]Erciyes Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, KAYSERİ

Giriş ve Amaç: Haemophilus türleri; çeşitli enfeksiyonlarda karşımıza çıkmakta ve artan antibiyotik dirençleriyle toplum sağlığını tehdit etmektedir. Bu çalışmada, klinik örneklerden izole edilen Haemophilus türlerinin doğru tanımlanması, antibiyotik direnç profilinin saptanması, beta laktam, kinolon ve trimetoprim-sülfametoksazol (SXT) dirençlerinin moleküler karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı Bakteriyoloji Ünitesinde Haziran 2020-Aralık 2021 tarihleri arasında izole edilen 96 Haemophilus kökeni çalışmaya dahil edilmiştir. İzolatlar XV faktör gereksinimi, MALDI Biotyper® sirius (Bruker, Almanya) ve H. influenzae real time PCR tespit kiti (Bioeksen, Türkiye) kullanılarak tanımlanmıştır. Lam aglütinasyon yöntemi ile H. influenzae tip b ve nitrosefin diskiyle beta laktamaz üretimleri araştırılmıştır. Kökenlerin antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon, sıvı mikrodilüsyon/E-test yöntemiyle belirlenmiştir. Dirençli kökenlerde blaTEM, blaROB, ftsI, QRDR (gyrA, gyrB, parC, parE), sul1, sul2 genleri PCR ile amplifiye edilmiş ve ftsI, QRDR PCR ürünleri dizi analizi yapılmıştır. Fenotipik ve/veya genotipik testlerle beta-laktamaz negatif ampisilin duyarlı (BLNAS), beta-laktamaz pozitif ampisilin dirençli (BLPAR), beta-laktamaz negatif ampisilin dirençli (BLNAR) ve beta-laktamaz pozitif amoksisilin klavulanat dirençli (BLPACR) olarak sınıflandırılmıştır.

Bulgular ve Sonuç: Doksan altı Haemophilus suşunun (49 H. influenzae, 43 H. parainfluenzae, 4 H. haemolyticus) 66'sı erkek, 48'i yatan hasta (28'i yoğun bakım ünitesi), biri 0-6 ay, 25'i 65 yaş üstü hastaların 91'i solunum yolu, üçü yara, biri göz akıntısı, biri plasenta örneğinden izole edilmiştir. MALDI-TOF MS ile dört, XV ile iki izolat tür düzeyinde yanlış tanımlanmıştır. H. influenzae'ların 12'si (%24.4) serotip b olarak bulunmuştur. Dört H. influenzae, beş H. parainfluenzae nitrosefin testi pozitif saptanmıştır. H. influenzae ve H. parainfluenzae'nın sırasıyla BLNAS, BLPAR (blaTEM pozitif), BLNAR, BLPACR oranları; %55.1(n=27), %8.1(n=4), %34.6(n=17), %2,04(n=1) ve %37.2(n=16), %13.9(n=6), %41.8(n=18), %6.9(n=3) bulunmuştur. Bir H. haemolyticus izolatı blaTEM pozitif bulunmuştur. blaROB geni çalışılan hiçbir kökende saptanamamıştır. SXT dirençli bulunan 25 kökenin 22'sinde sul1+sul2, birinde ise sadece sul1 geni saptanmıştır.Antibiyotik duyarlılık test sonuçları Tablo 1'de, H. influenzae'ya ait ftsI gen mutasyonları Tablo 2'de ve tüm izolatlara ait QRDR gen mutasyonları Tablo 3'te özetlenmiştir.Kinolon dirençli H. influenzae'larda parC G141E ve parE D420N, R379L, K384Q, Q435H; H. parainfluenzae'da gyrB E556K mutasyonları ve SXT dirençli 22 kökende sul1+sul2 birlikteliği bilindiği kadarıyla ilk kez bulunmuş olup, özellikle tek başına tespit edilen E556K mutasyonunun MİK artışı ile ilişkilendirilmesi çalışmanın öne çıkan sonuçlarındandır.

Tablo 1. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları

Tablo 1. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları*

	Kirby Bauer Disk Difüzyon Testi			Sıvı Mikrodilüsyon Testi/ E-test***					
	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)	MİK50	MİK90	MİK Aralığı
BP	22.9		77.0						
AMP	46.8		53.1	67.7		32.2	1	4	≤0.06 - >32
AMC	96.8		3.1	96.8		3.1	0.5	2	≤0.06 - 16
CEC**	70.8	3.1	26.0						
CRO	58.3		41.6						
CTX	62.5		37.5						
FEP	65.6		34.3						
MEM	95.8		4.1						
NAL	75.0		25.0						
MOX	63.5		36.4						
LEV	76.0		23.9						
CIP	76.0		23.9	79.1		20.8	0.004	≥0.5	0.002 - ≥0.5
SXT	77.0	2.0	20.8	73.9	3.1	22.9	0.032	8	≤0.002 - >32
AZT**	91.6		8.3						
CLR**	61.4	15.6	22.9	78.1	14.5	7.2	8	16	0.25 - >64
TET	91.6		8.3	92.7		7.2	0.5	2	≤0.06 - >32
RIF	84.3		15.6						
C	91.6		8.3						

BP: Benzilpenisilin, AMP: Ampisilin, AMC: Amoksisilin klavulanat, CEC: Sefaklor, CRO: Seftriakson, CTX: Sefotaksim, FEP: Sefepim, MEM: Meropenem, NAL: Nalidiksik asit, MOX: Moksifloksasin, LEV: Levofloksasin, CIP: Siprofloksasin, SXT: Trimetoprim sülfametoksazol, AZT: Azitromisin, CLR: Klaritromisin, TET: Tetrasiklin, RIF: Rifampisin, C: Kloramfenikol

*Kalite kontrol kökeni olarak; *H. influenzae* ATCC 49247, *E. faecalis* ATCC 29212 ve *S. pneumoniae* ATCC 49619 kullanılmıştır.

**Ampisilin, amoksisilin klavulanat, siprofloksasin, klaritromisin, tetrasiklin sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile trimetoprim sülfametoksazol E-test yöntemi ile çalışılmıştır.

***Sefaklor, azitromisin, klaritromisin antibiyotik duyarlılık testleri CLSI M100-32 dokümanına göre değerlendirilmiştir, diğer bütün antibiyotikler EUCAST v.12.0 klinik sınır değer tablolarına göre değerlendirilmiştir.

Tablo 2. QRDR genlerinde bulunan mutasyonlar

Tablo 2. QRDR genlerinde bulunan mutasyonlar

İzolat numaraları	*gyrA*	*gyrB*	*parC*	*parE*
H. influenzae				
16	S84L, D88G	-	S84I, N138S	D420N
24	S84L	A400V	S84I	-
25	-	M499I	-	-
35	E142K	-	-	-
50	S84L, D88G	-	S84I, N138S	D420N
55	S84L	-	S84I, N138S, G141E	D420N, R379L, K384Q, Q435H
79	S84L, D88G	-	S84I, N138S	D420N
H. parainfluenzae				
23	-	-	S138T, M198L, V205A	A451S, S452P
33	S84Δ	E556K, M557L	S138T, V205A	G457A
38	S84F, D88Y	-	S84F, S138T, M198L, V205A	-
39	S84F, D88Y	-	S84F, S138T, M198L, V205A	-
46	S84F, D88G	T474S	G82A, S84F, V205A	-
51	S84F, D88Y, N145D	-	S84Y, S138T, M198L, V205A	-
64	S84F, D88Y	-	S84Y, S138T, M198L, V205A	G457A
77	-	E556K	-	-
78	S84F, D88Y	-	S84Y, S138T, M198L, V205A	-
80	S84F, D88Y, E153K	-	S84F, V205A	D420N
86	D88Y	-	V205A	-
98	S84F, D88Y	-	S84F, S138T, M198L, V205A	-
106	-	-	M198L, V205A	-
108	S84F, D88Y	-	S84Y, S138T, M198L, V205A	-
109	-	-	S138T, M198L, V205A	-
H. haemolyticus				
104	-	-	N138S	-

Kinolonlarda MİK artışı ile en çok ilişkilendirilen mutasyonlar altı çizili olarak verilmiştir.
Mutasyonlar *H. influenzae* ve *H. haemolyticus* için *H. influenzae* Rd KW20 suşu ile; *H parainfluenzae* için T3T1 suşu ile karşılaştırılmıştır.

Tablo 3. H. influenzae ftsI Gen Mutasyonları ve BLNAR Sınıflaması

Tablo 3. *H. influenzae ftsI* Gen Mutasyonları ve BLNAR Sınıflaması

	Aminoasit pozisyonları																
	350	357	368	377	385	389	437	490	502	511	517	526	530	532	547	554	BLNAR
Rd	D	S	A	M	S	L	A	G	A	V	R	N	A	T	V	A	
10	N						S					K			I	T	IIa
11	N						S					K			I	T	IIa
24								E				K	S				IIa
25								E		A		K			I		IIa
26	N								V			K			I		IIb
35	N								V			K			I		IIb
49												K	S		I		IIa
50	N								T			K			I		IIc
61	N			I					V			K			I		IIb
72	N			I				E	V			K			I		IIb
79	N								T			K			I		IIc
82			T						T			K					IIc
100	N							E				K	S				IIa
107									V		H						I
110	N	N		I	T						H			S	I		I

Mutasyonlar *H. influenzae* Rd KW20 suşu ile karşılaştırılmıştır.
Dizi analizi yapılamayan iki izolat (44 ve 95 numara) tabloda yer almamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Haemophilus spp., TEM, ftsI, QRDR, sul

Kaynakça

1. Tristram S, Jacobs MR, Appelbaum PC. Antimicrobial resistance in Haemophilus influenzae. Clin Microbiol Rev. 2007;20(2):368–89.

2. Mohd-Zain Z, Kamsani NH, Ahmad N. Molecular insights of co-trimoxazole resistance genes in Haemophilus influenzae isolated in Malaysia. Trop Biomed. 2013;30(4):584–90.

3. Puig C, Tirado-Vélez JM, Calatayud L, Tubau F, Garmendia J, Ardanuy C, et al. Molecular characterization of fluoroquinolone resistance in nontypeable haemophilus influenzae clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59(1):461–6.

4. Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, Chiba N, Hasegawa K, Takeuchi Y, et al. Association of Amino Acid Substitutions in Penicillin-Binding Protein 3 with β-Lactam Resistance in β-Lactamase-Negative Ampicillin-Resistant Haemophilus influenzae. 2001;45(6):1693–9.

5. Andrzejczuk S, Kosikowska U, Chwiejczak E, Stępień-Pyśniak D, Malm A. Prevalence of resistance to β-Lactam antibiotics and bla genes among commensal Haemophilus parainfluenzae isolates from respiratory microbiota in Poland. Microorganisms. 2019;7(10).