

تعیین شیوع هموفیلوس آنفلوانزا در نازوفارنکس کودکان سالم و الگوی مقاومت این باکتری نسبت به آنتی بیوتیک ها در شهر مشهد

دکتر کیارش قزوینی¹، *دکتر مهدی بخشایی²، دکتر حمید نادری³،
دکتر احمد زمانیان⁴، دکتر جواد قناعت⁵، محمود باقری⁶

¹ استادیار میکروب شناسی و ویروس شناسی،² استادیار گوش، گلو و بینی،³ استادیار بیماری های عفونی،
⁴ دستیار تخصصی گوش، گلو و بینی،⁵ استاد میکروب شناسی و ویروس شناسی،
⁶ کارشناس ارشد میکروب شناسی - دانشگاه علوم پزشکی مشهد

خلاصه

مقدمه: از آن جایی که آگاهی از میزان کلونیزاسیون هموفیلوس آنفلوانزا در نازوفارنکس کودکان از اهمیت بسیاری برخوردار است در این مطالعه سعی گردید تا ضمن تعیین میزان حضور هموفیلوس آنفلوانزا در حلق کودکان سالم الگوی مقاومت این باکتری نیز در شهر مشهد تعیین گردد.

روش کار: در این مطالعه 1161 کودک سالم زیر 6 سال مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای این منظور از نازوفارنکس این کودکان سوابی تهیه و کشت گردید و پس از جداسازی و شناسایی هموفیلوس آنفلوانزا الگوی مقاومت باکتری های جدا شده توسط روش انتشار از دیسک تعیین گردید.

یافته ها: بر اساس یافته ها میزان حضور هموفیلوس آنفلوانزا در حلق کودکان در این منطقه 10/76٪ بود (125 مورد از 1161 نمونه). در این مطالعه مقاومت بالایی در مقابل آنتی بیوتیک های رایج مانند: پنی سیلین 82/4٪، آمپی سیلین 70/4٪، آموکسی سیلین 79/2٪ و ترمتوپریم سولفامتو کسازول 71/2٪ مشاهده شد. همچنین مشخص گردید که 68/8٪ و 42/4٪ سوبه های جدا شده هموفیلوس آنفلوانزاها نسبت به اریترومايسين و سیفیکسیم حساس بوده اند.

نتیجه گیری: با توجه به مقاومت بسیار بالای هموفیلوس آنفلوانزاهای جدا شده در مشهد نسبت به آمپی سیلین، ترمتوپریم - سولفامتو کسازول و برخی آنتی بیوتیک های دیگر بایستی انتخاب آنتی بیوتیک در درمان عفونت های ایجاد شده توسط این باکتری براساس آنتی بیوگرام انجام شود. همچنین هموفیلوس آنفلوانزاهای کلونیزه در حلق به عنوان مخزنی برای عفونت در جامعه عمل می کند لازم است که مطالعات گسترده تری جهت تعیین الگوی مقاومت این باکتری ها انجام گردد و بر آن اساس پیشنهاد استفاده از این آنتی بیوتیک ها و یا آنتی بیوتیک مناسب دیگر برای درمان عفونت های ناشی از این باکتری در کشور مطرح گردد.

واژه های کلیدی: هموفیلوس آنفلوانزا، شیوع، مقاومت آنتی بیوتیکی

مقدمه

روش کار

هموفیلوس آنفلوانزا یکی از عوامل بیماریزای مهم در سیستم تنفسی می باشد که می تواند باعث عفونت ها حاد گوش میانی، سینوزیت، پنومونی و حملات حاد برونشیت گردد امروزه بروز مقاومت و یا کاهش حساسیت نسبت به آنتی بیوتیک ها در بسیاری از سویه های این ارگانیزم مشاهده می شود (1،2). در کشور ما تا کنون هیچ مطالعه اپیدمیولوژیک که میزان شیوع حاملین نازوفارنژیال هموفیلوس آنفلوانزا را مشخص نماید و نشان دهد که چند درصد میکروب های فوق دارای بتالاکتاماز می باشند و به چه آنتی بیوتیک هایی مقاوم و یا حساس می باشند انجام نشده است. از نمونه ها فوراً بر روی محیط کشت انتخابی مناسب تلقیح شد. آن جایی که درمان اغلب عفونت های ناشی از این باکتری به صورت امپریکال و بدون انجام آنتی بیوگرام صورت می پذیرد انجام مطالعات مقطعی در زمینه تعیین مقاومت این باکتری به منظور انتخاب آنتی بیوتیک مناسب و پرهیز از استفاده از آنتی بیوتیک های نامناسب که علاوه بر عدم تاثیر درمانی باعث بروز مقاومت نیز می گردد اهمیت ویژه ای دارد در این زمینه امروزه گزارشات متعددی از نقاط مختلف دنیا در مورد افزایش میزان مقاومت این باکتری نسبت به آنتی بیوتیکها گزارش شده است (4-2). جهت انتخاب آنتی بیوتیک های مناسب برای درمان سریع قبل از آماده شدن نتیجه آزمونهای تعیین حساسیت نیاز به اطلاع دقیق و به روز از الگوی مقاومت باکتری های کلونیزه شده می باشد زیرا اغلب همین باکتری های کلونیزه شده در حلق باعث بروز عفونت می گردد (5). با توجه به این موضوع بر آن شدیم که بررسی جامعی در مورد شیوع و فراوانی این باکتری در حلق کودکان سالم (9 سال داشته باشیم و همچنین با تعیین الگوی مقاومت آن ها نسبت به آنتی بیوتیک ها علاوه بر کمک به تعیین آنتی بیوتیک های موثر در درمان عفونت های ناشی از هموفیلوس آنفلوانزا از گسترش بیشتر مقاومت دارویی در اثر استفاده نامناسب از آنتی بیوتیک ها جلوگیری گردد. به ویژه در این مطالعه تلاش گردیده تا با تعیین الگوی حساسیت و مقاومت هموفیلوس آنفلوانزا موجود زمینهرای انتخاب مناسب ترین آنتی بیوتیک فراهم گردد.

در این مطالعه مقطعی که از ابتدای اسفند سال 1383 تا انتهای بهمن 1384 در 18 مهد کودک در نقاط مختلف شهر مشهد انجام گرفت 1161 نفر کودک سالم زیر 6 سال مورد ارزیابی قرار گرفتند. لازم به ذکر است که این کودکان پس از تکمیل پرسش نامه و موافقت والدین مورد معاینه قرار گرفتند و در صورت نداشتن سابقه عفونت در یک ماه اخیر و نداشتن سابقه مصرف آنتی بیوتیک در سه ماه گذشته با استفاده از سواب استریل از نازوفارنکس آن ها نمونه برداری گردید و از نمونه ها فوراً بر روی محیط کشت انتخابی مناسب تلقیح شد. برای آماده نمودن محیط کشت از محیط کشت برین هارت انفوزیون آگار حاوی 5٪ خون گوسفند استفاده گردید که به این محیط کشت 5µg/ml وانکومايسين، 1µg/ml کلیندامایسین و 300µg/ml باسیتراسین اضافه شده بود تا محیط فقط برای رشد هموفیلوس آنفلوانزا انتخابی گردد (6). محیط کشت های تلقیح شده با نمونه ها پس از 48 ساعت انکوباسیون در دمای 36 درجه سانتیگراد در داخل جار دی اکسید کربن از نظر رشد هموفیلوس آنفلوانزا مورد بررسی قرار گرفتند. برای این منظور در آزمایشگاه پلیت های کشت شده با استفاده از ذره بین از نظر رشد کلنی های با ظاهر مشابه هموفیلوس آنفلوانزا با روش استاندارد ارزیابی شد. در این راستا جهت تایید حضور هموفیلوس آنفلوانزا ابتدا از کلنی های ظاهر شده بر روی محیط کشت اسمیر تهیه و پس از رنگ آمیزی گرم مورد بررسی میکروسکوپی قرار می گرفت و سپس بر اساس خصوصیات میکروسکوپی باکتری، ظاهر کلنی و تست در های بیوشیمیایی تایید کنند حضور هموفیلوس آنفلوانزا تایید می گردید (7). هموفیلوس آنفلوانزا های شناسایی تایید شده از نظر حساسیت و مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک های خوراکی رایج در درمان عفونت های هموفیلوس آنفلوانزا با روش Agar Diffusion (روش کربی بائر) و تعیین MIC مورد ارزیابی قرار گرفتند (8).

(10/76٪) باکتری هموفیلوس آنفلوانزا جدا سازی و شناسایی گردید. متوسط سن کودکان مورد آزمایش 4/15 سال بود و متوسط سن کودکانی که هموفیلوس آنفلوانزا را در حلق خود داشتند 3/55 سال بود میزان حضور هموفیلوس آنفلوانزا در حلق کودکان در گروه سنی زیر 3 سال و بالای 3 سال از نظر آماری تفاوت معنی داری نداشت (P value =0/704) از نظر جنس 56٪ از کودکان آلوده با هموفیلوس آنفلوانزا پسر و 44٪ دیگر دختر بودند که از نظر آماری این اختلاف معنی دار نیست و به عبارتی درصد ابتلاء به هموفیلوس آنفلوانزا در دو جنس با هم برابر است (P value=0/21) اطلاعات مربوط به مقاومت و حساسیت سویه های جدا شده از حلق این کودکان در جدول شماره (1) نشان داده شده است.

حدود غلظت های مورد استناد برای تعریف حساسیت و یا مقاومت باکتری نسبت به آنتی بیوتیک بر اساس توصیه NCCLS برای هموفیلوس آنفلوانزا تعیین گردید نتیجه ارزیابی حساسیت هموفیلوس آنفلوانزاهای مورد بررسی پس از 24 ساعت انکوباسیون پلیت ها در گرمخانه 36°C بصورت حساس (S)، نیمه حساس (I) و مقاوم (R) تفسیر و ثبت گردید (9). اطلاعات جمع آوری شده پس از کدبندی با نرم افزار آماری SPSS آنالیز گردید. پنی سیلین، آمپی سیلین، آموکسی سیلین، کوتریموکسازول، اریترومایسین و سیفیکسیم آنتی بیوتیک های مورد بررسی در این مطالعه بودند

نتایج

در بین این 1161 کودک مورد بررسی در حلق 125 کودک

جدول 1- تعداد و میزان حساسیت و مقاومت باکتری هموفیلوس آنفلوانزا در مقابل آنتی بیوتیک ها

آنتی بیوتیک	حساس	نسبتاً مقاوم	مقاوم
Penicillin	18(14/4)	4(3/2)	103(82/4)
Ampicillin	29(23/2)	8(6/4)	88(70/4)
Amoxicillin	21(16/8)	5(4)	99(79/2)
Sulfamethoxazole-trimethoprim	30(24)	6(4/8)	89(71/2)
Erythromycin	86(68/8)	17(13/6)	22(17/6)
Cefexim	53(4/4)	0(0)	72(57/6)

باکتری های کلونیزه شده دارد و با توجه به گزارشات متعددی از نقاط مختلف دنیا در مورد افزایش میزان مقاومت باکتری هموفیلوس آنفلوانزا نسبت به آنتی بیوتیک ها نسبت به آنتی بیوتیک ها انجام مطالعات مقطعی در زمینه تعیین مقاومت این باکتری به منظور انتخاب آنتی بیوتیک مناسب و پرهیز از استفاده از آنتی بیوتیک های نامناسب اهمیت ویژه ای دارد با توجه به این موضوع در این تحقیق علاوه بر تعیین شیوع و فراوانی این باکتری در حلق کودکان سالم زیر 6 سال تلاش گردیده تا با تعیین الگوی حساست و مقاومت هموفیلوس آنفلوانزا موجود زمینه برای انتخاب مناسب ترین آنتی بیوتیک فراهم گردد.

همان گونه که مشاهده می گردد در بین آنتی بیوتیک های مورد بررسی بیشترین مقاومت در مقابل پنی سیلین و آموکسی سیلین دیده شد و بیشترین حساسیت در بین باکتری ها نسبت به اریترومایسین و سیفیکسیم مشاهده شده است. قابل توجه است که در بین هموفیلوس آنفلوانزاهای مورد مطالعه 24 سویه به هیچ یک از آنتی بیوتیک های مورد بررسی حساس نبودند.

بحث

از آن جایی که انتخاب آنتی بیوتیک مناسب برای درمان سریع عفونت های سیستم تنفس فوقانی قبل از آماده شدن نتیجه آزمون های تعیین حساسیت نیاز به اطلاع دقیق و به روز از الگوی مقاومت

اریترومایسین مقاوم بوده اند (17، 16). این افزایش مقاومت به ویژه در نقاطی مانند اروپا بیشتر گزارش گردیده است (20-18) به نحوی که در فرانسه 8/45٪ هموفیلوس آنفلوانزاها مقاوم به آمپی سیلین بوده اند (21) که با توجه به آن که در بسیاری از مطالعات نشان داده شده است که هموفیلوس آنفلوانزاهای کلونیزه در حلق به عنوان مخزنی در جامعه برای ایجاد عفونت در جامعه عمل می کند و الگوی مقاومت باکتری های ایجاد کننده عفونت با میزان مقاومت هموفیلوس آنفلوانزاهای کلونیزه در حلق نسبت دارد بایستی در درمان این قبیل عفونت ها با دقت بیشتری عمل شود (16، 21). ولی برخی مطالعات دیگر میزان مقاومت در پایین تر از این پژوهش بوده است برای مثال در مطالعه سولیکوسکی در لهستان بیش از 90٪ سویه های هموفیلوس آنفلوانزای جدا شده نسبت به آمینو پنی سیلین ها حساس بودند (14) که این مسئله ضرورت تحقیق بیشتر و عمیق تر را در این زمینه بر پایه این پژوهش نشان می دهد. در این مطالعه بیشترین حساسیت در بین باکتری ها نسبت به اریترومایسین و سیفیکسیم مشاهده شده است که با توجه به مصرف گسترده این دو آنتی بیوتیک جا دارد ضمن استفاده بجا از این آنتی بیوتیک ها از کاربرد آن ها در دیگر عفونت ها حداقل امکان پرهیز گردد تا از بروز مقاومت نسبت به این دارو ها کاسته شود. با این همه قابل توجه است که در بین هموفیلوس آنفلوانزاهای مورد مطالعه 24 سویه به هیچ یک از آنتی بیوتیک های مورد بررسی حساس نبودند که نشان می دهد در هیچ موردی نمی توان آنتی بیوتیکی را بدون دغدغه مقاومت به کاربرد. به طور کلی بررسی انجام شده حاکی از آن است که اگرچه بعضی از آنتی بیوتیک ها هنوز تاثیر نسبتاً خوبی بر باکتری دارند ولی برخی دیگر عملاً از دایره کاربرد خارج شده اند و یا به زودی خارج خواهند شد. هرچند عمده ترین علت مقاومت میکروبی را به وجود ژن های قابل انتقال نسبت داده اند اما نباید از

در بین این 1161 کودک مورد بررسی در حلق 125 کودک (10/7٪) باکتری هموفیلوس آنفلوانزا شناسایی گردید. که این میزان کلونیزاسیون مشابه مقادیر گزارش شده از کودکان سالم در ژاپن (10/7٪) و کودکان 7 تا 12 ساله ترکیه (17٪) بوده است (10/11) در کنار این مسئله قابل توجه است که در برخی گزارشات از کشورهای دیگر میزان کلونیزاسیون هموفیلوس آنفلوانزا در حلق کودکان بسیار بالاتر از موارد فوق ذکر شده است برای مثال در مطالعه ای که در ولز صورت پذیرفت 304 کودک (30/5٪) از 996 کودک مورد مطالعه دارای هموفیلوس آنفلوانزا در حلق خود بودند (12). و یا در مطالعه ای مشابه در پکن که بر روی 292 کودک انجام پذیرفت 36٪ کودکان دارای هموفیلوس آنفلوانزا در حلق خود بودند (13). همچنین در مطالعه دیگری که در لهستان صورت گرفته است و شیوع هموفیلوس آنفلوانزا را در حلق 94 کودکی که در مهد کودک ها نگهداری می شدند ارزیابی نموده است نیز ملاحظه می گردد 2/37٪ این کودکان حامل هموفیلوس آنفلوانزا در حلق خود بوده اند (14) و در روسیه این میزان حتی تا 44٪ نیز می رسد (15). البته نباید نقش عوامل مختلف مانند روش نمونه گیری و کشت را در این میان نادیده گرفت ولی علیرغم عدم واکنش باکتری در کشور ما با توجه به تعداد قابل توجه کودکان مورد بررسی در این مطالعه قطعاً اطلاعات حاصل از این تحقیق قابل استناد می باشد و بایستی در سیاست گذاری های کشور در مورد پیشگیری از بیماری های حاصل از این باکتری مد نظر قرار گیرد. همان گونه که مشاهده می گردد در بین آنتی بیوتیک های مورد بررسی پنی سیلین و آمینو پنی سیلین ها چندان در مقابل هموفیلوس آنفلوانزاهای کارآمد نیستند. افزایش مقاومت در دیگر مطالعات نیز گزارش گردیده است. برای مثال در دو مطالعه ای در هند 79٪ و 44٪ هموفیلوس آنفلوانزا نسبت به آمپی سیلین، 84٪ و 67/3٪ نسبت به ولفامتوکسازول- تریمتوپریم و 95٪ و 27/5٪ نسبت به

نظر دور داشت که فشار انتخابی ناشی از استفاده گسترده از آنتی بیوتیک ها نیز به گزینش باکتری های با مقاومت چندگانه می انجامد. بنابراین توصیه به انتخاب آنتی بیوتیک مناسب بر اساس آنتی بیوگرام نقش مهمی در درمان و پیشگیری از گسترش مقاومت خواهد داشت.

شعله باقریان و دیگر پرسنل آزمایشگاه بیمارستان دانشگاهی قائم (عج)

که در انجام این مطالعه صمیمانه همکاری نمودند اعلام می داریم.

تشکر و قدردانی

References

- 1- Borderon JC. Haemophilus influenza: colonization and infection. Arch Pediatr 1995; 2(3):249-54.
- 2- Hotomi M, Fujihara K, Sakai A, Billal DS, Shimada J et al. Antimicrobial resistance of Haemophilus influenza isolated from the nasopharynx of Japanese children with acute otitis media. Acta Otolaryngol 2006; 126(3):240-7.
- 3- Cornaglia G, Fontana R. Epidemiological survey of bacterial resistance in upper respiratory tract infections in Italy. Int J Antimicrob Agents 2000; 16:259-62.
- 4- ýguez JA, Baquero F, Lomas J, Aguilar L. Antimicrobial susceptibilities of 1,422 Haemophilus influenza isolates from respiratory tract infections in Spain. Results of a 1-year (1996-1997) multi centre surveillance study. Infection 1999; 27: 265-7.
- 5- Farjo RS, Foxman B, Patel MJ, Zhang L, Pettigrew MM et al. Diversity and sharing of Haemophilus influenza strains colonizing healthy children attending day-care centers. Pediatr Infect Dis J 2004; 23(1):41-6.
- 6- Chapin KC, Doern GV. Selective media for recovery of Haemophilus influenzae from specimen contaminated with upper respiratory tract microbial flora. J Clin Microbiol 1992; 30:1917-21.
- 7- Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 4th.ed. Philadelphia: Mosby; 2002. p. 78- 81.
- 8- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turk N. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. American Journal of Clinical Pathology 1966; 45:493-496.
- 9- National Committee for Clinical Laboratory Standards, (1998) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Approved standard M100-S8, Wayne, PA: NCCLS.
- 10-Asahi E, Okada K, Ueda K. Nasopharyngeal flora and carriage rates of Haemophilus influenzae type B of healthy infants. Kansenshogaku Zasshi 1997; 71(3):236-40.
- 11- Ayyildiz A, Aktas AE, Yazgi H. Nasopharyngeal carriage rate of Haemophilus influenzae in children aged 7-12 years in Turkey. Int J Clin Pract 2003; 57(8):686-8.
- 12-Howard AJ, Dunkin KT, Millar GW. Nasopharyngeal carriage and antibiotic resistance of Haemophilus influenzae in healthy children. Epidemiol Infect 1988; 100(2):193-203.
- 13-Hu YY, Yu SJ, Liu G, Gao W, Yang YH. Antimicrobial susceptibility of Haemophilus influenzae among children in Beijing, China, 1999-2000. Acta Paediatr 2002;91(2):136-40.
- 14- Sulikowska A, Grzesiowski P, Sadowy E, Fiett J, Hryniewicz W. Characteristics of Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, and Moraxella catarrhalis Isolated from the Nasopharynxes of Asymptomatic Children and Molecular Analysis of S. pneumoniae and H. influenzae Strain Replacement in the Nasopharynx. Journal of clinical microbiology. 2004; 42(9): 3942-3949.

- 15-Stratchounski LS, Kretchikova OI, Reshedko GK, Stetsiouk OU, Kandalov MM et al. Antimicrobial susceptibility of nasopharyngeal isolates of *Haemophilus influenzae* from healthy children in day-care centers. Results of multicentre study in Russia. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 18(4):347-51.
- 16-Das BK, Arora NK, Mathur P, Ostwal P, Mandal S et al. Nasopharyngeal carriage of *Haemophilus influenzae*. *Indian J Pediatr* 2002; 69(9):775-7.
- 17- Jain A, Kumar P, Awasthi S. High ampicillin resistance in different biotypes and serotypes of *Haemophilus influenzae* colonizing the nasopharynx of healthy school-going Indian children. *J Med Microbiol* 2006; 55(Pt 2):133-7.
- 18- Kanellakopoulou K, Giamarellou H, Avlami A. Surveillance study of resistance in *Haemophilus* species in Greece. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1988; 7:186-8.
- 19- Marco F, Lomas J, Rey C, Bouza E, Aguilar L et al. The Spanish surveillance group for respiratory pathogens. Antimicrobial susceptibilities of 1730 *Haemophilus influenzae* respiratory tract isolates in Spain in 1998-1999. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:3226-8.
- 20- Melo-Cristino J, Fernandes ML, Serrano N. The Portuguese surveillance group for the study of respiratory pathogens. A multicenter study of the antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis* isolated from patients with community-acquired lower respiratory tract infections in 1999 in Portugal. *Microb Drug Resist* 2001; 7: 33-8.
- 21-Dabernat H, Plisson MA, Delmas C, Seguy M, Faucon G et al. *Haemophilus influenzae* carriage in children attending French day care centers: a molecular epidemiological study. *J Clin Microbiol* 2003; 41(4):1664-72.

Abstract**Prevalence and Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae* among healthy children in Mashhad**

Ghazvini K. MD, Bakhshae M. MD, Naderi M. MD, Zamanian A. MD, Ghanaat J. MD

I ntroduction: Nasopharyngeal colonization of *Haemophilus influenzae* in young children may be important so in this study the nasopharyngeal carriage and antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae* among children was surveyed in Mashhad.

Materials and Methods: The study included 1161 healthy children less than 6 years of age. Nasopharyngeal swabs from these patients were cultured, and *Haemophilus influenzae* were isolated. Antibiotic susceptibility of the strains was determined using disk diffusion.

Results: The carriage rate of *Haemophilus influenzae* was 10.76% (125/1161). High antibiotic resistance was observed against commonly administered antibiotics like Penicillin (82.4%), ampicillin (70.4%), Amoxicillin (79.2%) and trimethoprim sulfamethoxazole (71.2%). It was found that 68.8% and 42.4% of isolates were susceptible against erythromycin and cefexim, respectively.

Conclusion: *H. influenzae* isolates from healthy Children in Mashhad had high resistance rates against ampicillin, Sulphamethoxazole/ trimethoprim and some other antibiotics. So antibiotic

susceptibility investigations are important for choice of therapy in every acute respiratory tract infection. And further monitoring of antibiotic resistance among nasopharyngeal H. influenza as a surrogate for invasive H. influenza seems an attractive option.

Key words: Haemophilus influenza, Bacteria, Antibiotic resistance