

# Genital Örneklerden İzole Edilen Hemofil Cinsi Bakterilerin Tiplendirilmeleri

M. Derya Aydın, Müge Özalp, Gülseren Aktaş, Zehra Güvener, Özdem Anđ

**Özet:** Toplam 1848 genital örnekten izole edilen 46 (% 2.4) hemofil cinsi bakteri, biyotip, serotip dağılımları ve antibiyotik duyarlılıkları açısından incelendi. *Haemophilus influenzae* suşlarının % 50'si biyotip IV, *Haemophilus parainfluenzae* suşlarının % 54.5'i biyotip II olarak saptandı. *H.influenzae* suşlarının % 68.7'si serolojik olarak "tiplendirilemez" bulundu. *H.influenzae* suşlarının % 37.5, *H.parainfluenzae* suşlarının % 27.2'si ampisiline dirençli bulundu. Dirençli suşların hepsinde  $\beta$ -laktamaz üretimi saptandı.

**Anahtar Sözcükler:** Hemofil cinsi, genital sistem.

**Summary:** Typing of *Haemophilus spp* isolated from genital specimens, 46 (2.4%) *Haemophilus spp* isolated from a total of 1848 genital samples were investigated for the distribution of bio-serotypes and antibiotic susceptibilities. 50% of *H.influenzae* were found as biotype IV and 54.5% of *H.parainfluenzae* as biotype II. 68.7% of *H.influenzae* strains were found "nontypable". Ampicillin resistance was found in *H.influenzae* and *H.parainfluenzae* as 37.5% and 27.2%, respectively.  $\beta$ -lactamase activity was detected in all resistant strains.

**Key Words:** *Haemophilus spp*, genital tract.

## Giriş

Hemofil cinsi bakteriler genital sistemde klinik bulgu vermeden bulunabilecekleri gibi çeşitli infeksiyonlara da yol açabilmektedirler. Bu infeksiyonlar uretrit, vajinit, endometrit, prostatit, orşididimit, bartolinit, salpenjit, tuba-ovaryen apse veya genitöüriner infeksiyonu izleyen bakteriyemi şeklinde ortaya çıkabilir. *Haemophilus influenzae* bunlara ek olarak doğum sonrası bakteriyemi, amniyonit ve neonatal infeksiyonlara da yol açabilir (1-7).

Klian (8)'in basit biyokimyasal testlerle tiplendirme şemasını tarif etmesinden bu yana çeşitli bölgelerden izole edilen hemofil cinsi bakterilerin biyotip dağılımları ve bunun izolasyon bölgeleri, serolojik tiplendirme ve antibiyotik duyarlılığı ile ilişkileri epidemiyolojik amaçlı olarak araştırılmaktadır. Bu araştırmalarda "serotiplendirilemeyen" *H.influenzae* biyotip IV ve *H.parainfluenzae* biyotip I ve II'nin genital sistem florasında daha sık bulunduğu ortaya konulmuştur (9-12).

Çalışmamızda, genital sistem örneklerinden izole ettiğimiz hemofil cinsi bakterilerin biyoserotip dağılımlarını ve antibiyotik duyarlık profillerini ortaya koymayı amaçladık.

## Yöntemler

859'u üretral, 663'ü servikovajinal salgı ve 326'sı ejakülat olmak üzere toplam 1848 adet klinik örnekten çeşitli patojenlerin araştırılması amacıyla modifiye Thayer-Martin, % 5 insan kanlı Columbia agarı ve Shepard besiyeriyle birlikte rutin olarak basitrasimli çikolatamsı agara da ekim yapılmıştır. Besiyerleri mumlu kavanozda 37°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir.

Çikolatamsı agar besiyerinde üreyen uygun morfolojideki kolonilerden yapılan boyalı preparatta Gram-negatif kokobasillerin görülmesi ve buradan çikolatamsı agara yapılan pasajda üreme varken jeloz besiyerine yapılan pasajda üremenin olmaması durumunda bakterinin hemofil cinsi olabileceği kabul edilmiş, hemin-NAD gereksinimleri Mueller-Hinton agarda X, V, XV (Oxoid) diskleri kullanılarak araştırılmış ve % 5 at kanlı agarda hemoliz özelliklerine bakılmıştır.

Biyotiplendirme için Klian (8)'in tanımladığı biyokimyasal deneyler uygulanmıştır. Üreaz aktivitesi için Ferguson besiyerine yoğun ekim yapılmış, 37°C'de 4-12 saat inkübasyondan sonra pembe renk oluşumu halinde sonuç pozitif olarak değerlendirilmiştir. İn-

**Tablo 1. Genital Örnekler ve İzole Edilen Hemofil Cinsi Bakterilerin Sayıları**

Örnek	Sayı	<i>H.influenzae</i>	<i>H.parainfluenzae</i>	Toplam
Servikovajinal sürüntü	663	8	3	11
Üretral sürüntü	859	16	16	32
Ejakülat	326	-	3	3
Toplam	1848	24	22	46

dol oluşumu aynı besiyerinde Kovacs ayırıcı ile araştırılmıştır. Ornitin dekarboksilaz için Moeller'in ornitin dekarboksilaz buyyonu kullanılmış, yoğun ekim yapılan tüpler sıvı parafin ile kapatılmış, 37°C'de 4-12 saat inkübasyondan sonra sonuçlar değerlendirilmiştir. *H.influenzae*'nin serolojik tiplendirmesinde tip a,b,c,d,e,f antiserumları (Difco) kullanılmıştır.

Antibiyotik duyarlılıkları NCCLS kriterleri kullanılarak *Haemophilus* Test Medium'da disk difüzyon yöntemi,  $\beta$ -laktamaz varlığı nitrosefin diski (Dry Slide, Difco) kullanılarak kromojenik sefalosporin yöntemi ile araştırılmıştır.

## Sonuçlar

Toplam 1848 genital salgıdan 46 (% 2.4) hemofil cinsi bakteri izole edilmiştir. Bunların % 52'si *H.influenzae*, % 48'i *H.parainfluenzae* olarak idantifiye edilmiştir. Gelen örnekler ve izole edilen hemofil cinsi bakterilerin sayıları Tablo 1'de gösterilmiştir.

İzole edilen *H.influenzae* suşlarının çoğunluğunun biyotip IV (% 50), *H.parainfluenzae* suşlarının çoğunluğunun ise biyotip II (% 54.5) olduğu saptanmıştır. Biyotip dağılımları Tablo 2 ve 3'te gösterilmiştir.

Serotiplendirmesi yapılabilen 16 *H.influenzae* suşunun 9'u (% 56.2) "tiplendirilemez" olarak gruplandırılmıştır. Kalan suşlardan

**Tablo 2. İzole Edilen *H.influenzae* Suşlarının Biyotip Dağılımları (n=24)**

Örnek	B i y o t i p					
	I	II	III	IV	VI	V-VII-VIII
Servikovajinal sürüntü	2	1	-	4	1	-
Üretral sürüntü	2	2	3	8	1	-
Toplam	4	3	3	12	2	-

**Tablo 3. İzole Edilen *H.parainfluenzae* Suşlarının Biyotip Dağılımları (n=22)**

Örnek	B i y o t i p				
	I	II	III	IV, V, VI, VII, VIII	
Servikovajinal sürüntü	-	3	-	-	-
Üretral sürüntü	7	6	3	-	-
Ejakülat	-	3	-	-	-
Toplam	7	12	3	-	-

**Tablo 4. *H.influenzae* Suşlarının Serotip-Biyotip İlişkileri (n=16)**

Biyotip	S e r o t i p				Tiplendirilemez	Spontan Aglutinasyon
	b	c	d	f		
I	-	-	1	-	1	1
II	1	-	-	-	1	1
III	-	-	-	1	-	-
IV	-	1	-	-	6	-
VI	1	-	-	-	1	-
Toplam	2	1	1	1	9	2

ikisi b, üçü c, d ve f grubu olarak saptanmış, iki suş spontan aglutinasyon vermiştir (Tablo 4).

*H.influenzae* suşlarının dokuzunda (% 37.5) ampisilin direnci saptanmış, bunların beşinin (% 55.5) biyotip IV ve ikisinin (% 22.2) biyotip III olduğu görülmüştür. Bu suşların hepsinde β-laktamaz üretimi saptanmıştır. *H.influenzae* suşlarının duyarlık sonuçları Tablo 5'te verilmiştir.

*H.parainfluenzae* suşlarının altısının (% 27.2) ampisiline dirençli olduğu ve hepsinin β-laktamaz ürettiği saptanmıştır. Bir suş kloramfenikol ve trimetoprim-sülfametoksazole dirençli bulunmuştur.

#### İrdeleme

Çeşitli çalışmalarda hemofil cinsi bakterilerin genital sistemden izolasyonu % 0-22 gibi değişen oranlarda bildirilmiştir (1,9,10,12-17). Oranlar arasındaki farklılıklar kullanılan yöntem ve çalışmaların yapıldığı hasta gruplarındaki farklılıklara bağlı olabilir. Çalışmamızda genital sistem salgılarında hemofil cinsi bakteriler % 2.4 oranında saptanmıştır.

Basit biyokimyasal testlerle tiplendirme yapılabileceğinin bildirilmesinden bu yana çeşitli bölgelerden izole edilen hemofil cinsi bakterilerin biyotip dağılımları, biyotiplerin belli dokulara karşı seçiciliklerinin bulunup bulunmadığı, antibiyotik duyarlılıkları gibi veriler ortaya çıkarılmaya çalışılmaktadır. Çeşitli çalışmalardan alınan sonuçlar *H.influenzae* biyotip IV'ün genital sisteme özgü olabileceğini düşündürmektedir (10,12). Genital ve solunum sistemi izolatlarının karşılaştırıldığı bir çalışmada genital sistem salgılarında *H.influenzae* biyotip II ve IV, solunum sisteminde ise biyotip I ve II daha sık izole edilmiştir (18). Aynı çalışmada *H.parainfluenzae* biyotip II'nin her iki sistemde de diğer biyotiplerden daha sık izole edildiği bildirilmiştir. Çalışmamızda genital salgılardan izole edilen *H.influenzae* suşlarının % 50'si biyotip IV, *H.parainfluenzae* suşlarının % 54.5'i biyotip II olarak gruplandırılmıştır. Yapılan çalışmalarda genital bölgeden izole edilen *H.influenzae* suşlarının çoğunluğunun "serotiplendirilemez" olduğu gösterilmiştir (10,12). Çalışmamızda *H.influenzae* suşlarının % 56.2'si "serotiplendirilemez" olarak saptanmıştır. Yurdumuzda bu konuda yapılmış, literatürde saptayabildiğimiz tek çalışmada genital sistem örneklerinden toplam 15 *H.influenzae* suşunun izole edildiği bildirilmiş ve suşların % 66.6'sı tip b olarak bulunmuştur (19).

Genital sistemden izole edilen hemofillerin kaynağının orogenital ilişki olabileceği ileri sürülmüşse (5,7,18,20) de orofaringeal

**Tablo 5. Kullanılan Antibiyotiklere Dirençli ve β-Laktamaz Üreten *H.influenzae* Suşlarının Sayıları**

	B i y o t i p						Toplam
	II	III	IV	V	VI	I, VII, VIII	
β-Laktamaz Pozitifliği	1	2	5	-	1	-	9
Ampisilin	1	2	5	-	1	-	9
Ampisilin+Sulbaktam	-	-	-	-	-	-	-
Amoksisilin+Klavulanik Asid	-	-	-	-	-	-	-
Sefaklor	-	-	-	-	-	-	-
Seluroksim	-	-	-	-	-	-	-
Seftriakson	-	-	-	-	-	-	-
Kloramfenikol	-	-	1	-	-	-	-
Trimetoprim+Sülfametoksazol	-	-	3	-	-	-	3

ve genital izolatların farklı biyotipler olabilmesi genital sistemin de asıl kaynak olabileceğini göstermektedir (9,18,21). Bu ikinci görüşü destekleyen önemli bir bulgu *H.influenzae* ve *H.parainfluenzae*'nin etken olduğu endometrit ve pelvik inflamatuvar hastalık (PID) olgularının % 62'sinde rahim içi araç kullanıldığının belirlenmesi olmuştur (10). Çalışmacılar bu bulguyu, bakterilerin genital sistemin fırsatçı patojenleri arasında buldukları şeklinde yorumlamışlardır. Aynı çalışmada cinsel temasta bulaşmanın olabileceği de gösterilmiştir.

*H.influenzae* son yıllarda yenidoğanın önemli bir patojeni olarak dikkat çekmektedir. Özellikle prematürelde gözlenen *H.influenzae*'ye bağlı pnömoninin bu popülasyonda % 50'ye varan mortalitesi vardır (22). Hastalık bulgularının doğumda veya doğumdan birkaç saat sonra başlaması ve enfeksiyon etkeni bakterinin annenin genitouriner sisteminden genellikle izole edilmesi bulaşmanın anneden olduğuna kanıt olarak gösterilmektedir (7,22). Bu annelerde sıklıkla doğum sonrası endometrit gelişmektedir (22).

Hemofil cinsi bakterilerde β-laktamaz üretimi ve ampisilin direncindeki artışın sorun olması antibiyotik duyarlık deneylerinin yapılmasını zorunlu hale getirmiştir. Çoğunluğu bakteriyemili hastaların kanlarından olmak üzere çeşitli dokulardan izole edilen 600 *H.influenzae* suşuyla yapılan bir çalışmada 30 suşa β-laktamaz varlığı saptanmış, bunların çoğunluğunun biyotip I ve II oldukları gösterilmiştir (23). Çalışmamızda genital salgılardan izole edilen *H.influenzae* suşlarında % 37.5, *H.parainfluenzae* suşlarında % 27.2 oranında ampisilin direnci saptanmış ve direncin β-laktamaz üretimine bağlı olduğu gösterilmiştir.

Genital sistemin normal florasında bulunabilen hemofil cinsi bakterilerin, ciddi olabilen çeşitli enfeksiyonlara yol açabilecekleri göz önüne alındığında, bu sisteme ait örneklerde rutin olarak aranması gerekliliği ortaya çıkmaktadır.

#### Kaynaklar

- Hall GD, Washington JA. Haemophilus influenzae in genitourinary tract infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1983; 1: 65-70
- Sturm AW. Haemophilus influenzae and Haemophilus parainfluenzae in nongonococcal urethritis. *J Infect Dis* 1986; 153: 165-7
- Albritton WL, Hammond GW, Ronald AR. Bacteremic Haemophilus influenzae genitourinary tract infections in adults. *Arch Intern Med* 1978; 138: 1819-21
- Clairmont GJ, Zon LI, Groopman JE. Hemophilus parainfluenzae prostatitis in a homosexual man with chronic lymphadenopathy syndrome and HTLV-III infection. *Am J Med* 1987; 82: 175-8
- Puvonen J, Lehtinen M, Tersala K, Heinonen PK. Haemophilus influenzae causes purulent salpingitis. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 151: 338-9
- Tashjian JH, Cowlam CB, Washington JA. Vaginal flora in asymptomatic women. *Mayo Clin Proc* 1976; 51: 557-61
- Meis JF, Bergman KA, Smedts F, Horrevorts AM. Fulminant neonatal sepsis due to Haemophilus influenzae. *Scand J Infect Dis* 1991; 23: 649-52

8. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. *Color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. 4th ed. Philadelphia: J.B. Lippincott, 1992; 279-302
9. Martel AY, Laurent GS, Dansercav LA, Bergeran MG. Isolation and biochemical characterization of Haemophilus species isolated simultaneously from oropharyngeal and anogenital areas. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1486-9
10. Quentin R, Musser JM, Mellovet M, Sizaret PY. Typing of urogenital, maternal and neonatal isolates of Haemophilus influenzae and Haemophilus parainfluenzae in correlation with clinical source of isolation and evidence for a genital specificity of H.influenzae biotype IV. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 2286-94
11. Albritton WL, Brunton JL, Merrer M, Bowman NN, Slaney LA. Haemophilus influenzae: comparison of respiratory tract isolates with genitourinary tract isolates. *J Clin Microbiol* 1982; 16: 826-31
12. Wallace RJ, Baker CJ, Quinonas FJ, Hollis DG, Weaver RE, Wiss K. Nontypeable Haemophilus influenzae (biotype IV) as a neonatal, maternal and genital pathogen. *Rev Infect Dis* 1983; 5: 123-36
13. Bartlett JG, Onderdonk AB, Drude E, Goldstein C, Anderka M, Alpert S, McCormack WM. Quantitative bacteriology of the vaginal flora. *J Infect Dis* 1977; 136: 271-7
14. Beargie R, Lynd P, Tucker E, Duhring J. Perinatal infection and vaginal flora. *Am J Obstet Gynecol* 1965; 122: 31-3
15. Gardner JJ. Comparison of the vaginal flora in sexually abused and nonabused girls. *J Pediatr* 1992; 120: 872-7
16. Hammerschlag MR, Alpert S, Rosner I, Thurston P, Semine D, McComb D, McCormack WM. Microbiology of the vagina in children: normal and potentially pathogenic organisms. *Pediatrics* 1978; 26: 57-62
17. Verweij PE, Meis JF. Colonization of the female genital tract with Haemophilus influenzae. *Pediatr Infect Dis J* 1994; 13: 758-61
18. Sturm AW. Isolation of Haemophilus influenzae and Haemophilus parainfluenzae from genital tract specimens with a selective culture medium. *J Med Microbiol* 1986; 21: 349-52
19. Mamal-Torun M. Türkiye'de Haemophilus influenzae infeksiyonları sorunu. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg* 1992; 22: 81-7
20. Drovot EB, Denoyel GA, Boudee MM, Boussant G, Montelos H. Distribution of Haemophilus influenzae and Haemophilus parainfluenzae biotypes isolated from the human genitourinary tract. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1989; 8: 951-5
21. Füzi M. Haemophili in sexually transmitted diseases. *Lancet* 1980; ii: 476
22. Geme JW. Nontypeable Haemophilus influenzae disease: epidemiology, pathogenesis, and prospects for prevention. *Infect Agent Dis* 1993; 2: 1-16
23. Albritton WL, Penner S, Slaney L, Brunton J. Biochemical characteristics of Haemophilus influenzae in relationship to source of isolation and antibiotic resistance. *J Clin Microbiol* 1978; 7: 519-23