



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**



HAEMOPHILUS INFLUENZAE İZOLATLARININ ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ İNCELENMESİ

Dr. Ülker KARAKURT

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Ebru EVREN**

**ANKARA
2023**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**HAEMOPHILUS INFLUENZAE İZOLATLARININ
ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ İNCELENMESİ**

Dr. Ülker KARAKURT

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Ebru EVREN**

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNATÖRLÜĞÜ PROJE NO: TTU-2022-2486**

**ANKARA
2023**

Ankara Üniversitesi
Tıp Fakóltesi Dekanlığı'na,

Tıpta Uzmanlık Tezi olarak hazırlayıp sunduğum “*Haemophilus influenzae* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının İncelenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan araştırma tarafımda yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Bu tez çalışmasıyla ilgili tüm süreçler Ankara Üniversitesi Tıp Fakóltesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulu tarafından, 14 Ekim 2021 tarihinde, 19-581-21 numaralı kararla onaylanmıştır.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Ülker KARAKURT

Tarih: 14.07. 2023

İmza:

ÖZGÜNLÜK RAPORU

Turnitin Orijinallik Raporu

- İşleme konu: 05-Tem-2023 06:35 +03
- NUMARA: 2126649196
- Kelime Sayısı: 23007
- Gönderildi: 1

Haemophilus influenzae izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarının incelenmesi Ülker Karakurt tarafından

Benzerlik Endeksi

%9

Kaynağa göre Benzerlik

Internet Sources:
%8

Yayınlar:
%4

Öğrenci Ödevleri:
%3



KABUL ONAY SAYFASI

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN	
Adı, Soyadı: Dr. Ülker KARAKURT	Sınav tarihi: 14/07/2023
Anabilim/Bilim Dalı: TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI	
Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ebru EVREN	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER
Tezin Başlığı: <i>Haemophilus influenzae</i> İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının İncelenmesi
Tezin Niteliği: ☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi ☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi
Kaçıncı tez sınavı olduğu: ☒ 1 ☐ 2 ☐ 3

III. KARAR
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin “Tıpta Uzmanlık Tezi” olarak ☒ Kabulüne ☐ Reddine ☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine ☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.

IV. AÇIKLAMALAR
Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız.

Jüri Başkanı
Prof. Dr. Devran GERÇEKER
Anabilim/Bilim Dalı

Jüri Üyesi
Prof. Dr. T. Murat ÖZSAN
Anabilim/Bilim Dalı

Jüri Üyesi
Doç. Dr. Ebru EVREN
Anabilim/Bilim Dalı

ÖNSÖZ

Haemophilus influenzae insanlarda mukozal yüzeylerde kolonize olarak üst solunum yolu enfeksiyonu, konjonktivit, pnömoni, epiglottit, menenjit, artrit gibi çeşitli klinik tablolara neden olabilen bakteriyel bir patojendir. Konjuge *H. influenzae* tip b aşılarının ülkelerin aşılama programlarına dahil edilmesiyle birlikte bu serotipe bağlı ciddi hastalıklarda azalma sağlanmıştır. Ancak son yıllarda bu serotip dışındaki serotiplerle ve tiplendirilemeyen *H. influenzae* (NTHi) ile gelişen hastalıkların sıklığında artış gözlenmektedir. Özellikle yaşlı popülasyonda artış eğilimi gösteren NTHi ile gelişen enfeksiyonlarda karbapenem direnci raporlanmaya başlanmıştır. Sepsis gibi ampirik tedavinin başlanması gereken durumlarda karbapenem dirençli bir *H. influenzae* izolatu tedavî başarısızlığına neden olabilir. Bu çalışmada, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Eğitim ve Araştırma Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen klinik örneklerin kültürlerinde üreyen *H. influenzae* izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemiyle incelenmiş, ayrıca karbapenem grubunda yer alan imipenem ve meropenem duyarlılıkları gradiyent şerit test yöntemi ve referans yöntem olan sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile çalışılarak sonuçların birbirleriyle olan uyumu değerlendirilmiştir.

Tez çalışmam ve uzmanlık eğitimim süresince bilgi, beceri, tecrübesi ile yol gösteren, içtenliği ve samimiyetiyle manevi olarak destek olan değerli hocam ve tez danışmanım Doç.Dr. Ebru EVREN'e,

Uzmanlık eğitimimde akademik bilgi ve tecrüberini paylaşarak önemli bakış açılarını kazanmamı sağlayan başta Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Devran Gerçekler olmak üzere Anabilim Dalı'nın tüm değerli Öğretim Üyelerine, birlikte çalışmaktan keyif aldığım uzmanlık öğrencisi arkadaşlarıma, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın tüm personeline,

Beni koşulsuz bir sevgiyle destekleyen aileme, maalesef bu süreçte kaybettiğim sevgili babama, her şekilde yanımda olup destekleyen sevgili eşime ve güzel oğluma teşekkür ederim.

Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TTU-2022-2486 proje numarası ile desteklenmiştir.

Dr. Ülker KARAKURT

Ankara 2023

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Özgünlük Raporu	iii
Kabul Onay Sayfası	iv
Önsöz	v
İçindekiler	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller Dizini	xii
Tablolar Dizini	xiii

1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	3
3. GİRİŞ ve AMAÇ	5
4. GENEL BİLGİLER	7
4.1. Tarihçe	7
4.2. Taksonomi	8
4.3. Mikrobiyolojik Özellikler	10
4.4. <i>Haemophilus influenzae</i>	11
4.4.1. Gram Boyanma Özellikleri ve Mikroskopik Görünüm	11
4.4.2. Kültürde Üreme Özellikleri ve Koloni Morfolojisi	11
4.4.3. Biyokimyasal Özellikler	13
4.4.4. Hücre Duvarı Yapısı ve Antijenik Yapılar	15
4.4.4.1. Kapsül	15
4.4.4.2. Lipooligosakkarit (LOS)	16
4.4.4.3. Dış zar proteinleri (DZP)	16
4.4.5. Antijenik Çeşitlilikte Rol Oynayan Moleküler Mekanizmalar	17
4.4.5.1. Nokta Mutasyonlar	17
4.4.5.2. Gen Amplifikasyonları	17
4.4.5.3. Faz Versiyonu	17
4.4.5.4. Yatay Gen Transferi ve Rekombinasyon	17
4.4.6. Serotiplendirme	18
4.4.7. Biyotiplendirme	18
4.4.8. Patogenez ve Virulans Faktörleri	19
4.4.8.1. Kolonizasyon	19

4.4.8.2. IgA proteaz	20
4.4.8.3. İnvaziv Enfeksiyonlar	20
4.4.9. İmmünite ve Aşılar	20
4.4.10. Risk Faktörleri	21
4.4.11. Epidemiyoloji	22
4.4.12. Klinik Tablolar	23
4.4.12.1. Menenjit	24
4.4.12.2. Epiglottit	24
4.4.12.3. Bakteriyemi ve Bakteriyeminin Enfeksiyöz Komplikasyonları	24
4.4.12.4. Pnömoni	24
4.4.12.5. Perikardit	24
4.4.12.6. Otitis Media	25
4.4.12.7. Sinüzit	25
4.4.12.8. Göz Enfeksiyonları	25
4.4.12.9. Brezilya Purpurik Ateşi (BPA)	25
4.4.12.10. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı Alevlenmeleri	25
4.4.12.11. Ürogenital, Maternal, Perinatal ve Neonatal Enfeksiyonlar	26
4.4.12.12. Diğer <i>H. influenzae</i> Enfeksiyonları	26
4.5. <i>H. influenzae</i> Dışındaki Türlerle Oluşan Enfeksiyonlar	26
4.5.1. Endokardit	26
4.5.2. Şankroid (Yumuşak Şankr)	26
4.6. Tedavide Kullanılan Antibiyotikler ve Direnç Mekanizmaları	26
4.6.1. Beta-laktam Sınıfı Antibiyotikler ve Direnç Gelişimi	27
4.6.1.1. Beta-laktamaz Enzimi Aracılı Direnç	27
4.6.1.2. Değiştirilmiş PBP Aracılı Direnç	28
4.6.1.3. Dışa Atım Pompaları	32
4.6.2. Protein Sentez İnhibitörü Antibiyotikler ve Direnç Gelişimi	33
4.6.2.1. Tetrasiklinler ve Direnç Gelişimi	33
4.6.2.2. Kloramfenikol ve Direnç Gelişimi	33
4.6.2.3. Makrolidler ve Direnç Gelişimi	33
4.6.3. Nükleik Asit Sentez İnhibitörü Antibiyotikler ve Direnç Gelişimi	34
4.6.3.1. Kinolonlar ve Direnç Gelişimi	34
4.6.4. Folik Asit Sentez İnhibitörü Antibiyotikler ve Direnç Gelişimi	34
5. GEREÇ ve YÖNTEMLER	36
5.1. İzolatların Toplanması ve Tanımlanması	36
5.2. İzolatların Saklanması, Canlandırılması ve Saf kültür Elde Edilmesi	37
5.3. <i>In vitro</i> Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Uygulanması	37

5.4. Kirby Bauer Disk Difüzyon Yöntemi ile Antibiyotik Duyarlılık Testi ve Beta-laktamaz Enzim Üretiminin Araştırılması	37
5.5. Gradyent Şerit Test Yöntemiyle İmipenem ve Meropenem Duyarlılıklarının Araştırılması	39
5.6. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemiyle İmipenem ve Meropenem Duyarlılıklarının Araştırılması	40
5.6.1. Lize Edilmiş At Kanı Stok Solüsyonunun Hazırlanması	40
5.6.2. Beta-NAD Stok Solüsyonu Hazırlanması	41
5.6.3. Mueller Hinton-Fastidious (MH-F) Sıvı Besiyerinin Hazırlanması	42
5.7. Antibiyotik Ana Stok Solüsyonlarının Hazırlanması	43
5.7.1. İmipenem Ana Stok Solüsyonunun Hazırlanması	43
5.7.2. Meropenem Ana Stok Solüsyonunun Hazırlanması	43
5.8. Bakteri İnokulumunun Hazırlanması	44
5.9. U Tabanlı Mikrodilüsyon Plaklarında Sıvı Mikrodilüsyon Yönteminin Uygulanması İmipenem ve Meropenem için MİK Değerlerinin Tespit Edilmesi	44
5.9.1. Sıvı Mikrodilüsyon Plaklarının Hazırlanması	44
5.9.2. Minimum İnhibitör Konsantrasyon Değerinin Belirlenmesi	45
5.10. Minimum Bakterisidal Konsantrasyon Değerinin Belirlenmesi	46
5.11. Kalite Kontroller	47
5.12. İstatistiksel Analiz	48
6. BULGULAR	49
6.1. İzolatların Genel Özellikleri	49
6.2. Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Sonuçları	50
6.2.1. Disk Difüzyon Yönteminin Sonuçları	50
6.2.2. Gradyent Şerit Test Yönteminin Sonuçları	51
6.2.3. Sıvı Mikrodilüsyon Test Yönteminin Sonuçları	53
7. TARTIŞMA	58
8. SONUÇ ve ÖNERİLER	66
9. KAYNAKLAR	68

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	:	Amerika Birleşik Devletleri
ALA	:	Aminolevulinik asit
<i>acrAB</i>	:	AcrAB dışa atım pompa proteinini kodlayan gen
AcrR	:	Acr atım pompasını represe eden protein
aminoaçil t-RNA	:	Aminoasit taşıyan ribonükleik asit
Arg	:	Arjinin
Asn	:	Asparajin
ATCC :		Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection)
BAL	:	Bronkoalveolar lavaj
BH	:	Büyük hata
<i>Bla</i>	:	Beta-laktamaz geni
BLNAR	:	Beta-laktamaz negatif ampisilin dirençli
BLNAS	:	Beta-laktamaz negatif ampisilin duyarlı
BLPACR	:	Beta-laktamaz negatif amoksisilin klavulonat dirençli
BLPAR	:	Beta-laktamaz pozitif ampisilin dirençli
BOS	:	Beyin omurilik sıvısı
BPA	:	Brezilya Purpurik Ateşi
°C	:	Santigrat derece
<i>Cat</i>	:	Kloramfenikol direncini kodlayan gen
CLSI :		Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (The Clinical and Laboratory Standards Institute)
CO₂	:	Karbondioksit
ÇBH	:	Çok büyük hata
<i>Dfr</i>	:	Trimetoprim direncini kodlayan gen
DHFR	:	Dihidrofolat redüktaz
DHPS	:	Dihidropteroat sentetaz
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
DZP	:	Dış zar proteini
ECDC :		Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (European Center for Disease Prevention and Control)
<i>erm</i>	:	Makrolid direnç geni

ETA	:	Endotrakeal aspirat
EUCAST	:	Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Test Komitesi (European committee on antimicrobial susceptibility testing)
<i>ftsI</i>	:	Penisilin bağlayan protein 3'ü kodlayan gen
g-BLNAR	:	Genetik beta-laktamaz negatif ampisilin dirençli
GSBL	:	Genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz
HbOC	:	<i>H. influenzae</i> tip b oligosakkarit-difteri CRM 197 proteini aşısı
HMW 1-2	:	Yüksek moleküler ağırlıklı 1-2 (High molecular weight 1-2)
Ile	:	İzolösin
KU	:	Kategorik uyum
Kb	:	Kilobaz
KDBD	:	Kinolon direncini belirleyen bölge
KDO	:	2-keto-3-deoksioktonat
KOB/ml	:	Koloni Oluşturan Birim/ mililitre
KOAH	:	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
Kovasc ayracı	:	p- dimetil aminobenzaldehit
KTG	:	Lizin- Treonin-Glisin
Leu	:	Lösün
LOS	:	Lipooligosakkarit
LPS	:	Lipopolisakkarit
MALDI TOF-MS	:	Matriks destekli lazer dezorpsiyon iyonizasyon uçuş süresi kütle spektrometrisi (Matriks Assisted Lazer Desorption Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry)
Met	:	Metiyonin
µg	:	Mikrogram
MH-F	:	Mueller Hinton-Fastidious
MİK	:	Minimum inhibitör konsantrasyon
µl	:	Mikrolitre
ml	:	Mililitre
mm	:	Milimetre
Mm	:	Milimolar
m-RNA	:	Haberci (mesenger) RNA
NAD	:	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADPH	:	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NTHi	:	Tiplendirilemeyen <i>Haemophilus influenzae</i>

PABA	:	Paraamino benzoik asit
PBP	:	Penisilin bağlayan protein
pH	:	Hidrojen potansiyeli
Phe	:	Fenilalanin
PNL	:	Polimorfonükleer lökosit
PRF	:	Poliriboz ribitol fosfat
PRF-D	:	Difteri toksoidine konjuge edilmiş PRF
R	:	Dirençli
Rd	:	Kapsülünü kaybetmiş H. influenzae serotip d izolatı (Rough-d)
RNA	:	Ribonükleik asit
ROB-1	:	ROB-1 beta-laktamaz enzimi
rPBP3	:	PBP3 ilişkili direnç
rRNA	:	Ribozomal ribonükleik asit
S	:	Duyarlı
Sd	:	Kapsüllü H. influenzae serotip d (Smooth-d)
Ser	:	Serin
sn	:	Saniye
SSN	:	Serin-Serin-Asparajin
SOAR	:	Antimikrobiyal Direnç Surveyansı (Survey of antimicrobial resistance)
<i>sul</i>	:	Sulfonamid direnç geni
TBA	:	Teknik belirsizlik alanı
TEM-1	:	TEM-1 beta-laktamaz enzimi
<i>tet</i>	:	Tetrasiklin direnç geni
Thr	:	Treonin
TU	:	Temel uyum
X faktörü	:	Protoporfirin IX
Y faktörü	:	Nikotinamid adenin dinükleotid
YDD	:	Yüksek dozda duyarlı
YDO	:	Yanlış duyarlı oran

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 5.1:	İmipenem ve meropenem için minimum inhibitör konsantrasyon değerlerinin belirlenmesi için hazırlanan sıvı mikrodilüsyon plakları	46
Şekil 5.2:	Çikolata agar besiyerinde iki izolata ait imipenem için minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerlerinin belirlenmesi.....	46
Şekil 5.3:	Mueller Hinton-F agar plağında <i>H.influenzae</i> ATCC 49247 standart suşu ile penisilin ve ampisilin diskleri kullanılarak yapılan iç kalite kontrol.....	47
Şekil 5.4:	Mueller Hinton-F agar plağında <i>H.influenzae</i> ATCC 49766 standart suşu ve 12 antibiyotik diski kullanılarak yapılan iç kalite kontrol	47
Şekil 6.1:	Çikolata agar plağında imipenem heterodirencinin tespiti	55



TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 4.1:	Diğer cinslerde sınıflandırılan eski <i>Haemophilus</i> türleri	9
Tablo 4.2:	İnsanlardan izole edilen <i>Haemophilus</i> ve yakın ilişkili cinslerin filogenisi.....	10
Tablo 4.3:	<i>Haemophilus</i> türlerinin faktör gereksinimleri ve fermentasyon yapma yetenekleri	14
Tablo 4.4:	<i>Haemophilus</i> türlerinin biyokimyasal özellikleri	15
Tablo 4.5:	<i>H. influenzae</i> 'nin antijenik yapıları ve fonksiyonları	16
Tablo 4.6:	<i>H. influenzae</i> ve <i>H. parainfluenzae</i> izolatlarında biyotiplendirme	19
Tablo 4.7:	<i>H. influenzae</i> izolatlarının fenotipik ve genotipik olarak sınıflandırılması.....	31
Tablo 4.8:	BLNAR izolatlarının sınıflandırılması.....	32
Tablo 5.1:	Disk difüzyon yönteminde kullanılan antibiyotikler ve klinik sınır değerleri.....	39
Tablo 5.2:	Gradyent şerit test yönteminde kullanılan antibiyotikler ve klinik sınır değerleri.....	40
Tablo 5.3:	MH-F sıvı besiyerinin hazırlanmasında kullanılan reaktifler	40
Tablo 5.4:	%50 oranında lize edilmiş at kanı stok solüsyonu hazırlama basamakları	41
Tablo 5.5:	Beta-NAD stok solüsyonunun hazırlanma basamakları.....	41
Tablo 5.6:	100 ml MH-F sıvı besiyerini hazırlama basamakları	42
Tablo 6.1:	Hastaların yaş ve cinsiyet dağılımı.....	49
Tablo 6.2:	Klinik örneklerin gönderildikleri poliklinik, klinik ve yoğun bakım sayı ve yüzdeleri	50
Tablo 6.3:	Penisilin disk tarama sonuçları ve beta-laktamaz enzim üretimi	51
Tablo 6.4:	İzolatların fenotip dağılımı	51
Tablo 6.5:	İzolatların disk difüzyon yöntemiyle antibiyotik duyarlılıklarının dağılımı	52
Tablo 6.6:	Gradyent şerit test yöntemiyle izolatların imipenem ve meropenem duyarlılıkları	52
Tablo 6.7:	Gradyent şerit test yöntemiyle imipenem MİK değerlerinin dağılımları.....	53
Tablo 6.8:	Gradyent şerit test yöntemiyle meropenem MİK değerlerinin dağılımları	53
Tablo 6.9:	Sıvı mikrodilüsyon test yöntemiyle imipenem MİK değerlerinin dağılımı	53
Tablo 6.10:	Sıvı mikrodilüsyon test yöntemiyle meropenem MİK değerlerinin dağılımı	54
Tablo 6.11:	İmipenem ve meropenem için disk difüzyon testinin sıvı mikrodilüsyon test ile uyumu	54

Tablo 6.12: Gradyent şerit test ve sıvı mikrodilüsyon testlerinin uyumu	54
Tablo 6.13: Gradyent şerit test ile sıvı mikrodilüsyon testi arasında imipenem için uyumsuzluk gösteren izolatların fenotipik dağılımı.....	55
Tablo 6.14: Disk difüzyon testinde zon içi üremesi olan izolatların sıvı mikrodilüsyon ve gradiyent şerit test ile karşılaştırılması	56
Tablo 6.15: Disk difüzyon ile zon içi üremesi olan izolatların gradiyent şerit test ile MİK değerlerinin dağılımı	56
Tablo 6.16: İmipenem MBK dağılımı	57
Tablo 6.17: Meropenem MBK dağılımı	57



1. ÖZET

***Haemophilus influenzae* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıklarının İncelenmesi**

Amaç: Bu çalışmada Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Eğitim ve Araştırma Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 01.01.2020-01.06.2021 tarihleri arasında gönderilen alt solunum yolu örneklerinin kültürlerinde üreyen 84 adet *H.influenzae* izolatının antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemiyle incelenmiştir. İmipenem ve meropenem duyarlılık sonuçları disk difüzyon ve gradiyent şerit test yöntemiyle de değerlendirilerek referans yöntem olan sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile uyumunun incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Alt solunum yolu örnekleri mikroskopik olarak değerlendirilmiştir. Mikroskopik açıdan uygun olan örneklerin kültürü %5 koyun kanlı agar (KKA), MacConkey agar ve çikolata agar besiyerlerine ekilmiştir. KKA ve MacConkey agar plakları normal atmosferde, çikolata agar plakları CO₂'li ortamda, 37 °C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Bakterinin tanımlaması Gram boyama ve MALDI-TOF MS ile yapılmıştır. İzolatların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. İzolatların beta-laktamaz enzim üretimi kromojenik nitrosefin diski kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İzolatların beta-laktam ilaçlara karşı direnç mekanizmasının varlığı 1 ünite benzilpenisilin içeren penisilin diskiyle taranmıştır. Karbapenem grubu antibiyotiklerin minimum inhibitör konsantrasyonlarının (MİK) belirlenmesinde gradiyent şerit test ve sıvı mikrodilüsyon test yöntemleri kullanılmıştır.

Bulgular: Çalışmamızda izolatların yarısından fazlası 50 yaş ve üzeri hastalardan izole edilmiştir. Çalışmadaki erkek hastalar, tüm hastaların % 70,23'ünü oluşturmuştur. Beta-laktamaz negatif ampisilin duyarlı (BLNAS) izolatlar % 45,23 ile en bulunan fenotip olmuştur. Bunu %39,28 ile Beta-laktamaz negatif ampisilin dirençli (BLNAR), % 10,71 ile Beta-laktamaz pozitif ampisilin dirençli (BLPAR), % 4,76 ile Beta-laktamaz pozitif amoksisilin klavulanik asit dirençli (BLPACR) izolatlar izlemiştir. Çalışmamızda disk difüzyon yöntemi ile imipenem, meropenem ve sefotaksim direnci saptanmamıştır. En yüksek direnç % 54,76 ile ampisilinde görülmüştür. En düşük direnç %13,09 ile kinolon grubu antibiyotiklerde görülmüştür. Direnç oranları; sefuroksim %39,28, amoksisilin/klavulanik asit % 28,57 siprofloksasin, levofloksasin ve moksifloksasin %13,09, tetrasiklin %16,66, trimetoprim/sülfametoksazol % 29.76 olarak saptanmıştır. İmipenem ve meropenem için disk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon duyarlılık sonuçları birbiriyle uyumlu bulunmuştur. Gradiyent

şerit test yöntemiyle sıvı mikrodilüsyon yönteminin meropenem için kategorik uyumu % 100 (n=84), temel uyumu % 70,23 (n=59) iken imipenem için kategorik uyum % 70,23 (n=59), temel uyum % 41,66 (n=35) olarak saptanmıştır. İmipenem için büyük hata oranı % 29,76 (n=25) olarak bulunmuştur. Çalışmada imipenem için test edilen izolatların 17sinde (%20,23) disk difüzyon testinde zon içi üremeler görülmüştür. Gradient şerit testinde bu izolatların 12'sinde (%70,58) heterodirenç göstesi olan çift zon görülmüştür. Onyediyizolatın fenotip dağılımlarına bakıldığında onüç BLNAR, iki BLPAR, bir BLPACR, bir BLNAS izolat bulunmuştur. BLNAR izolatlarında MİK değerleri altı izolatta >32 µg/ml, bir izolatta 12 µg/ml, bir izolatta 8 µg/ml, iki izolatta 2 µg/ml, bir izolatta 0,5 µg/ml, bir izolatta 0,75 µg/ml, bir izolatta 0,094 µg/ml olarak bulunmuştur. İki BLPAR izolatta MİK değeri >32 µg/ml, bir BLPACR izolatta MİK değeri >32 µg/ml ve bir BLNAS izolatta MİK değeri 4 µg/ml olarak bulunmuştur.

Sonuç: Çalışmamızda direncin en yüksek görüldüğü antibiyotik ampisilin olarak belirlenmiş ve rutinde test edilen antibiyotiklere belirli oranlarda direnç tespit edilmiştir. Disk difüzyon testi ile imipenem, meropenem ve sefotaksim direnci saptanmamıştır. BLNAR izolatlar dünya genelinde yaygınlaşmaya başlamıştır ve beta laktam grubu antibiyotiklere direnç gelişimi endişesini arttırmaktadır. Çalışmamızda sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile iki karbapeneme de direnç tespit edilmemekle birlikte, gradiyent şerit testi ile 25 izolat imipeneme dirençli bulunmuştur. Önceki çalışmalarla uyumlu şekilde çalışmamızda sıvı mikrodilüsyon yönteminin *H.influenzae* izolatlarının karbapenem duyarlılığının belirlenmesinde özellikle de imipenem duyarlılığı açısından öneme sahip olduğu tespit edilmiştir. İmipenem ve meropenem için disk difüzyon yönteminin sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle uyumu göz önüne alındığında disk difüzyon yöntemi rutin laboratuvar uygulamaları açısından önemini korumaktadır. Heterodirençli izolatların görülmesi, dirençli izolatların ortaya çıkışı açısından uyarıcı olabilir. *H.influenzae* izolatlarında direnç oranlarının ve mekanizmalarının ortaya konulabilmesi açısından surveyans çalışmalarının yapılması önem taşımaktadır.

Anahtar Kelimeler: *H. influenzae*, imipenem, meropenem, sıvı mikrodilüsyon, gradiyent şerit test

2. ABSTRACT

Evaluation of Antibiotic Susceptibility of *Haemophilus influenzae* Isolates

Objective: In this study, antibiotic susceptibility of 84 *H.influenzae* isolates grown in the cultures of lower respiratory tract samples sent to Ankara University School of Medicine İbn-i Sina Training and Research Hospital Central Microbiology Laboratory between 01.01.2020-01.06.2021 was investigated by disc diffusion method. It was aimed to evaluate the susceptibility results of imipenem and meropenem with disc diffusion and gradient strip test methods and to examine their compatibility with the reference method, the broth microdilution method.

Materials and Methods: Lower respiratory tract samples were evaluated microscopically. Microscopically suitable samples were cultured on 5% sheep blood agar (SBA), MacConkey agar, and chocolate agar media. SBA and MacConkey agar plates were incubated at 37 °C in ambient air, chocolate agar plates were incubated in CO₂ for 24-48 hours. Bacteria were identified by Gram stain and MALDI-TOF MS. Disk diffusion method was used to determine the antibiotic susceptibility of the isolates. Beta-lactamase enzyme production of the isolates was carried out using a chromogenic nitrocefin disc. The presence of the resistance mechanism of isolates against beta-lactam drugs was screened with a penicillin disc containing 1 unit of benzylpenicillin. Gradient strip test and broth microdilution test methods were used to determine the minimum inhibitory concentrations (MIC) of carbapenem group antibiotics.

Results: In our study, more than half of the isolates were isolated from patients aged 50 years and older. Male patients in the study comprised 70.23% of all patients. Beta-lactamase negative ampicillin-susceptible (BLNAS) isolates were the most abundant phenotype with 45.23%. This was followed by beta-lactamase negative ampicillin-resistant (BLNAR) with 39.28%, beta-lactamase positive ampicillin-resistant (BLPAR) with 10.71%, and beta-lactamase positive amoxicillin-clavulanic acid resistant (BLPACR) isolates with 4.76%. In our study, resistance to imipenem, meropenem, and cefotaxime was not detected by the disc diffusion method. The highest resistance was seen in ampicillin with 54.76%. The lowest resistance was seen in quinolone group antibiotics with 13.09%. Resistance rates; cefuroxime 39.28%, amoxicillin/clavulanic acid 28.57%, ciprofloxacin, levofloxacin, and moxifloxacin 13.09%, tetracycline 16.66%, trimethoprim/sulfamethoxazole 29.76%. Disc diffusion and

broth microdilution susceptibility results were found to be compatible with each other for imipenem and meropenem. The categorical agreement of the gradient strip test method and the broth microdilution method for meropenem was 100% (n=84), the essential agreement was 70.23% (n=59), while the categorical agreement for imipenem was 70.23% (n=59), the essential agreement was found to be 41.66% (n=35). The major error rate for imipenem was found to be 29.76%(n=25) In the study, in-zone growths were observed in 17 (20.23%) of the isolates tested for imipenem in the disk diffusion test. In the gradient strip test, a double zone with heteroresistance was observed in 12 of these isolates (70.58%). When the phenotype distributions of 17 isolates were examined, thirteen BLNAR, two BLPAR, one BLPACR, and one BLNAS isolate were found. The MIC values in BLNAR isolates >32 µg/ml in six isolates, 12 µg/ml in one isolate, 8 µg/ml in one isolate, 2 µg/ml in two isolates, 0.5 µg/ml in one isolate, 0.75 µg/ml in one isolate, and 0.094 µg/ml in one isolate. The MIC value was found to be >32 µg/ml in two BLPAR isolates, the MIC value was >32 µg/ml in one BLPACR isolate and 4 µg/ml in one BLNAS isolate.

Conclusion: In our study, the highest antimicrobial resistance was determined as ampicillin and certain rates of resistance were detected to the routinely tested antibiotics. Resistance to imipenem, meropenem, and cefotaxime was not detected by the disc diffusion test. BLNAR isolates have started spreading all over the world, raising concerns about the development of resistance to beta-lactam group antibiotics. In our study, although no resistance was detected in either carbapenem with the broth microdilution method, 25 isolates were found resistant to imipenem by the gradient strip test. Consistent with previous studies, in our study, it was determined that the broth microdilution method is important in determining the carbapenem susceptibility of *H.influenzae* isolates, especially in terms of imipenem susceptibility. Considering the compatibility of the disc diffusion method with the broth microdilution method for imipenem and meropenem, the disc diffusion method maintains its importance in terms of routine laboratory applications. The appearance of heteroresistant isolates may be a warning for the emergence of resistant isolates. It is important to conduct surveillance studies in order to reveal resistance rates and mechanisms in *H.influenzae* isolates.

Keywords: *H. influenzae*, imipenem, meropenem, broth microdilution, gradient strip test

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Haemophilus cinsinin üyeleri kokobasil veya kısa çubuk şeklinde pleomorfik küçük, gram negatif basillerdir. İnsan ve hayvanların mukozal yüzeylerinde kolonize olurlar. Bu cins içinde yer alan *Haemophilus influenzae* sadece insanda hastalık yapar (1). Üst solunum yolu enfeksiyonu, akut otitis media, epiglottit, pnömoni, kronik bronşitin akut alevlenmeleri konjonktivit ve pürülan menenjit, artrit, osteomyelit gibi klinik tablolara neden olabilir (2). *H. influenzae* 'nin kapsül polisakkarit yapısının bileşimine göre altı kapsüllü tipi (a-f) vardır. Kapsülsüz olanlar tiplendirilemeyen *H. influenzae* (NTHi) olarak isimlendirilir (3). *H. influenzae* tip b (Hib) en invaziv olan kapsüler tiptir. Aşılama öncesi dönemde 5 yaş altı çocuklarda meningoensefalitin önemli bir etkeni olmuştur. 1990'ların başlarından itibaren Hib konjuge aşılarının yaygın olarak kullanılmasıyla, bu serotipe bağlı invaziv enfeksiyonlar önemli ölçüde önlenmiştir (4, 5). Hib insidansı azaldıkça diğer kapsüler tiplerin (a, c ve f) ve kapsülsüz izolatların göreceli öneminin artacağı öngörülmüştür (6-8). İlerleyen zamanlarda yapılan çalışmalarda aşının içermediği *H. influenzae* serotiplerinde artış olduğu ortaya konmuştur (9, 10).

H. influenzae ile oluşan enfeksiyonların tedavisinde beta-laktam grubu antibiyotiklerden aminopenisilinler ve sefalosporinler ilk basamak ilaçlar olarak kullanılmıştır. Tedavide aminopenisilinlerin yaygın olarak kullanımıyla bu grup antibiyotiklere karşı değişen oranlarda direnç gelişimi raporlanmıştır (11). *H.influenzae*'de aminopenisilinlere karşı gelişen direncin iki ana mekanizması beta-laktamaz enziminin üretimi ve beta-laktam türü antibiyotiklere karşı azalmış afiniteye neden olan penisilin bağlayan proteinlerin (PBP) değişimidir. Beta laktamaz enzim üretimi, beta-laktamaz pozitif ampisilin dirençli (BLPAR) suşlarda *bla* geninin kodladığı TEM-1 ve ROB-1 beta-laktamazlar aracılığı ile sağlanır. Beta-laktamaz negatif ampisilin dirençli (BLNAR) izolatlar ile beta-laktamaz pozitif amoksisilin klavulonat dirençli (BLPACR) izolatlarda PBP değişimi özellikle PBP3 üzerinden gerçekleşir (12).

TEM-1 beta-laktamaz enzimin aracılık ettiği ampisilin direnci (BLPAR) dünya genelinde yaygındır (13). Ampisilin direnci Avrupa ve Kuzey Amerika'da %8-30, Japonya ve Güney Kore'de %50 civarındadır (14). Genetik olarak tanımlanmış BLNAR klinik izolatlarının Avustralya ve Amerika'da %15-30'unu, Japonya'da ise %50'sini NTHi izolatları oluşturmaktadır (14, 15)

Hib ile aşılama sonrası dönemde bu serotipe bağılı invaziv hastalık sıklığı azalmış ancak özellikle yaşlı popülasyonda NTHi ile gelişen invaziv hastalık sıklığında artış gözlenmiştir. NTHi izolatlarında gelişen beta-laktam direnci başlıca PBP3'teki aminoasit değişimlerinden kaynaklanmaktadır ve karbapenem direnciyle ilişkilidir. Genel olarak karbapenemler, invaziv bakteri enfeksiyonlarının ampirik tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır ancak *H. influenzae* ile gelişen enfeksiyonlarda kullanılacak ilk basamak ilaç değildirler. Eğer karbapenem dirençli *H. influenzae* izolatıyla gelişen invaziv hastalıkta ampirik olarak kullanılırlar ise tedavi başarısızlığına neden olabilirler (16-18).

Bu çalışmada Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Eğitim ve Araştırma Hastanesi Merkez mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen alt solunum yolu örneklerden izole edilen *H. influenzae* izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları EUCAST 2023 önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi (DD) ile incelenmiştir. Karbapenem grubunda yer alan imipenem ve meropenem duyarlılıkları ayrıca gradient şerit test (GŞT) ve referans yöntem olan sıvı mikrodilüsyon (SMD) yöntemiyle de çalışılmış, minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ve minimal bakterisidal konsantrasyon (MBK) değeri belirlenmiştir. Karbapenem grubu antibiyotikler için disk difüzyon, gradient şerit test ve sıvı mikrodilüsyon test yöntemleriyle elde edilen sonuçların birbirleriyle olan uyumu değerlendirilmiştir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Tarihçe

1883 yılında Robert Koch, Mısır'da akut pürülan konjonktiviti olan hastalarla yaptığı bir çalışmada daha sonra *Haemophilus aegyptius* isminin verildiği etkeni tanımlamıştır (19). 1892'de Richard Pfeiffer, influenza pandemisi sırasında *Haemophilus influenzae*'yi tanımlamıştır. İnfluenza vakalarının otopsilerinde, pürülan bronşial sekresyonlarda bir basil bulunduğunu bildirmiştir (20, 21). Bu etken 'Pfeiffer's bacillus' olarak tanımlanmıştır (22). 1920'de bu etkene, Charles-Edward Winslow ve arkadaşları tarafından *Haemophilus* adı verilmiştir. 1933'te influenzanın etkeninin bir virüs olduğu ve *H. influenzae*'nin ikincil enfeksiyon nedeni olduğu bildirilmiştir (23).

1921'de Thjötta ve Avery, kanda bulunan iki büyüme faktörünü tanımlamıştır (24).

1931'de Margaret Pittman *H. influenzae* izolatlarının kapsüllü ve kapsüllü olmayan formlarını izole etmiştir. Beyin omurilik sıvısı (BOS) ve kandan izole ettiği izolatların neredeyse tamamının polisakkarit kapsüllü tip b olduğunu bildirmiştir (25). Sonrasında *H. influenzae*'nin kapsül polisakkarit yapısındaki değişikliklere bağlı olarak altı serotipi belirlenmiştir (6).

1930'larda Fothergill ve Wright invaziv *H. influenzae* tip b hastalığına karşı gelişen spesifik direncin serum antikoruna aracılığıyla oluştuğunu belirtmişlerdir (26). İlerleyen yıllarda virülans faktörü olarak kapsül ve bu kapsüle karşı gelişen antikorun tedavi edici etkinliği anlaşılmıştır (26, 27).

1970'lerin başında Schneerson ve Anderson, *H. influenzae*'nin kapsül yapısında bulunan polisakkarit komponentini saflaştırmışlardır (28, 29). Bu komponent ilerleyen zamanlarda Hib aşılarında kullanılmıştır.

1974'te Peltola, Hib kapsüller polisakkarit aşısıyla yaptığı çalışmada aşının 18 aylıktan küçük çocuklarda koruyucu etki oluşturmadığını, 18 ay ve üzerindeki çocuklarda ise aşılardan sonraki ilk yılda *H. influenzae* tip b ile bakteriyemi vakası görülmediğini bildirmiştir (30). 1985'te *H. influenzae* tip b için üretilen ilk aşılarda poliribozil ribitol fosfat (PRF) içermektedir (31). PRF, polisakkarit yapısındaki kapsülün saflaştırılmasıyla elde

edilmiştir. İlerleyen zamanlarda PRF, küçük çocuklarda immün cevabı arttırmak için çeşitli proteinlerle konjuge edilmiştir. 1987’de Amerika Birleşik Devletleri’nde ruhsatlı ilk Hib konjuge aşısında, difteri toksoidi ile konjuge edilmiş PRF (PRF-D) kullanılmıştır (32). 1988’de toksik olmayan mutant difteri toksin varyantına (Difteri CRM 197 Proteini) konjuge edilen oligosakkarit-CRM (HbOC) olarak da bilinen konjuge aşı ruhsatlandırılmış, 1990’da kullanıma girmiştir. Peltola ve arkadaşlarının, PRF-D ve HbOC’yi karşılaştırdığı çalışmada her iki aşı da etkin ve güvenli olarak değerlendirilmiştir (30). 1989’da ABD’nde *Neisseria meningitidis* dış membran proteinine konjuge edilmiş poliribozil ribitol fosfat (PRF-OM) aşısı ruhsatlandırılarak kullanıma girmiştir. Aşı ilk dozdan itibaren güçlü immün yanıt oluşturmuştur (32). 1993’te ve 2009’da iki farklı firmanın ürettiği, tetanoz toksoidine konjuge edilen PRF aşısı (PRF-T) ruhsat alarak kullanıma girmiştir. Diğer çocukluk çağı aşılarıyla birlikte PRF konjuge aşısını içeren aşılar da ABD’nde kullanım için ruhsatlandırılmıştır (32).

1976’da Kilian’ın, *Haemophilus* cinsi üzerinde yaptığı taksonomik çalışmada, *H. influenza* suşlarının, enzimatik ve biyokimyasal özelliklerine göre biyotiplere ayrılabilceğini göstermiştir (33). İlk etapta beş biyotip tanımlansa da ilerleyen yıllarda sekiz biyotip tanımlanmıştır (34, 35).

1979’da *Pasteurella*, *Actinobacillus* ve *Haemophilus* cinslerini barındıran aile “Pasteurellaceae” olarak sınıflandırılmıştır (36).

1995’te Genomik Araştırmalar Enstitüsü’nde Fleischmann ve arkadaşları tarafından ilk kez serbest yaşayan organizma olarak *H. influenzae* Rd KW20’nin tüm genom dizisi (1830137 baz çifti) çıkartılmıştır (37). Bu suş, orijinalinde kapsüllü *H. influenzae* tip d (Smooth-Sd) olup, kapsül kodlayan genlerini kaybedince Rd (Rough-Rd) formuna dönmüştür. Rd KW20’de hastalık oluşturan NTHi’de yaygın olarak bulunan adezinler yoktur. Bu yüzden *H. influenzae*’nin virulan olmayan laboratuvar suşu olarak tanımlanmıştır (38).

4.2. Taksonomi

Gammaproteobacteria sınıfının Pasteurellales takımının tek ailesi olan *Pasteurellaceae* ailesi patojen veya kommensal gram negatif, kokobasil veya basil görünümünde bir grup bakteriden oluşur (39). Bu bakteriler, öncelikle hayvanlardan izole edilmiştir ancak insanlarda da hastalık oluşturduğu tespit edilmiştir (33, 40).

Pasteurellaceae ailesinde *Actinobacillus*, *Aggregatibacter*, *Avibacterium*, *Basfia*, *Bibersteinia*, *Chelonobacter*, *Gallibacterium*, *Haemophilus*, *Histophilus*, *Lonepinella*, *Manheimia*, *Nicoletella*, *Pasteurella*, *Phocinobacter* ve *Volucrobacter* cinsleri yer almaktadır (40). Bu cinslerden *Actinobacillus*, *Aggregatibacter*, *Haemophilus* ve *Pasteurella* insanda hastalık yapar (41). Moleküler tanımlama yöntemlerinden önce, üç klasik cins olan *Pasteurella*, *Haemophilus* ve *Actinobacillus*'a ait yeni türler fenotipik belirteçler ile belirlenirdi. Moleküler yöntemlerin kullanılmasıyla birlikte *Haemophilus* heterojen bir cins olarak ortaya çıkmıştır (42). *Haemophilus* cinsinin insanda hastalık yapan türleri *H. influenzae*, *H. aegyptius*, *H. ducreyi*, *H. pittmaniae*, *H. parainfluenzae*, *H. haemolyticus*, *H. parahaemolyticus*, *H. paraphrohaemolyticus*'tur. *H. paraphrohaemolyticus* ile yakın ilişkili olan *H. sputorum* yeni bir tür olarak önerilmiştir (43). Önceden *Haemophilus* olarak isimlendirilen altı tür moleküler yöntemlerle araştırmalar sonucunda *Pasteurellaceae* ailesi içinde diğer cinslerde sınıflandırılmıştır (Tablo 4.1) (44).

Tablo 4.1: Diğer cinslerde sınıflandırılan eski *Haemophilus* türleri

Eski sınıflandırma	Yeni sınıflandırma
<i>H. aphrophilus</i> , <i>H. segnis</i> , <i>H. paraphrophilus</i>	<i>Aggregatibacter</i> cinsi
<i>H. avium</i> , <i>H. paragallinarum</i>	<i>Avibacterium</i> cinsi
<i>H. pleuropneumoniae</i>	<i>Actinobacillus</i> cinsi

Sadece hayvanlarda hastalık yaparak konak spesifikliğı gösteren dört *Haemophilus* türü ise *Haemophilus felis* (kedi), *Haemophilus haemoglobinophilus* (köpek), *Haemophilus paracuniculus* (tavşan) ve *Haemophilus parasuis*'tir (domuz) (44).

Haemophilus influenzae ve diğer *Haemophilus* türlerinin uygun taksonomik sınıflamasını yapmak için, 16S *rRNA* dizilemesiyle birlikte *sodA* ve *sodC* (süperoksit dismutaz genleri), *infB* (translasyon başlatma faktörü 2 geni), *hap* (penetrasyon protein geni), *fucK* (fukulokinaz geni), *pgi* (glukoz-6-fosfat izomeraz geni), *adk* (adelinat kinaz geni) ve *recA* (rekombinasyon protein geni) housekeeping genlerinin dizi analizi yapılmıştır (45-47). Buna göre *Haemophilus* cinsi dört kümeye ayrılmıştır (Tablo 4.2) (40).

Haemophilus ducreyi'nin *H. influenzae* ile ilişkili olmadığı, *Haemophilus* türleriyle ise uzaktan ilgili olduğu DNA-DNA hibridizasyon çalışmalarıyla anlaşılmıştır (40, 45, 48).

Tablo 4.2: İnsanlardan izole edilen *Haemophilus* ve yakın ilişkili cinslerin filogenisi

Küme 1	Küme 2	Küme 3	Küme 4
<i>H. influenzae</i>	<i>Aggregatibacter</i> (<i>Haemophilus</i>) <i>aphrophilus</i>	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. parahaemolyticus</i>
<i>H. aegyptius</i>	<i>H. paraprophilus</i>	<i>H. pitmanniae</i>	<i>H. paraphrohaemolyticus</i>
<i>H. haemolyticus</i>	<i>H. segnis</i>		
	<i>Actinobacillus</i> <i>actinomyces committans</i>		

4.3. Mikrobiyolojik Özellikler

Haemophilus cinsinin üyelerinde hücre duvarı yapısı diğer gram negatif basillerin hücre duvar yapısına benzer ancak *Pasteurellaceae* ailesinin diğer üyelerine göre daha az yağ asidi içerir. Lipopolisakkarit (LPS) yapısı da Enterobacterales takımı üyelerinden yapısal olarak farklıdır (49). *Haemophilus* cinsinin hücre duvarı yapısında bulunan 2-keto-3- deoksioktonat (KDO) miktarı Enterobacterales takımı üyelerinde bulunan LPS içeriğinden daha azdır. Bu oran *Salmonella* cinsinde %5-8 iken *Haemophilus influenzae*'de %1'den azdır (49).

Haemophilus cinsi gram negatif, küçük (0.5-2 µm x 0.2-0.3µm) pleomorfik kokobasil veya basil görünümündedir. Klinik materyalin direkt yaymalarında küçük kokobasiller şeklinde görülürken koloniden yapılan yaymalarda uzun filamentlere kadar değişen çubuklar şeklinde görülebilirler. Fakültatif anaerop, hareketsiz ve sporsuzdur. Karbonhidratları fermente ederler. Genellikle oksidaz ve katalaz pozitiflerdir. Nitratları nitritlere indirgerler. İnsan ve hayvanların mukozalarında kolonize olurlar (50, 51).

Haemophilus, "kanı seven" anlamına gelen Yunanca kelimedenden türetilmiştir. *Haemophilus* türleri kanda önceden oluşturulmuş büyüme faktörleri olan X faktörü (hemin sentezinde ara ürün olan protoporfirin IX) veya V faktörüne (nikotinamid adenin dinükleotit - NAD) veya her ikisine birden ihtiyaç duyarlar (48). *Haemophilus* türleri isimlendirilirken kullanılan -para ön eki büyüme için sadece V faktörü gereksinimine işaret eder (50).

4.4. *Haemophilus Influenzae*

Haemophilus cinsinin çoğu üyesi patojen değildir veya fırsatçı enfeksiyon yaparlar. İnsan ve hayvanlarda orofarinks ve nazofarinks mukozasının normal bakteri florası içerisinde yer alırlar (50). *Haemophilus influenzae* ise sadece insanda mukozal yüzeylere kolonize olur ve bu cinsin en önemli insan patojenidir (1, 47). Akut sinüzit, akut otitis media, pnömoni, bronşit, epiglottit, artrit, orbital selülit, pürülan menenjit ve bakteriyemiye neden olabilir (1, 51). Orofarinkste çoğunlukla kapsülsüz *H. influenzae* ve *H. parainfluenzae* izolatları bulunmakla birlikte kapsüllü *H. influenzae* (serotip a-f), *H. haemolyticus* ve *H. parahaemolyticus* izolatları da bulunabilir (48). Balgam örneklerinden izole edilen *H. influenzae* normal solunum yolu florasını yansıtabileceği gibi özellikle kronik solunum yolu hastalığı olanlarda ağır hastalık tablolarının sebebi olabilir (40).

4.4.1. Gram Boyanma Özellikleri ve Mikroskopik Görünüm

H. influenzae, küçük, gram negatif boyanan, kokobasil morfolojisinde bir bakteridir. Hareketsiz ve sporsuzdur. Lökosit dışında ve fagosite edilmiş halde lökosit içinde de görülebilir (48). Klinik örnekten yapılan yaymaların Gram boyasında pürülan sekresyonlarda bakteriyi çevreleyen boya almayan bir halo görüntüsü görülebilir. Bu, *H. influenzae*'nin kapsül yapısıdır. Organizma küçük ve pleomorfiktir ve genellikle soluk pembe boyanır, bu özelliği ile Gram boyamada amorf seröz bir materyal şeklinde görülebilir (52).

4.4.2. Kültürde Üreme Özellikleri ve Koloni Morfolojisi

H. influenzae, fakültatif anaerop, üremek için X ve V faktörlerine ihtiyaç duyan bakteridir. X faktörü, hemin biyosentez yolağında bir ara üründür. Isıya direçlidir (48, 53). V faktörü ise, büyüyen hücrenin oksidasyon-redüksiyon süreçleriyle yakından ilgilidir ve NAD (nikotinamid adenin dinükleotid) ve NADP (nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) olarak bilinen iki dehidrojenazdan biridir ve ısıya duyarlıdır. 120 °C'de 30 dakikada inhibe olur (33, 53). Her iki faktör de eritrositlerde bulunur. *H. influenzae* %5 koyun kanlı agar plaklarında X faktörünü doğrudan kullanabilir ancak V faktörünü, eritrositler parçalanıp besiyerine salınmadığı için kullanamaz. Ayrıca koyun kanı V faktörünü hidrolize eden enzimleri (NADaz) de barındırdığı için bu besiyerinde üreyemez. *H. influenzae*'nin üremesi için standart besiyeri, hem hemin hem de NAD yönünden zengin kaynak olan, ısıyla parçalanmış at kanıyla hazırlanmış bir çikolata agardır. Çikolata agarın hazırlanma aşamasında ısı etkisiyle eritrositler parçalanır böylece V faktörü serbest hale geçer. Bu durumda koyun kanı

kullanılarak hazırlanmış olan geleneksel çikolata agarda da üreyebilir. V faktörünün inhibitörlerini yok etmek için kan ısıtılmalıdır (51). Besiyerinin hazırlanmasında koyun kanı kullanılıyor ise ısı, V faktörü inhibitörlerini de ortadan kaldıracığı için V faktörü bakteri tarafından kullanılabilir hale gelir (48, 50). *H. ducreyi* ve *H. aegyptius* gibi daha zor üreyen türler için çikolata agar besiyerine İsovitaleks (BD, ABD) ve Vitox (Remel, ABD) gibi ticari olarak temin edilebilen besiyeri katkıları eklenebilir. Bu besiyeri katkıları glukoz, sistin, glutamin, adenin, tiamin, vitamin B12, guanin, demir ve aminobenzoik asit içerir (48). *Haemophilus* cinsi için %5 at veya tavşan kanlı agarda hemoliz yapması önemli bir ayırıcı özelliktir. *H. influenzae*, kendisi gibi X ve V faktörlerine gereksinim gösteren *H. haemolyticus*'tan kanlı agar plağında hemoliz yapmaması ile ayrılabilir. Optimal üreme 35-37 °C'de ve %5-10 CO₂'li ortamda 18-24 saatlik inkübasyon ile çikolata agar plağında olur. *H. influenzae* genellikle 0.5-2.0 mm çapında, yuvarlak, düzgün, alçak ve dışbükey koloniler şeklinde görünür. Çikolata agar plağında koloniler nemli görünümde, yarı-saydam, pigmentsiz veya grimsi renktedir. Kapsüllü *H. influenzae* izolatları, NTHi suşlarından daha büyük (1-3 mm) ve daha mukoid ve ten renginde görülür (33, 48).

Çikolata agar dışında Levinthal agar (Himedia, Hindistan) ve Fildes agar (Remel, ABD) da *H. influenzae* ve nazlı üreyen diğer bakterilerin kültürde üretilmesi için kullanılan besiyerleridir. Levinthal besiyeri *H. influenzae*'nin ilk izolasyonunda kullanılan şeffaf ve renksiz bir besiyeridir ve kapsül üretimini göstermekte faydalıdır (25, 33). Koloniye açılı olarak gelen ışık altında bakıldığında kapsüllü izolatlarda gökkuşağı renklerinde yanardöner bir parlaklık gözlenir. Bu yanardöner parlaklık özellikle genç kolonilerde belirgin iken koloni yaşlandıkça azalır. Yanardönerlik *H. influenzae* tip b'de daha belirgin olarak izlenir. Kapsüllü olmayan izolatlar ise bu besiyerinde mavi-yeşil olarak izlenir (48). *H. influenzae*'nin primer izolasyonu için Fildes agar da kullanılır, bu besiyeri enzimatik kan sindirimi yoluyla elde edilen X ve V faktörlerini içerir. Bu besiyerinde, kapsüllü olmayan suşlar nispeten daha küçük, düşük dışbükey, pürüzsüz ve şeffaf koloniler olarak görülür (48, 53).

Solunum yolu örneklerinde besiyerine basitrasın, vankomisin ve/veya klindamisin kombinasyonunun eklenmesi solunum yolu flora elemanlarının aşırı üremesini engelleyerek *Haemophilus* cinsinin seçilerek üremesine katkıda bulunur (54). *H. influenzae* hemin molekülünü; demir içeren solunum enzimleri, sitokrom, sitokrom oksidaz, katalaz ve peroksidazın biyosentezinde kullanır. Hemin, her koşulda büyüme için gereklidir, ancak anaerobik inkübasyonda çok daha azı yeterlidir (33).

H. influenzae kanlı agar plağında hemoliz yapmaz. MacConkey agarda ise üremez. Çikolata agar plağında üreyen *H. influenzae* kolonilerinin kendine özgü ağartıcı benzeri veya amin benzeri diye tarif edilen bir kokusu vardır, bu koku indol üretimine bağlıdır. Çikolata agar plaklarında *H. parainfluenzae* kolonileri *H. influenzae* kolonilerinden daha kuru, orta büyüklükte ya da daha büyük, rengi daha bronzdur. *H. parahaemolyticus* kolonileri *H. parainfluenzae* kolonilerine benzer, bununla birlikte at veya tavşan kanlı agarda beta-hemoliz yapar. *Haemophilus ducreyi*, besiyerinde daha uzun sürede yaklaşık 3-5 günde ürer. Çikolata agarda küçük, düz, pürüzsüz, mukoid olmayan, şeffaf ya da opak kolonileri ten rengi veya sarı renktedir. Koloniler öze yardımıyla dağılmadan itilebilir.(48, 50).

Uydu Fenomeni: Satellitizm, *Haemophilus* cinsindeki bakteri türlerinin V faktör gereksinimini göstermek için kullanılan bir testtir (33). *Haemophilus* türlerinin üremesi %5 koyun kanlı agar plağında hemolizin üreten *Staphylococcus* türlerinin etrafında gözlemlenebilir. Buna “satellit veya süt anne fenomeni” denmektedir. Hemolizin, besiyerinde Stafilokok kolonisinin etrafındaki eritrositlerin parçalanmasına neden olarak *Haemophilus* türlerinin üremesi için yeterli miktarda V faktörünün (NAD) besiyerine salınmasına neden olur. Bu şekilde üreyebilen *H. influenzae* kolonilerinin görünümü çikolata agardakilere göre daha küçüktür. Çikolata agar hazırlanırken kan, besiyerine 70-80 °C sıcaklıkta eklenir ve V faktörünün inhibitörleri de inhibe edilmiş olur. Oysaki kanlı agar plağı hazırlanırken kan besiyerine 45 °C civarında eklendiği için kanda bulunan V faktörü inhibitörleri inhibe olmaz bu da kanlı agarda üreyen kolonilerin daha küçük olarak görülmesine neden olur. (33, 48, 51, 53) *Staphylococcus aureus* dışında *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria* türleri, enterokok, maya gibi organizmalar da satellit fenomenine yol açabilir (40, 48, 50).

4.4.3. Biyokimyasal Özellikler

H. influenzae, δ -aminolevulinik asidi (ALA), X faktörünün biyosentezinde metabolik bir ara madde olan protoporfirine dönüştürmek için gerekli enzimlerden yoksundur, dolayısıyla X faktöre bağımlıdır. X faktörünün ekzojen olarak temin edilmesi gereklidir. Bu ihtiyaç porfirin/ ALA testi ile belirlenir. Porfirin testi, ticari olarak temin edilebilen ALA diskleri veya ALA içeren porfirin sıvı besiyerinde yapılır. Besiyeri cam tüpe 0.5 ml alikotlanır. Tüpe bir öze dolusu bakteri inoküle edildikten sonra, 4 saat 35°C'de inkübe edilir. İnkübasyon sonrası 360 nm dalgaboyunda UV ışığı yayan Wood lambası ile incelenir. Tuğla kırmızısı renk pozitif reaksiyonu gösterir. Alternatif olarak, porfirin sıvı besiyerine 0,5 ml Kovacs reaktifi (p-dimetil aminobenzaldehit) eklenebilir ve tüp çalkalanarak alttaki sıvı fazında

kırmızı renk gözlemlenebilir. ALA içermeyen negatif kontrol tüpü, indol varlığına bağlı yanlış pozitif reaksiyonları ortadan kaldırmak için porfirin testi yapıldığında inoküle edilmelidir (48).

Bütün *Haemophilus influenzae* suşları glukoz ve deoksiriboza fermente ederek asit oluşturur ancak gaz oluşturmaz. Karbonhidratların fermentasyonu sonrası pH 5.3-5.9'a düşer. Ksilozu fermente eder ancak laktoz, sukroz, mannitolü fermente edemez (Tablo 4.3). Katalaz ve oksidaz aktivitesi vardır. Alkalın fosfataz aktivitesi vardır. Hidrojen sülfür (H₂S) üretmez ve esterase aktivitesi yoktur. Nitratları nitritlere indirger (55). Ayrıca alfa-glukozidaz, beta-glukozidaz, beta galaktozidaz, beta-ksilozidaz, beta-glukuronidaz ve alfa fukosidaz aktivitesi de yoktur (Tablo 4.3) (33, 48).

Tablo 4.3: *Haemophilus* türlerinin faktör gereksinimleri ve fermentasyon yapma yetenekleri

<i>Haemophilus</i> türleri	Faktör gereksinimi		Fermentasyon yeteneği				
	X	V	Glukoz	Laktoz	Sükroz	Ksiloz	Mannoz
<i>H. influenzae</i>	+	+	+	-	-	+	-
<i>H.aegyptus</i>	+	+	+	-	-	-	-
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+	-	-	D	-
<i>H. parainfluenzae</i>	-	+	+	-	+	-	+
<i>H ducreyi</i>	+	-	D	-	-	-	-
<i>H parahaemolyticus</i>	-	+	+	-	+	-	-
<i>H. pitmaniae</i>	-	+	+	-	+	-	+
<i>H. sputorum</i>	-	+	+	-	?	-	-

+: Pozitif, -: Negatif, D: Değişken, ?: Bilinmiyor

İndol, üreaz ve ornitin dekarboksilaz üretimi *H. influenzae* ve *H. parainfluenzae* suşlarında biyotiplere göre değişkenlik gösterir (Tablo 4.4) (48). *H. influenzae*'nin DNA'sındaki G+C içeriği %37-45 arasındadır (33, 48).

4.4.4. Hücre Duvarı Yapısı ve Antijenik Yapılar

H. influenzae'nin hücre duvarında, endotoksin aktivitesi olan LPS yapısı bulunur. Dış zarlarda türe özgü ve kökene özgü proteinler bulunur. *H. influenzae*'de üç ana yüzey antijeni mevcuttur. Bunlar, kapsüler polisakkarit antijeni, lipooligosakkarit (LOS) ve DZP'dir (51).

4.4.4.1. Kapsül

Kapsül polisakkarit antijeni, kapsüllü *H. influenzae*'nin başlıca antijenik belirleyicisidir. Kapsüler serotiplendirmeyi ilk olarak 1930'larda Margaret Pitmann kullanmıştır (25). *H. influenzae*'nin kimyasal ve antijenik olarak birbirinden farklı kapsül yapısı bakteriye tip spesifikliği vererek altı antijenik serotipte (a-f) sınıflandırılmasını sağlar (56). Kapsül yapısı bulundurmeyen tiplendirilemeyen *H. influenzae* (NTHi) izolatlarında polisakkarit yapı bulunmaz (48, 56). Tiplendirilemeyen suşların çoğunda, kapsüllü suşlara göre benzersiz dış zar paternleri vardır ve filogenetik olarak farklıdırlar (57). Bu nedenle tip b kapsül ekspresyonunu kaybetmiş gibi görünen *H. influenzae* izolatları tiplendirilemeyen sınıf içerisinde yer almaz. Kapsül ekspresyonu nispeten kararsızdır ve sentezi için gerekli olan genetik materyalin kaybı nedeniyle kapsül ekspresyonu kaybı meydana gelir (56).

Tablo 4.4: *Haemophilus* türlerinin biyokimyasal özellikleri

<i>Haemophilus</i> türleri	Katalaz enzimi	Beta Hemoliz	İndol üretimi	Üreaz enzimi	Ornitin Dekarboksilaz enzimi
<i>H. influenzae</i>	+	-	D	D	D
<i>H. aegyptus</i>	+	-	-	+	-
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	D	+	-
<i>H. parainfluenzae</i>	D	-	D	D	D
<i>H. ducreyi</i>	-	- a	-	-	-
<i>H. parahaemolyticus</i>	D	+	-	+	-
<i>H. pitmaniae</i>	Z	+	?	?	?
<i>H. sputorum</i>	?	+ b	+	+	-

+: Pozitif, -: Negatif, D: Değişken, Z: Zayıf reaksiyon, a: Suşların %11-89'unda görülen geçikmiş hemoliz
b: At ve koyun kanlı agarda beta- hemoliz; bazı suşlar beta-hemoliz yapamaz, ?: Bilinmiyor

4.4.4.2. Lipooligosakkarit (LOS)

H. influenzae'nin LOS yapısı, gram-negatif enterik bakterilerin LPS yapısından çok daha kısa oligosakkarit yan zincirlerine sahip olması bakımından farklılık gösterir (58). *H. influenzae* izolatları arasında da LOS yapısal heterojenite gösterir (56) ve bu özelliğine göre en az 10 serotipi tanımlanmıştır (59). LOS yapısının antijenik heterojenliği, lipid A, kor polisakkarit veya kısa karbonhidrat yan zincirlerindeki farklılıklardan kaynaklanır (59, 60).

4.4.4.3. Dış zar proteinleri (DZP)

H. influenzae, fonksiyonları tanımlanmış ve tanımlanmamış birçok yüzey proteinine sahiptir. Bunlar High Molecular Weight 1(HMW 1), HMW2, P1, P2, P4, P5, P6, Hif A, Hif D, Hif E, Hia (Hsf), IgA proteaz, D15, Lipoprotein D, HxuA, hemopeksin bağlayıcı proteindir. Bunlar içinde majör dış membran proteinleri P1-P6'dır. Hemopeksin, hem molekülüne yüksek afinite ile bağlanan bir glikoproteindir. HxuA ise hemopeksinden hem elde edilmesinin anahtarıdır (Tablo 4.5). Pilus da antijenik çeşitliliğe katkı sağlayan diğer bir antijenik yapıdır (56, 61).

Tablo 4.5: *H. influenzae* 'nin antijenik yapıları ve fonksiyonları

ANTİJEN (Proteinler)	ANTİJEN FONKSİYONU
HMW1, HMW2	Adezin
P1, P4, P6	Bilinmiyor
P2	Membran porini
P5	Adezin
Hif A, D	Pilus subünitesi
Hif E	Pilus adezini
Hia	Adezin
IgA proteaz	Ig A proteaz
D15	Bilinmiyor
Lipoprotein D	Gliserofosfodiester, Fosfodiesteraz
Hemopeksin bağlayıcı protein	Hemopeksin bağlayıcı
HxuA	Hem/hemopeksin bağlayıcı
Pilus	Aderans
Kapsül	Antifagositer özellik
LOS	Membran bütünlüğü

4.4.5. Antijenik Çeşitlilikte Rol Oynayan Moleküler Mekanizmalar

H. influenzae, konağın bağışıklık cevabından kaçmak için yüzey antijenlerini değiştirir. Bunun için farklı mekanizmaları kullanır.

4.4.5.1. Nokta Mutasyonlar

Protein antijenleri kodlayan genlerde spontan gelişen nokta mutasyonlarla protein yapısal değişikliğe uğrar. Örneğin P2 ve P5'teki değişken bölgeyi etkileyen nokta mutasyon ile gelişen değiştirilmiş antijenite buna örnektir (56).

4.4.5.2. Gen Amplifikasyonları

Korunmuş kapsül geni *bexA*'nın saptanması, kapsüllü *H. influenzae* izolatlarını kapsülsüz olanlardan ayırt etmek için kullanılır (62). Hib kapsül genleri tekrarlayan 18 kilobazlık tandem dizilerin olduğu bir kromozomal bölgede yer alır. Kapsül miktarı tekrarlayan bu dizilerin sayısı ile ilişkilidir ve en fazla beş tekrar belirlenmiştir. Tandem tekrarlardan birinin delesyonu *bexA* yokluğuna neden olarak polisakkarit kapsül yapısının ortaya çıkamamasına ve kapsüllü olmayan varyantlara neden olur (56).

4.4.5.3. Faz Versiyonu

Organizmaların değişen çevresel koşullar sırasında yüzey moleküllerinin ifadesini tersine çevrilebilir bir şekilde değiştirdiği bir yöntemdir. *H. influenzae*'nin iki yüzey molekülü, pili ve LOS, faz varyasyonuna uğrar ancak bu antijenlerin faz varyasyonunu uyaran veya kolaylaştıran faktörlerin genetik mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Spesifik antikor varlığında organizmanın hayatta kalmasını arttırmak için alternatif LOS ifadesi veya pilin proteininin hiç ifade edilmemesi şeklinde gelişebilir (56, 63).

4.4.5.4. Yatay Gen Transferi ve Rekombinasyon

Birçok bakteride, yatay gen değişimi, konjugasyon (plazmitlerle) veya transdüksiyonla (fajlarla) olurken *H. influenzae* için bu mekanizmalar nadirdir. Yatay gen transferi *H. influenzae*'de bakteriyel otoliz sonucu organizmanın yakınında bulunan homolog DNA'nın spesifik alımıyla (transformasyon) olur. Çoklu *H. influenzae* suşlarının mukozal

kolonizasyonu da yatay gen transferi için DNA çeşitliliğine, dolayısıyla antijenik çeşitliliğe katkıda bulunur (56, 63).

4.4.6. Serotiplendirme

Kapsüllü *H. influenzae* suşları, yapısal ve serolojik olarak farklı altı polisakkarit kapsülden birinin varlığı ile tiplendirilemeyen suşlardan ayrılır. Serotipler a, b, c, d, e, f olarak isimlendirilir (64). Genenekselle olarak, serotiplendirme altı serotipin her biri için spesifik olan altı antiserumun (a-f) kullanıldığı lam aglütinasyon testi ile yapılır ve günümüzde hala en fazla kullanılan yöntemdir. Ancak yapılan çalışmalarda bu yöntemle serotiplendirme hatalarının olabildiği anlaşılmıştır ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) temelli yöntem tercih edilmektedir (65). Bu yöntem, iki basamaklı bir yöntemdir. İlk basamak kapsül materyalin taşınmasından sorumlu olan *bexA* genini test eder; bu genin varlığı izolatın kapsüllü, yokluğu ise kapsülsüz olduğunu gösterir. İkinci basamakta, altı kapsül tipinden her birinin varlığını belirlemek için PZR testleri yapılır. Bu moleküler yöntem ile kapsüllü ve kapsülsüz suşlar ayırt edilebildiği gibi b tipi suşların spontan oluşan kapsül eksik mutantları (b- suşları) da tanımlanabilir (6).

4.4.7. Biyotiplendirme

H. influenzae heterojen bir fenotip sergiler. 1976'da Kilian triptofanaz (indol üretimi), üreaz ve ornitin dekarboksilazın değişken karakterlerine göre *H. influenzae* suşlarını 5 biyotipe ayırmıştır (33). İlerleyen yıllarda ise yine temel olarak bu özellikler esas alınarak biyotip sayısı sekize kadar çıkmıştır (35, 44, 66, 67). Kilian menenjit, epiglottit ve kan kültürlerinden elde edilen çoğu *H. influenzae* izolatlarının biyotip I'de, konjonktivit vakalarından elde edilen *H. influenzae* izolatlarının biyotip II ve III'te yer aldığını belirtmiştir (33). Farklı coğrafyalarda, farklı popülasyonlarla yapılan çalışmaların verileri biyotip ile patojenite arasındaki ilişkiyi ortaya koymuş ve invaziv hastalığın başlıca biyotip I ve daha az olmak üzere biyotip II suşları ile olduğunu göstermiştir. Menenjit ve septisemi vakalarının çoğunluğu *H. influenzae* biyotip I ve serotip b ile gerçekleşmektedir (33, 66, 68). Bu biyotiplendirme esasları *H. parainfluenzae* izolatları için de geçerlidir (Tablo 4.6) (33, 48, 67).

4.4.8. Patogenez ve Virulans Faktörleri

4.4.8.1. Kolonizasyon

Patogenez bakterinin insan üst solunum yolu mukozasında kolonize olmasıyla başlar. Kolonizasyon sürecinde yeni bir suş bazen direkt olarak semptomatik solunum yolu enfeksiyonuna neden olabilir. Bazen de kolonize olduğu bölgeden direkt yayılım gösterir ve sinüs, orta kulak ve alt solunum yolu enfeksiyonlarına neden olabilir. Direkt yayılımla enfeksiyon, hem kolonize olan bakterinin yoğunluğu hem de biyofilm oluşturabilme durumuyla ilişkilidir.

H. influenzae'nin dış zar yapısı solunum yolu epiteline bağlanmayı kolaylaştıran bazı adhezinleri içerir. Bunlar, pili, fimbriya, yüksek moleküler ağırlıklı faktörler (HMW1-HMW2), Hia'dır.

H. influenzae'nin hücre duvarındaki lipoproteinler solunum yolunun siliyer fonksiyonunu bozar ve lokal enflamasyona neden olur. LOS bu aşamada rol oynar ve kolonizasyona katkıda bulunur (51, 69).

Tablo 4.6: *H. influenzae* ve *H. parainfluenzae* izolatlarında biyotiplendirme

Tür	Biyotip	İndol	Üreaz	Ornitin Dekarboksilaz
<i>H. influenzae</i>	I	+	+	+
	II	+	+	-
	III	-	+	-
	IV	-	+	+
	V	+	-	+
	VI	-	-	+
	VII	+	-	-
	VIII	-	-	-
<i>H. parainfluenzae</i>	I	-	-	+
	II	-	+	+
	III	-	+	-
	IV	+	+	+
	V	-	-	-
	VI	+	-	+
	VII	+	+	-
	VIII	+	-	-

+: pozitif, -: negatif

4.4.8.2. IgA proteaz

Bakteri tarafından salgılanan IgA proteaz, mukozal yüzeylerde bulunan IgA'yı menteşe bölgesinden parçalayarak aglütinasyon, bakteriyel bağlanma ve opsonizasyonun inhibe edilmesinde katkı sağlar (51, 69). *H. influenzae* bu cinsin IgA proteaz üreten tek üyesidir (52).

4.4.8.3. İnvaziv Enfeksiyonlar

İnvaziv enfeksiyonların çoğuna *H. influenzae* tip b neden olur. Bakterinin kapsülündeki PRF içeriği lokal doku, kan dolaşımı bazen merkezi sinir sisteminin istilasını sağlayan güçlü bir virülans faktörüdür. Diğer kapsüller serotiplerdeki glikozilasyon paterni farklıdır ve daha az sıklıkla invaziv hastalık yapar. Tiplendirilemeyen suşlar da daha az invazivdir ancak epitelyal sıkı bağlantılar yoluyla transmural migrasyon veya bağımsız bir hücreler arası mekanizma yoluyla vasküler sisteme erişebilir (69).

Kapsüle karşı oluşan antikorlar bakteriyel fagositozu ve kompleman aracılı bakterisidal aktiviteyi stimüle eder. Bu antikorlar enfeksiyonu geçirmekle, saflaştırılmış PRF ile aşılama veya maternal antikorların pasif transferiyle sağlanır. Menenjit ve epiglottit riski anti-PRP antikorı bulunmayanlarda, kompleman bulunmayanlarda ve splenektomi yapılan hastalarda belirgin şekilde yüksektir. Lipopolisakkaritin Lipid A komponenti hayvan modelinde meninks enflamasyonunu indüklemiştir. İnsanda da bu yanıtın başlamasından sorumlu olabilir. *H. influenzae* tarafından üretilen IgA1 proteaz, mukozal yüzeylerde kolonizasyonu kolaylaştırır (51).

4.4.9. İmmünite ve Aşılar

Mukosiliyer aktivite gibi yapısal savunmalar birinci basamak savunmalardır ve bu fonksiyonun bozulduğu durumlarda alt solunum yolu kolonizasyon ve enfeksiyon oranları yükselir (69).

H. influenzae'nin LOS yapısı alternatif kompleman yolunu aktive ederek C3b opsonizasyonunu ve ardından bakteriyel fagositozu uyarır. Erken kompleman eksikliği olan bireylerde *H. influenzae* enfeksiyonları için artmış risk bulunmaktadır (70). NTHi suşlarına karşı antikor yanıtı tipik olarak güçlü ve bakterisidaldir. Bakterisidal aktiviteye, klasik (antikor aracılı) kompleman yolunun membran atak kompleksi aracılık eder (71). Buna karşılık, tiplendirilebilir suşlar, kompleman aracılı öldürme ve fagositoza karşı daha fazla

direnç sağlayan polisakarit kapsülüne sahiptir. Bu da sistemik enfeksiyon için risk oluşturur (69).

Erken yenidoğan döneminde anneden geçen antikorlar *H.influenzae* tip b için birkaç aylık koruyuculuk sağladıktan sonra hızla azalarak kaybolur. *H. influenzae* tip b suşlarıyla yada çapraz reaktif antikor oluşturan antijenlerle karşılaşılırsa yeniden ortaya çıkarlar. Geçirilen sistemik enfeksiyon sonrası kapsüle karşı oluşan anti-PRF antikorları da ilerleyen dönemde saptanamaz.

H.influenzae için geliştirilen ilk aşılar da saflaştırılmış PRF kullanılmıştır. Çocukluk yaş grubuna uygulandığında iki yaş altı çocuklarda polisakkarit antijen T hücreden bağımsız bir immun yanıtı neden olduğu için aşı koruyuculuk sağlamamıştır. Bunun üzerine PRF molekülü, T hücre bağımlı immun yanıtı uyarması için hapten özelliğindeki çeşitli proteinlerle konjuge edilmiştir. Bu sayede bellek hücrelerinin uyarımı da sağlanmıştır. Piyasaya sürülen konjuge aşılar hastalığı önlediği gibi orofarengeal taşıyıcılığı da azaltmıştır. Tarihsel gelişim içinde difteri toksoidine, *Neisseria meningitidis* dış zar proteinine, tetanoz toksoidine konjuge edilmiş aşılar kullanıma girmiş ayrıca çocukluk yaş grubunda uygulanan diğer aşılarla kombinasyon şeklinde ki formları da kullanılmaya başlanmıştır. PRF'yi hedef alan konjuge aşılar, küçük çocuklarda oldukça etkilidir. Emzirme de *H. influenzae*'ye karşı bir miktar koruma sağlar (32, 40, 51, 69, 72)

4.4.10. Risk Faktörleri

H. influenzae tip b, invaziv hastalık oluşumu açısından majör patojendir. Kapsüllü *H. influenzae* suşlarından tip a, tip b'ye benzer şekilde invaziv enfeksiyon oluşturabilir (73). Kapsülsüz suşlar da invaziv hastalık oluşturabilir ancak daha ziyade otitis media, sinüzit ve konjunktivit gibi mukozal tutulumla ilişkili hastalıklara neden olurlar (74). *H. influenzae* tip b ile invaziv hastalığın gelişimi açısından risk taşıyan başlıca gruplar:

- Aşılanmamış ya da eksik aşıları infant ve çocuklar (primer aşılama serisinde ya da pekiştirme dozlarında eksiklik)
- Anatomik ya da fonksiyonel asplenik kişiler (orak hücreli anemi de dahil)
- İmmünoglobulin eksikliği olanlar ya da humoral immünite ile ilgili başka eksikliği olanlar
- HIV enfeksiyonlu kişiler
- Hematopoetik hücre transplant alıcısı olanlar

- Malignensi için kemoterapi veya radyoterapi alan hastalardır (74).

Çalışmalarda Alaska yerlisi çocuklarla, Avustralya yerlisi Aborjin çocukların da invaziv *H. influenzae* tip b hastalığı için artmış bir risk grubunda olduğu görülmüştür (69). Ayrıca erişkinlerdeki kapsüllü ve kapsülsüz *H. influenzae* suşlarıyla hastalık oluşumunda altta yatan kistik fibrozis, kronik obstrüktif akciğer hastalığı, bronşektazi gibi hastalıklarla, sigara ve alkol kullanımı, gebelik ve ileri yaşta olmanın kolaylaştırıcı bir etkisi de vardır (69). Kalabalık ortamlarda bulunmak, kardeşlerin olması, gündüz bakım evlerine gitmek de *H. influenzae* enfeksiyonu için riski arttırmaktadır (75, 76).

4.4.11. Epidemiyoloji

Haemophilus cinsinin üyeleri hemen hemen tüm insanların solunum sisteminin mukozal yüzeylerinde kolonize olur ve baskın olan tür *H. parainfluenzae*'dir. *H. influenzae*'nin tek rezervuarı insandır. İnsandan insana damlacık enfeksiyonu ya da enfekte veya kolonize bireylerin solunum salgılarının doğrudan temasıyla bulaşır. Bebeklerin yaklaşık yüzde 20'si yaşamın ilk yılında, 5 yaşına gelen çocukların ise yarısından fazlası *H. influenzae* ile kolonize olur (51, 69, 77, 78).

İnvaziv *H. influenzae* temel olarak küçük çocuklarda (2 ay-5 yaş), yaşlı erişkinlerde (65 yaş üstü) ve altta yatan belirli tıbbi durumları olanlarda önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir (79).

1980'lerde ABD'de aşılama öncesi dönemde sağlıklı çocuklardaki *H. influenzae* tip b taşıyıcılığı %3-5 olarak bildirilmiş, gündüz bakım evleri gibi kalabalık ortamlarda bulunan çocuklarda ise bu oranın %50'lere kadar çıktığı gösterilmiştir (80-82). Taşıyıcılık oranı konjuge *H. influenzae* tip b aşılması sonrası okul öncesi çocuklarda %1'in altına düşmüştür (2, 48, 74, 83).

ABD'nin sörveyans verilerine göre 5 yaşından küçük çocuklarda invaziv Hib hastalığı insidansı aşı öncesi dönemde 100.000 çocukta 20 vakanın üstünde iken, 2000 ile 2012 arasında 100.000 çocukta 0.25 vakanın altına düşmüştür (74). 2018'de ise 100.000 çocuk için 0.08 vaka olarak bildirilmiştir (84).

Bununla birlikte aşılama sonrası dönemde invaziv enfeksiyona neden olan *H. influenzae*'nin epidemiyolojik eğilimlerinde değişiklikler gözlenmiştir (79, 85). ABD'de

NTHi, tüm yaş gruplarında invaziv hastalığın en sık nedeni olarak ortaya çıkmıştır. Özellikle 65 yaş üstü yetişkinlerde NTHi ile gelişen *H. influenzae* hastalığında artış bildirilmiştir (86).

2009-2015 yıllarında, ABD’de *H. influenzae*’ye bağlı invaziv hastalık insidansı NTHi, non-b serotipler, serotip b için sırasıyla 100.000 nüfusta 1.22, 0.45 ve 0.03 vaka olarak bildirilmiştir. NTHi’ya bağlı vaka ölüm hızının 65 yaş üstündeki hastalarda %16, non-b serotiplerde %1 ve serotip b için % 4 olduğu raporlanmıştır (79).

Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (ECDC), 2018 yılı raporunda tüm yaş gruplarında vakaların çoğuna kapsülsüz suşlar neden olmuştur. Serotip f, %9 ile gözlemlenen en yaygın kapsüllü serotip olmuştur. 2018 yılında serotipi bilinen vakaların %7’sine serotip b neden olmuştur. Cinsiyete göre katmanlandırıldığında 25-44 yaş arası yetişkinler hariç tüm yaş gruplarında oran erkeklerde daha yüksek olduğu görülmüştür (87).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda *H. influenzae* faringeal taşıyıcılığı Vahapoğlu ve arkadaşlarının 1994’te yayımlanan çalışmalarında 5 yaş altı çocuklar için %77, beş yaş üstü çocuklar için % 59 olarak bildirilmiştir (88). Torun ve arkadaşlarının 2003-2004 arasında yaptıkları çalışmada gündüz bakımevlerine giden 0-71 ay arasındaki çocuklardaki taşıyıcılık oranını % 48,7 olarak belirlemiştir. Hib %7,2, diğer kapsüllü serotipler %7,6 ve NTHi %33,9 olarak tespit edilmiştir (77). Diğer çalışmalarda 5 yaşından büyük çocuklarda taşıyıcılık %3-5,9 olarak bildirilmiştir (89). Aktepe ve arkadaşlarının 2000 yılında kistik fibrosis tanısıyla takip edilen çocuklarla yaptıkları çalışmada, *H. influenzae* %11,4 ile en sık izole edilen etken, NTHi ise %33,3 ile en sık saptanan serotip olmuştur (90). *H. influenzae* izolasyonu, kistik fibrozis hastalığının alevlenme döneminde %24,2, bronşektazisi olanlarda hastalığın alevlenme döneminde %34,7 ve pnömonisi olan hastalarda %19,7 olarak bildirilmiştir (89). Koçak ve arkadaşlarının 2016-2018 tarihlerinde 442 hastadan alınan 245 balgam ve 396 endotrakeal aspirat (ETA) örneği yapılan çalışmalarında *H. influenzae* izolasyonu %6,9 olarak saptanmıştır (91).

4.4.12. Klinik Tablolar

H. influenzae invaziv ve invaziv olmayan klinik tablolarla karşımıza çıkar. İnvaziv *H. influenzae* enfeksiyonları çoğunlukla kapsüler tip b ile ortaya çıksa da özellikle altta yatan hastalığı bulunanlarda NTHi invaziv enfeksiyona neden olabilir (92).

4.4.12.1. Menenjit

Aşılama öncesi dönemde serotip b 1 ay-2 yaş arası çocuklardaki bakteriyel menenjitin en önde gelen nedenlerinden biri iken 6 yaş üzerindeki çocuklarda ise yaygın olarak gözlenmemiştir. Aşılama sonrası dönemde aşısız ya da aşı serisi eksik bebeklerde gelişmiştir. Beyin ve beyin sapı abseleri, subdural effüzyon, perikardit, septik artrit gibi komplikasyonlar nadir olsa da görülebilir. (69, 93, 94)

4.4.12.2. Epiglottit

Epiglottit en sık 2-5 yaş arası çocuklarda görülür. *H. influenzae* tip b ile ilişkilidir. Hırıltılı solunum, salya artışı, solunum sıkıntısı ile akut gelişir. Ateş, odinofaji, disfaji vardır. Bu hastaların kan kültürlerinden *H. influenzae* izole edilebilir. Aşılama ile insidansı oldukça azalsa da tüm seri aşılmasını tamamlamış çocuklarda da gözlenmiştir (95-97).

4.4.12.3. Bakteriemi ve Bakteriyeminin Enfeksiyöz Komplikasyonları

Bakteriemi, *H. influenzae* tip b menenjitinin erken döneminde görülebildiği gibi menenjit olmaksızın da görülebilir. En fazla 6 ay-3 yaş arası bebeklerde görülür. Kan kültürü ile etken izole edilebilir. Altta yatan orak hücreli anemi gibi durumlar ortaya çıkışına yatkınlık oluşturur. Bakteri yumuşak dokulara yayılarak selülite, eklemlere yayılarak septik artrite ve kemik dokuya yayılarak osteoartrite neden olabilir (40).

4.4.12.4. Pnömoni

H.influenzae'ye bağlı pnömoni kış ve ilkbahar aylarında 4 ay-4 yaş arasındaki çocuklarda görülür. Lober pnömoni yapmaya eğiliminde olsa da *S. pneumonia* pnömonisinden daha hafif seyirlidir. Aşılama sonrası dönemde insidansı dramatik olarak azalmıştır. NTHi, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH), immün yetmezlik, diyabet, alkolizm gibi altta yatan hastalığı olan ileri yaş erişkinlerde pnömoninin önemli bir nedenidir (98-100).

4.4.12.5. Perikardit

H. influenzae pnömonisi veya menenjitine sekonder gelişebilen nadir bir durumdur (100).

4.4.12.6. Otitis Media

Bakteriyel akut otitis media vakalarının yaklaşık üçte biri *H.influenzae* ile oluşur. Çocuklarda *Streptococcus pneumoniae*'den sonra orta kulak iltihabının ikinci en yaygın bakteriyel nedenidir. *H. influenzae* ile oluşan otitis media vakalarının %90'ı NTHi suşlar, %10'luk bir kısmı da tip b ile oluşur. NTHi, nazofarenkstekki kolonizasyon sonrası östaki borusu kanalıyla orta kulağa yayılarak enfeksiyona neden olur. Viral bir üst solunum yolu enfeksiyonu otit atağının ortaya çıkışını kolaylaştırır (101).

4.4.12.7. Sinüzit

Viral bir üst solunum yolu enfeksiyonu sonrası nazofarenkste kolonize NTHİ suşlarının komşuluk yoluyla yayılımı sonucu ortaya çıkar. Akut ve kronik sinüzite neden olur (101).

4.4.12.8. Göz Enfeksiyonları

NTHi, çocuklarda konjonktivitinin en yaygın bakteriyel nedenidir. *H. influenzae* sklerit, subkonjonktival abse ve endoftalmite de neden olur (101).

4.4.12.9. Brezilya Purpurik Ateşi (BPA)

Küçük çocuklarda ateş, hızlı başlangıçlı purpura ve hipotansif şok ve pürülan konjonktivit atağından 7-10 gün sonra ölümle karakterize akut bulaşıcı bir hastalıktır. Etken *Haemophilus influenzae* biogroup *aegyptius*'tur (19).

4.4.12.10. Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı Alevlenmeleri

KOAH hastalarının balgam ve bronskopski örneklerinden izole edilen patojenler benzerdir. En sık NTHi, *Streptococcus pneumoniae* ve *Moraxella catarrhalis* izole edilir (102). Kronik bronşiti olan stabil durumdaki hastaların alt solunum yolunda NTHi sıklıkla kolonize halde bulunur ve akut KOAH alevlenmelerine neden olur (103).

4.4.12.11. Ürogenital, Maternal, Perinatal ve Neonatal Enfeksiyonlar

NTHi kadın genital kanalını kolonize ederek obstetrik ve jinekolojik enfeksiyonlara (septik abortus, endometrit, amniyonit veya Bartholin bezi apsesi), üretrit, postpartum bakteriyemi, fetal ölüm ve neonatal sepsise neden olabilir (69, 104-106).

4.4.12.12. Diğer *H. influenzae* Enfeksiyonları

H. influenzae tip b abdominal enfeksiyonlara (pankreatit, peritonit, pelvik abseler, apandisit) hepatobilier sistem enfeksiyonlarına (kolesistit, piyojenik karaciğer absesi) neden olabilir de sık karşılaşılmaz (107-110).

4.5. *H. influenzae* Dışındaki Türlerle Oluşan Enfeksiyonlar

4.5.1. Endokardit

H. parainfluenzae ve *A. aphrophilus* (önceki ismi *H. aphrophilus*) genç ve orta yaştaki hastalardan endokardit etkeni olarak izole edilebilir. *H. influenzae* izolasyonu ise çok daha az orandadır. Oral ve dental lezyonların bulunması, ağız içi cerrahi işlem yapılmış olması, hasarlı kalp kapakları, protez kapak, intravenöz ilaç kullanımı endokardit için risk oluşturur. *H. parainfluenzae* doğal kapaklarda da endokardite neden olabilir. (111).

4.5.2. Şankroid (Yumuşak Şankr)

H. ducreyi'nin neden olduğu cinsel yolla bulaşan bir hastalıktır. Ağrılı genital ve perianal ülserler, hassas inguinal lenfadenit (bubo) oluşumuyla karakterizedir. Genital ülserler insan immün yetmezlik virüsü tip 1'in (HIV-1) bulaşmasında önemli bir kofaktördür (112).

4.6. Tedavide Kullanılan Antibiyotikler ve Direnç Mekanizmaları

Bakterilerin antimikrobiyal ajanlara karşı direnç geliştirebilmeleri bakterilerle oluşan enfeksiyonların tedavisini güçleştirmektedir. Antibakteriyel ajanların kullanımı da dirençli suşların ortaya çıkması için seçici baskı oluşturur (113).

4.6.1. Beta-laktam Sınıfı Antibiyotikler ve Direnç Gelişimi

Penisilin bağlayan proteinler (PBP) bakteri hücre duvarı sentezinin transpeptidasyon basamağında görevli, yapısal olarak beta laktamazlara çok benzeyen transpeptidaz ve karboksipeptidazlardır. Transpeptidasyon basamağı beta-laktam antibiyotiklerin etki alanıdır. PBP'lerin farklı beta-laktam ajanlara karşı afinitesi de farklıdır. Antibakteriyel ajanın birden çok PBP'ye bağlanabilmesi bakterisidal aktiviteye katkıda bulunur. Transpeptidaz enzimi aktif bölgesinde serin aminoasiti bulundurduğu için serin proteaz derivativesi enzimler olarak tanımlanırlar. PBP'ler moleküler ağırlıkları yüksek olandan düşüğe doğru PBP 1,2,3... olarak numaralandırılırlar. Aynı molekül ağırlığında birden çok PBP varsa bu durumda rakamların yanına harf yazılarak (PBP1a, PBP3a, PBP3b) isimlendirilirler. Gram pozitif kok ve gram negatif koklarda 3-4, gram negatif basillerde 10'a kadar PBP bulunur. PBP'ler membran proteinlerinin yaklaşık %1'ini oluştururlar (114).

Genel olarak beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı direnç üç yolla oluşur;

- i) Beta-laktamaz enzimlerinin üretimi ile ilacın inaktive edilmesi
- ii) Beta-laktam antibiyotikler için düşük afinite sergileyen değiştirilmiş PBP'lerin oluşumu
- iii) Gram negatif bakterilerde DZP eksikliği veya azalmış ifadesi ile hücre duvarındaki aktif dışa atım pompalarıdır. DZP kaybı, bazı beta-laktamların periplazmik boşluğa girişini ve dolayısıyla iç zardaki PBP'lere erişimi kısıtlar (12, 114, 115)

H.influenzae'da hücre geçirgenliği ve dışa atım sistemleri tek başına beta-laktamlara karşı direnç mekanizmaları olarak gösterilmemiştir, ancak dışa atım aktivitesinin, esas olarak değiştirilmiş PBP'lere bağlı olarak gelişen direnç seviyesini arttırdığına dair rapor yayınlanmıştır (12, 116)

4.6.1.1. Beta-laktamaz Enzimi Aracılı Direnç

H. influenzae izolatlarında beta-laktamaz enziminin üretimine bağlı antibiyotik inaktivasyonu direnç gelişiminde en yaygın mekanizmadır ve ilk olarak 1970'lerin başında ampisilin direnciyle ortaya çıkmış ve 1975'te beta-laktamaz tipi TEM-1 olarak tanımlanmıştır. 1981 yılında yeni bir beta-laktamaz enzimi tespit edilerek ROB-1 olarak isimlendirilmiştir (12). TEM-1 enzimi *H. influenzae* şuşları arasında ROB-1'e göre daha yaygındır. Her iki enzim de plazmid aracılığı ile yayılır ve beta-laktamaz sınıflandırmasında

sınıf A serin beta-laktamazlar içerisinde yer alır. Her iki enzimin substrat profilleri benzerdir ve ampisilin direncine neden olur. Her iki enzim de beta-laktamaz inhibitörü olan klavulanik asit ile inhibe olur (12, 117, 118).

TEM-1 ve TEM-2 beta-laktamazlar *Enterobacteriaceae* içinde yaygındır ve plazmidler aracılığıyla TEM-1'in *H. influenzae*'ye aktarıldığı düşünülmektedir. Bu enzimler *bla*_{TEM} genleriyle kodlanır. *bla*_{TEM-2} geninin yapısal bölgesindeki tek bir baz çiftindeki farktan dolayı TEM-1'deki 37. aminoasit olan glisin yerine TEM-2'de aynı pozisyonda lizin aminoasidi yer alır. Ancak bu değişiklik iki enzimin substrat profillerinde değişikliğe neden olmaz (12).

H. influenzae'de TEM ile ilişkili iki farklı plazmid grubu vardır. Küçük (<10 kb), konjugatif olmayan plazmidler dirençle ilişkili olarak sadece *bla*_{TEM} genini taşıırken, daha büyük (yaklaşık 40 kb) olan konjugatif plazmidler *bla*_{TEM} geniyle birlikte kloramfenikol, tetrasiklin veya kanamisin gibi farklı antibiyotiklerde direnç neden olan diğer genleri de taşır. Büyük olan plazmidler *H. influenzae* türü içinde daha yaygındır ve *bla*_{TEM} genlerinin yayılımında etkindirler (12).

ROB-1 beta laktamaz ilk olarak 1981 yılında menenjitte neden olan bir Hib izolatı ile gelişen menenjit vakasında tanımlanmıştır. Bu enzim ayrıca insanlarda *Pasteurella multocida* ve *Haemophilus ducreyi* izolatlarında da bulunmuştur (12). *H. influenzae* izolatlarında ROB-1 beta-laktamaz varlığının yüksek sefaklor MİK değerleriyle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte TEM-1 ve ROB-1 enzimlerinin varlığı temel olarak ampisilin direncini ortaya koyar (12, 119).

Bakterilerin beta-laktamaz üretimi inhibisyon, asidimetrik ve kromojenik sefalosporin yöntemleri ile test edilebilir. Yönteme göre farklı indikatörler kullanılır. İnhibisyon yönteminde biyolojik indikatör, asidimetrik yöntemde pH indikatörü kullanılır. Kromojenik sefalosporin yöntemi ise beta-laktamaz enziminin bir sefalosporin olan nitrosefini hidrolize etmesi sonucu sarıdan kırmızıya olan renk değişimi esasına göre kalitatif olarak değerlendirir. Bu enzimi üretmeyen izolatlarda renk değişimi gözlenmez (120, 121).

4.6.1.2. Değiştirilmiş PBP Aracılı Direnç

H. influenzae PBP1a, PBP1b, PBP2, PBP3a, PBP3b, PBP4, PBP5, PBP6 olmak üzere sekiz farklı penisilin bağlayan proteine sahiptir. PBP3, kromozomal *ftsI* geni tarafından kodlanan transpeptidaz aktivitesi olan nispeten büyük bir proteindir. *ftsI* geninde meydana

gelen mutasyonlar PBP3'te değişiklikler oluşturup beta-laktam antibiyotik afinitesinde azalmaya neden olarak BLNAR izolatların görülmesine neden olur (12, 118, 122).

Beta-laktamaz üretmeyen ama ampisiline dirençli bir *H. influenzae* izolat  ilk olarak 1974'te Thornsberry ve Kirven'in bir beta-laktamaz testinin araştırılması sırasında farkedilmiştir (123). 1980'de Markowitz menenjit ve endokardit vakalarından ilk BLNAR izolatları bildirmiştir (124). 1984'te Parr ve Bryan, BLNAR fenotipindeki izolatın genomik DNA'sını kullanarak duyarlı bir *H. influenzae* Rd suşunu (d tipi kapsüllü *H. influenzae*'nin rekombinant çalışmalar için sıkl a kullnılan tranforme edilebilir bir türevidir) BLNAR fenotipine dönüştürerek hem donör hem de dönüştürülen izolatta PBP3a ve PBP3b'nin bağlama afinitesinin azaldığını göstermişlerdir. Böylece PBP3a ve PBP3b'deki değişikliklerin BLNAR fenotipine neden olduğunu ortaya konmuştur (12, 125).

Karbapenemler en geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Hücre duvar sentezini yüksek molekül ağırlıklı PBP'lere bağlanarak inhibe ederler. PBP1a, 1b, 2 ve 4'e bağlanmayı tercih ederler. Daha az olarak PBP3'e bağlanırlar. Bakteriyemi, hastane ilişkili pnömoni, intraabdominal enfeksiyonlar, komplike idrar yolu enfeksiyonları, kemik ve yumuşak doku enfeksiyonları, obstetrik ve jinekolojik enfeksiyonlar dahil pek çok orta ve şiddetli enfeksiyonların tedavisinde kullanılırlar. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) ve Amp C beta-laktamaz üreten *Enterobacteriaceae*  yelerine *P.aeruginosa*, *Acinetobacter* türleri ile *H. influenzae* ve *Neisseriae* türlerine de etkilidir. Metallobeta-laktamaz üreten suşlara etkili değillerdir (114).

Akut otitis media ve toplum kaynaklı solunum yolu enfeksiyonlarının tedavisinde uygunsuz antibiyotik kullanımı BLNAR fenotipinin seçilmesine neden olur (122, 126).

H. influenzae izolatları, beta-laktamaz enzim üretimi, *ftsI* gen mutasyonu ile ampisilin ve amoksisilin klavulanik asit duyarlılığı göz önüne alınarak fenotipik ve genotipik olarak dört grupta sınıflandırılır:

- i) Beta-laktamaz negatif, ampisilin duyarlı (BLNAS): Genotipik olarak *bla* geni bulunmayan ve *ftsI* geninde mutasyon olmayan ampisiline duyarlı izolatlar
- ii) Beta-laktamaz negatif, ampisilin dirençli (BLNAR): Genotipik olarak *bla* geni bulunmayan ve *ftsI* geninde mutasyon nedeniyle aminoasit yer değişimleri bulunduran ampisiline dirençli izolatlar

- iii) Beta-laktamaz pozitif, ampisilin dirençli (BLPAR): Genotipik olarak *bla* geni bulunduran, *ftsI* geninde mutasyon olmayan ampisiline dirençli izolatlar
- iv) Beta-laktamaz pozitif, amoksisilin klavulanik asit dirençli (BLPACR): Genotipik olarak *bla* geni bulunduran ayrıca *ftsI* geninde mutasyon nedeniyle aminoasit yer değişimleri bulunduran amoksisilin klavulanik asite dirençli izolatlar (12, 127, 128).

Ayrıca *bla* geni bulundurmayan, *ftsI* gen mutasyonuna sahip olmakla birlikte ampisilinin duyarlı kaldığı izolatlar da tanımlanmıştır. Bu izolatlar genetik-BLNAR (g-BLNAR) olarak isimlendirilmiştir (17) (Tablo 4.7).

DNA dizi analiziyle BLNAR izolatları *ftsI* genindeki mutasyonlar göz önüne alınarak incelendiğinde farklı aminoasit yer değişimlerine göre dört grup oluşturur:

Grup I izolatlarında korunmuş lizin-treonin-glisin (KTG) motifinin yakınında 517. pozisyonda yer alan arjinin yerine histidin (Arg-517-His) geçmiştir (118, 122).

Grup II izolatlarında korunmuş KTG motifinin yakınındaki 526. pozisyonadaki asparajin yerine lizin (Asn-526-Lys) geçmiştir.

Grup IIa izolatlarında sadece 526. pozisyonadaki asparajin yerine lizin (Asn-526-Lys) geçmiştir.

Grup IIb izolatlarında 526. pozisyonadaki asparajin yerine lizin değişimine ilaveten 502. pozisyonadaki alanin yerine valin (Ala-502-Val) geçmiştir.

Grup IIc izolatlarında 526. pozisyonadaki asparajin yerine lizin değişimine ilaveten 502. pozisyonadaki alanin yerine treonin (Ala-502-Thr) geçmiştir.

Grup IId izolatlarında 526. pozisyonadaki asparajin yerine lizin değişimine ilaveten 449. pozisyonadaki izösin yerine valin (İle-449-Val) geçmiştir.

Grup III izolatlarında KTG motifinde 526. pozisyonadaki asparajin yerine lizin (Asn-526-Lys) değişiminin yanısıra korunmuş serin-serin-asparajin (SSN) motifinin yakınında yer alan aminoasit değişimleri söz konusudur. Bunlardan 385. pozisyonadaki serin yerine treonin (Ser-385-Thr), 357. pozisyonadaki serin yerine asparajin (Ser-357-Asn), 377. pozisyonadaki

metionin yerine izolösün (Met-377-Ile), 389. pozisyondaki lösün yerine fenilalanin (Leu-389-Phe) geçmiştir.(118, 122, 127, 129).

Grup III-benzeri izolatlarda KTG motifinde 517. pozisyondaki arijinin yerine histidin (Arg-517-His) değişiminin yanısıra korunmuş serin-serin-asparajin (SSN) motifinin yakınında yer alan 385. pozisyondaki serin yerine treonin (Ser-385-Thr), 357. pozisyondaki serin yerine asparajin (Ser-357-Asn), 377. pozisyondaki metionin yerine izolösün (Met-377-Ile) ve 389. pozisyondaki lösün yerine fenilalanin (Leu-389-Phe) geçmiştir (129, 130).

Grup I ve Grup II’de yer alan izolatlar düşük düzey ampisilin direnciyle (zayıf rPBP3, zayıf BLNAR) ilişkilidir ve ampisilinin minimum inhibe edici konsantrasyonları (MİK) 0,5-2 mg/L arasında değişir.

Grup III ve Grup III –benzerinde yer alan izolatlar ise yüksek düzey ampisilin direnciyle ilişkili olup MİK değerleri 1-16 mg/L arasında seyreder. Ayrıca bu gruplar üçüncü kuşak sefalosporinlere azalmış duyarlılık veya dirençle ilişkilidir (127, 129, 131) (Tablo 4.8).

Tablo 4.7: *H.influenzae* izolatlarının fenotipik ve genotipik olarak sınıflandırılması

Fenotipik	Genotipik
BLNAS: Beta-laktamaz negatif, ampisilin duyarlı Ampisiline duyarlı izolatlar	<i>bla</i> geni yok <i>ftsI</i> geninde mutasyon yok
BLPAR: Beta-laktamaz pozitif, ampisilin dirençli Ampisiline dirençli izolatlar	<i>bla</i> geni var <i>ftsI</i> geninde mutasyon yok
BLPACR: Beta-laktamaz pozitif, amoksisilin klavulanik asit dirençli Amoksisilin/klavulanik asite dirençli izolatlar	<i>bla</i> geni var <i>ftsI</i> geninde mutasyon var aminoasit yer değişimleri var
BLNAR: Beta-laktamaz negatif, ampisilin dirençli Ampisiline dirençli izolatlar	<i>bla</i> geni yok <i>ftsI</i> geninde mutasyon var aminoasit yer değişimleri var
g-BLNAR: genetik- BLNAR Ampisiline duyarlı izolatlar	<i>bla</i> geni yok <i>ftsI</i> geninde mutasyon var aminoasit yer değişimleri var

Tablo 4.8: BLNAR izolatlarının sınıflandırılması

Grup	İlgili Aminoasit Yer Değişimleri
Grup I	KTG motifi yakınında Arg-517-His
Grup II	KTG motifi yakınında Asn-526-Lys
Grup IIa	Sadece Asn-526-Lys
Grup IIb	Asn-526-Lys + Ala-502-Val
Grup IIc	Asn-526-Lys + Ala-502-Thr
Grup IId	Asn-526-Lys + İle-449-Val
Grup III	KTG motifi yakınında Asn-526-Lys + SSN motifinin yakınında Ser-385-Thr Ser-357-Asn Met-377-Ile Leu-389-Phe
Grup III-benzeri	KTG motifi yakınında Arg-517-His+ SSN motifinin yakınında Ser-385-Thr Ser-357-Asn Met-377-Ile Leu-389-Phe

KTG: lizin-treonin-glisin, SSN: serin-serin-asparajin, Arg: arginin, His: histidin, Asn: asparajin, Lys: lizin, Ala:alanin, Val: valin, Thr: treonin, İle: izölösün, Phe:fenilalanin

4.6.1.3. Dışa Atım Pompaları

Enterobacterales, *acrAB* genleri tarafından kodlanan Acr adlı bir akış pompasına sahiptir (132). Sanchez ve arkadaşları *H. influenzae*'de, *E. coli*'nin *acrAB* gen kümesiyle benzer bir gen kümesi tanımlamış ve bu gen kümesinin etkisizleştirilmesiyle laboratuvar mutantlarının eritromisin, novobiyoisin, etidyum bromür ve kristal viyoleye duyarlı hale geldiği gösterilmiştir. (133). Yapılan bir çalışmada PBP3 değişimi nedeniyle beta-laktamlara azalmış afinite gösteren BLNAR izolatlarında, AcrAB dışa atım pompasının ampisilin MİK değerlerinin artışına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (116).

4.6.2. Protein Sentez İnhibitörü Antibiyotikler ve Direnç Gelişimi

4.6.2.1. Tetrasiklinler ve Direnç Gelişimi

Tetrasiklinler geniş spektrumlu ve bakteriyostatik antibiyotiklerdir. Bakteri hücresinde 70S ribozomun 30 S alt ünitesine geri dönüşümlü olarak bağlanır. Böylece aminoasıl t-RNA'nın mRNA-ribozom kompleksine bağlanmasını engelleyerek protein sentezini durdurur. Tetrasiklin direnç genlerinin (tet) kodladığı proteinler iki mekanizma ile dirence neden olur. Bunlar antibiyotiğin enerji kullanılarak uzaklaştırılması olan dışa atım pompası ve ribozoma bağlanarak aktif bölgenin yapısını değiştiren proteinlerin sentezlenmesiyle sağlanan ribozomal korunmadır (114). *H. influenzae*'de dışa atım için *tet(B)*, *tet(K)*, ribozomal korunma için *tet(M)* genleri tespit edilmiştir (134). Tetrasiklin direnci, genellikle konjugatif plazmitlerle aktarılan *tet(B)* geni tarafından kodlanan bir dışa atım pompasından kaynaklanır (12, 134). Bu plazmidler ayrıca ampisilin, kloramfenikol ve kanamisin direnç genlerini de birlikte taşıyabilmektedir (12). Ayrıca *H. influenzae*'de *acrAB* ile kodlanan işlevsel çoklu ilaç atım pompası da tarif edilmiştir (134). Tetrasiklin direnci *Neisseriae*, *Haemophilus*, *Vibrio* türleri gibi gram negatif bakterilerde sıktır (134).

4.6.2.2. Kloramfenikol ve Direnç Gelişimi

Kloramfenikol, geniş spektrumlu bakteriyostatik etkili bir antibiyotiktir. Bakteri ribozomunun 50S alt ünitesinde peptidil transferaz bölgesine bağlanarak transpeptidasyonu yani peptid zincirinin uzamasını bozar (114). *H. influenzae* izolatlarında kloramfenikol direnci genellikle *cat* geninin kodladığı kloramfenikol asetiltransferaz enziminin üretimiyle ilişkilidir. *cat* geni, konjugatif plazmidler üzerinde taşınır ve kromozoma dahil edilebilir. Bu plazmidler sıklıkla tetrasiklin ve ampisiline karşı direnci kodlayan genleri de taşır. Direnç ayrıca bir dış zar protein kaybıyla gerçekleşen geçirgenlik değişiminden de kaynaklanabilir (12).

4.6.2.3. Makrolidler ve Direnç Gelişimi

Bakteriyostatik etkili antibiyotiklerdir. Bakterinin 50S ribozomunda peptidil transferaz bölgesine yakın bir bölgeye bağlanır. Böylece aminoasıl tRNA'ya bağlı peptid zinciri akseptör (A) bölgesinden peptidil (P) noktasına kayamaz. Translokasyon önlenir, peptid zinciri uzayamaz ve protein sentezi inhibe olur (114). Makrolid direnci esas olarak hedef bölge modifikasyonu, aktif atım pompaları ve nadiren antibiyotik inaktivasyonundan kaynaklanır. Hedef bölge modifikasyonu, 23S rRNA'nın *erm* sınıfı genler tarafından kodlanan

metilazlarla metilasyonu veya 23S rRNA ve ribozomal proteinler L4, L22'nin değişimi sonucu gelişir (135). *E.coli*'de bulunan *acrAB* atım pompasına çok benzeyen bir atım pompası ve diğer atım pompalarının *H.influenzae* vahşi tip suşları üzerinde makrolid etkinliğini kısıtladığı ve makrolid direncinde çok önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Makrolidlere yüksek düzeyde direnç gösteren *H. influenzae* izolatlarında ise *erm* direnç geni saptanamamıştır (12, 135).

4.6.3. Nükleik Asit Sentez İnhibitörü Antibiyotikler ve Direnç Gelişimi

4.6.3.1. Kinolonlar ve Direnç Gelişimi

Kinolonlar bakterisidal etki gösterirler. Tip 2 topoizomeraaz olarak isimlendirilen DNA giraz (Topoizomeraaz II) ve topoizomeraaz IV enzimleri üzerinden DNA replikasyonunu engeller. DNA iplikçikleri birbirinden ayrıldıktan sonra oluşan enzim-DNA kompleksine bağlanarak etki eder. DNA giraz, *gyr A* ve *gyr B*; topoizomeraaz IV ise *Par C* ve *Par E* alt ünitelerinden oluşur (114, 136).

Direnç gelişimi DNA giraz veya topoizomeraaz IV'ü kodlayan genlerin kinolon direncini belirleyen bölgesindeki (KDBB) mutasyonlar yoluyla meydana gelir (12, 137). İlacın artmış dışa atımı ve porin kaybı da kinolon direncindeki artışı destekler (138). Ayrıca direnç gelişimi plazmid aracılığıyla da gerçekleşebilir. Plazmidin kodladığı *qnr* proteinleri kinolon hedeflerini inhibisyonundan korur. ABD, Avrupa ve Doğu Asya'da plazmid aracılı direnç raporlanmıştır. Plazmidin tek başına düşük düzey dirence neden olmakla birlikte, varlığının yüksek düzey direnç mutasyonlarının seçimini kolaylaştırdığı bildirilmiştir (139).

4.6.4. Folik Asit Sentez İnhibitörü Antibiyotikler ve Direnç Gelişimi

Sulfonamidler dihidropteroat sentaz (DHPS) tarafından katalize edilen reaksiyonda paraamino benzoik asit (PABA) ile rekabet ederek dihidropteroik asit oluşumunu inhibe eder. Folik asit sentezini birinci basamakta engeller (114, 140).

Mutasyonlar, PABA'nın aşırı üretimine ya da dihidropteroatta yapısal değişikliğe neden olarak sulfonamidin ilaca afintesinin azalmasına ve dirence neden olabilir (114). Plazmid kaynaklı *sul1* ve *sul2* genlerinin ilaca dirençli dihidropteroat sentetazları kodlanması veya bakteriyel hücre geçirgenliğinin azalmasıyla da direnç gelişebilir (114, 140, 141).

Trimetoprim, dihidrofolik asitin tetrahidrofolik asite dönüşümünde dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe ederek etki eder. Bakteriyostatik etkilidir. Birçok gram pozitif kok ve çoğu gram negatif basile *in vitro* etkilidir. Sulfametoksazol ile kombinasyonu sinerjistik etki gösterir (114, 142).

Trimetoprim direnci de kromozomal ve plazmid aracılı olarak gelişir (114). İntrinsik *dfr* genindeki mutasyonel değişiklikler nedeniyle trimetoprim'e direnç, birkaç patojende rapor edilmiştir. Plazmit aracılı direnç, trimetoprim dirençli dihidrofolat redüktazı kodlayan yaklaşık 20 gen ile (*dfr1*'den itibaren ardışık olarak numaralandırılırlar) ortaya çıkar (141).



5. GEREÇ ve YÖNTEMLER

5.1. İzolatların Toplanması ve Tanımlanması

01.01.2020-01.06.2021 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina Eğitim ve Araştırma Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen alt solunum yolu örneklerinin kültüründe üreyen 84 adet *H. influenzae* izolatı çalışmaya dahil edilmiştir. Aynı hastanın laboratuvara gönderilen örneklerinden sadece ilk örneği çalışmaya dahil edilmiştir. Laboratuvara gelen solunum yolu örnekleri mikroskopi ile (Olympus, Japan) değerlendirilmiştir. Gram boyama sonrası balgam ve endotrakeal aspirat (ETA) örneklerinde yassı epitel ve polimorfonükleer lökositler (PNL) 10X objektifle, bakteri varlığı 100X objektifle incelenerek değerlendirilmiştir. 10X'lik büyütmede her mikroskopi alanında <10 yassı epitel bulunan, polimorfonükleer lökosit sayısı 25'den çok olan balgam ve ETA örnekleri çalışmaya dahil edilmiştir. İmmünsüprese hastalarda inflamatuvar yanıtta yetersizlik olabileceği için <10 yassı epitel, < 25 lökosit sayısı olan örnekler de çalışmaya dahil edilmiştir. BAL örnekleri de hücre ve bakteri varlığı yönünden mikroskopik olarak değerlendirilmiş ancak invaziv girişimle alınan örnek olduğu için mikroskopik değerlendirme kriteri göz önüne alınmaksızın çalışmaya dahil edilmiştir.

Balgam örnekleri koyun kanlı agar (Biomerieux, Fransa), çikolata agar (Biomerieux, Fransa) ve MacConkey agara (Biomerieux, Fransa) tek koloni düşürme tekniğiyle (kalitatif) ekilmiştir. ETA örnekleri koyun kanlı agar ve MacConkey agara 1 µl'lik öze (Fıratmed, Türkiye) ile kantitatif, çikolata agara ise kalitatif olarak ekilmiştir. BAL örnekleri ise önce her üç plağa kalitatif olarak, ekilmiş, serum fizyolojik ile 1/100 oranında sulandırdıktan sonra ise 1 µl'lik öze ile çikolata ve koyun kanlı agar plaklarına kantitatif, MacConkey agar plağına ise kalitatif olarak ekilmiştir. Çikolata agar plakları %5 CO₂'li ortamda (Nüve CO₂ incubator, Türkiye) diğer iki plak ise atmosferik ortamda (Nüve incubator, Türkiye) 37 °C'de 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrasında çikolata agar plaklarında görülen küçük saydam ya da yarısaydam, nemli görünümlü düzgün koloniler şüpheli koloniler Matriks aracılı lazer dezorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometrisi (MALDI TOF-MS) (Vitek MS, BioMerieux, Fransa) ile değerlendirilerek tanımlanmıştır.

5.2. İzolatların Saklanması, Canlandırılması ve Saf kültür Elde Edilmesi

Kültürde üreyen *H.influenzae* izolatlarından saf koloni elde etmek üzere çikolata agar plağına pasaj yapılmıştır. Saf olarak üreyen bakteri kolonileri 10 µl'lik öze yardımıyla alınarak içinde 750 µl yağsız süt bulunan 1.5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplerine (Dur & Plast, Türkiye) aktarılmış ve -20 °C'de (Uğur Derin dondurucu, Türkiye) saklanmıştır. İzolatlar canlandırılacağı zaman derin dondurucudan çıkarılan mikrosantrifüj tüpü oda sıcaklığında eritilmiş ve 15 sn süreyle vortekslenmiştir (VelpScientifica Zx3, italya). 1 µl kalibre plastik öze ile çikolata agar besiyerine (Biomerieux, Fransa) aktarım yapılarak tek koloni düşürme yöntemiyle ekim yapılmıştır. Plaklar 35±1 °Cde %5 CO₂'li ortamda 18-24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda üreyen kolonilerden ikinci kez pasaj yapılmış ve antibiyotik duyarlılık testleri için bu koloniler kullanılmıştır.

5.3. *In vitro* Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Uygulanması

Antibiyotik duyarlılık testleri EUCAST 2023 yönergeleri doğrultusunda, Kirby Bauer disk difüzyon (DD) test yöntemi ile yapılmıştır. İmipenem ve meropenem duyarlılıkları için ayrıca gradiyent şerit test yöntemi ve sıvı mikrodilüsyon test yöntemi uygulanmıştır(143). Disk difüzyon ve gradiyent şerit test yöntemleri ticari olarak temin edilen Mueller Hinton-Fastidious agar (MH-F) plaklarında (Liofilchem, İtalya), sıvı mikrodilüsyon test yöntemi ise katyon ayarlı Mueller Hinton sıvı besiyeri bazına (Conda, İspanya) katkı maddeleri eklenerek hazırlanan MH-F sıvı besiyerinde çalışılmıştır.

5.4. Kirby Bauer Disk Difüzyon Yöntemi ile Antibiyotik Duyarlılık Testi ve Beta-laktamaz Enzim Üretiminin Araştırılması

Disk difüzyon yöntemi için, ticari olarak temin edilen 90 mm çaplı MH-F agar plakları kullanılmıştır. Son kullanma zamanına kadar plaklar, üretici firma önerileri doğrultusunda buzdolabında (Beko, Türkiye) +4 °C sıcaklıkta saklanmıştır. Plaklar oda sıcaklığına getirildikten sonra kullanılmıştır. Çikolata agarda saf kültürü elde edilen *H. influenzae* kolonilerinden birkaçı, içinde 4000 µl serum fizyolojik (Polifleks, Türkiye) bulunan 16x75 mm çaplı tüplere (Laborant, Türkiye) steril pamuklu eküvyon (Microcult, Türkiye) yardımıyla aktarılıp, süspanse edilip 15 saniye vorteksledikten (Velp Scientifica Zx3, İtalya) sonra süspansiyonun yoğunluğu nefelometre cihazı (BD Phoenix Spec Nephelometer, ABD) kullanılarak yaklaşık 1-2x10⁸ Koloni Oluşturan Birim/ml'ye (KOB/ml) denk gelen 0.5 Mc Farland değerine ayarlanmıştır. İnokulum standardize edildikten sonra 15 dakika içerisinde

plaklara ekim yapılmıştır. Ekim yapılırken pamuk uçlu eküvyon, hazırlanan süspansiyona batırılıp fazlası tüp kenarında hafifçe bastırılarak akıtılmış, MH-F agar plağına eküvyonla üç yönde yayılarak ekim yapılmıştır. MH-F agar plağına; benzil penisilin (1 ünite), ampisilin (2 µg), amoksisilin/ klavulanik asit (2/1 µg), sefuroksim (30 µg), sefotaksim (5 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), siprofloksasin (5 µg), levofloksasin (5 µg), moksifloksasin (5 µg), tetrasiklin (30 µg), trimetoprim/sülfametoksazol (1.25/23.75 µg) (Oxoid, İngiltere) diskleri bir penset yardımıyla yerleştirilmiştir. (Tablo 5.1.) Hazırlanan plaklar 18± 2saat süreyle, 36 °Cde, %5 CO₂'li etüvde inkübe edilmiştir. Antibiyotik disklerinin etrafında oluşan dairesel inhibisyon zon çapları yansıtılmış ışıkla aydınlatılmış ortamda ölçülerek EUCAST 2023 klinik sınır değerlerine göre duyarlı (S), dirençli (R) veya orta duyarlı (IM) olarak belirtilmiştir (143, 144).

Disk difüzyon yöntemi uygulanırken benzil penisilinin 1 ünitelik diskiyle beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı direnç mekanizmasının varlığını araştırmaya yönelik tarama yapılmıştır. Benzil penisilin diskinin etrafındaki inhibisyon zon çapının ≥ 12 mm olması durumunda beta-laktam grubu antibiyotikler için direnç mekanizmasının olmadığı, inhibisyon zon çapının <12 mm olması durumunda ise beta-laktam direncine ait bir mekanizmanın olduğu anlaşılmıştır. Bu mekanizma ya beta-laktamaz üretimi ya da PBP3 değişimi ya da bu iki mekanizmanın birlikteliğidir (143). Bu aşamada beta-laktamaz üretimini araştırmak üzere saf *H. influenzae* kültüründeki kolonilerden öze yardımıyla bir miktar alınarak bir damla steril su ile ıslatılmış nitrosefin diski (Oxoid, İngiltere) üzerine sürülmüş, disk üzerinde 15 saniye-5 dakika arasında ortaya çıkan renk değişikliği (sarıdan kırmızıya) beta-laktamaz üretimi açısından pozitif, renk değişiminin olmaması ise negatif olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 5.1: Disk difüzyon yönteminde kullanılan antibiyotikler ve klinik sınır değerleri

Antibiyotik sınıfı	Antibiyotik adı	Disk içeriği	S ≥	R <	TBA
Beta-laktam	Benzil penisilin *	1Ü	12	12	
	Ampisilin	2µg	18	18	
	Amoksisilin klavulanik asit (iv)	2/1 µg	15	15	
	Amoksisilin klavulanik asit (oral)	2/1 µg	50	15	
	Sefuroksim (iv)	30 µg	27	25	25-27**
	Sefuroksim (oral)	30 µg	50	27	25-27**
	Sefotaksim	5 µg	27	27	25-27**
	İmipenem	10 µg	20	20	6-19**
	Meropenem	10 µg	20	20	
Kinolon	Siprofloksasin	5 µg	30	30	
	Levofloksasin	5 µg	30	30	
	Moksifloksasin	5 µg	28	28	
Tetrasiklin	Tetrasiklin	30 µg	25	25	
Antimetabolit	Trimetoprim/sülfametoksazol	1.25/23.75 µg	23	20	

TBA: Teknik belirsizlik alanı, *: Sadece tarama için, iv: intravenöz, **: Teknik belirsizlik alanı sadece penisilin tarama 1Ü ile pozitifse (<12mm) geçerlidir

5.5. Gradyent Şerit Test Yöntemiyle İmipenem ve Meropenem Duyarlılıklarının Araştırılması

-20 °C’de saklanmış ve sonrasında çikolata agarda saf kültürü elde edilmiş olan *H. influenzae* kolonilerinden birkaçı, içinde 4000 µl serum fizyolojik bulunan 16x75 mm çaplı tüplere steril pamuklu eküvyon yardımıyla aktarılıp, süspanse edilmiş, 15 saniye vortekslelendikten sonra süspansiyonun yoğunluğu nefelometre cihazı kullanılarak yaklaşık 1-2x10⁸ KOB/ml’ye denk gelen 0.5 Mc Farland değerine ayarlanmıştır. İnokulum standardize edildikten sonra 15 dakika içinde plaklara ekim yapılmıştır. Ekim yapılırken pamuk uçlu eküvyon hazırlanan süspansiyona batırılıp, fazlası tüp kenarında hafifçe bastırılarak akıtılmıştır. MH-F agar plağına eküvyonla üç yönde yayılarak yoğun olarak ekim yapılmıştır. İmipenem ve meropenemin çeşitli konsantrasyonlarını içeren ticari antibiyotik şeritleri (Biomerioux, Fransa) MH-F plağına birbirine paralel ve ters yönlerde olacak şekilde bir penset yardımıyla yerleştirilmiştir. Hazırlanan plaklar 18± 2saat süreyle, 36 °C’de, %5 CO₂’li etüvde (Nüve CO₂ incubator-EC160, Türkiye) inkübe edilmiştir. Yansıtılmış ışıkla

aydınlatılmış ortamda antibiyotik şeritlerinin etrafında elips şeklinde oluşan inhibisyon zonunun antibiyotik şeridini kestiği alt noktadaki değer minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri olarak belirlenmiştir. EUCAST 2023'te belirtilen klinik sınır değerlerine göre MİK değerleri duyarlı (S) ya da dirençli (R) şeklinde belirlenmiştir (Tablo 5.2) (143).

Tablo 5.2: Gradyent şerit test yönteminde kullanılan antibiyotikler ve klinik sınır değerleri

		MİK eşikdeğeri (µg/ml)	
Antibiyotik sınıfı	Antibiyotik adı	≤ S	> R
Karbapenem	İmipenem	2	2
	Meropenem	2	2

5.6. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemiyle İmipenem ve Meropenem Duyarlılıklarının Araştırılması

Bu yöntem Mueller-Hinton-Fastidious (MH-F) sıvı besiyeri içeren mikrodilüsyon plaklarında çalışılmıştır. MH-F sıvı besiyeri üretici firma talimatları ve EUCAST 2023 önerileri doğrultusunda hazırlanmıştır (145). Besiyeri, ticari olarak temin edilen ve mekanik olarak defibrine edilmiş at kanının (Pendik Veterinerlik Enstitüsü, Türkiye) %50 oranında sulandırılıp lize edildikten sonra beta-NAD (Sigma, ABD) solüsyonu ile birlikte katyon ayarlı Mueller Hinton sıvı besiyerine (Conda, İspanya) ilavesiyle hazırlanmıştır (Tablo 5.3).

Tablo 5.3: MH-F sıvı besiyerinin hazırlanmasında kullanılan reaktifler

Reaktifler
1- Ticari olarak temin edilmiş katyon ayarlı MH sıvıbesiyeri tozu
2- %50 oranında lize edilmiş at kanı
3- %98 saflıkta beta-nikotinamid adenin dinüklotid

5.6.1. Lize Edilmiş At Kanı Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Ticari olarak temin edilmiş ve mekanik yöntemlerle defibrine edilmiş 7 ml at kanı 7 ml deiyonize su ile aseptik koşullarda 15 ml'lik vida kapaklı santrifüj tüpüne (Microcult, Türkiye) alınmıştır. Bu şekilde, %50 oranında seyreltilmiş at kanı elde edilmiştir. Kan, -20 °C'de bir gece bekletildikten sonra oda sıcaklığında çözündürülmüştür. Bu döngü hücrelerin

tamamen lize olması için üç kez tekrarlanmıştır. Lize edilmiş at kanını berraklaştırmak için tüpler 4100 rpm’de 30 dakika santrifüj (Nüve NF 1200R, Türkiye) edilmiştir. Berraklığı arttırmak için bu işlem üç kez tekrarlanmıştır. Üstteki süpernatant 15 ml’lik yeni bir vida kapaklı tüpe pipetle aktarılmış alttaki pellet atılmıştır. Stok at kanı solüsyonu -20 °C’de saklanmıştır. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi için çözödürölen solüsyondan artan kısım tekrar dondurulmamış ve kullanılmamıştır (145). Tablo 5.4’te Stok at kanı solüsyonu hazırlama basamakları belirtilmiştir.

Tablo 5.4: %50 oranında lize edilmiş at kanı stok solüsyonu hazırlama basamakları

1- Aseptik olarak 7 ml defibrine edilmiş at kanı ve 7 ml deiyonize su 15 ml’lik santrifüj tüpüne koyulmuştur.
2- Tüp -20 °C’de bir gece bekletilip oda sıcaklığında çözödürölmüştür. İşlem üç kez tekrarlanmıştır.
3- Tüp 4100 rpm’de 30 dakika santrifüj edilmiştir. İşlem üç kez tekrarlanmıştır.
4- Süpernatant yeni bir tüpe stok solüsyon olarak koyularak -20 °C’de saklanmıştır.

5.6.2. Beta-NAD Stok Solüsyonu Hazırlanması

Beta-NAD steril deiyonize su içinde konsantrasyonu 20 mg/ml olacak şekilde ayarlanmıştır. Bunun için 15 mililitrelik vida kapaklı santrifüj tüpüne 100 µl deiyonize su koyulmuştur. Hassas terazi (Sartorius, Almanya) ile tartılan 20 mg beta-NAD tozu önce 100 µl deiyonize su içinde vortekslenerek çözödürölmüş sonra 900 µl su ile hacim bir ml’ye tamamlanmıştır. Hazırlanan solüsyon 2 ml’lik enjektöre (Ayset,Türkiye) çekilmiştir. Enjektörün ucuna takılan 0.2 mikrometre por çaplı enjektör uyumlu membran filtreden (Minisart 16534, Almanya) süzölerek solüsyon sterilize edilmiştir. Stok solüsyon 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine 100 µl alikotlanarak -20 °C’de saklanmıştır. Stok solüsyon, besiyerine ekleneceği zaman çözödürölerek kullanılmıştır. (145). Tablo 5.5’te Beta-NAD stok solüsyonunun hazırlanma basamakları belirtilmiştir.

Tablo 5.5: Beta-NAD stok solüsyonunun hazırlanma basamakları

1- 20 mg beta-NAD tozu hassas terazi ile ölçölerek 1 ml steril deiyonize suda çözödürölmüştür
2- Solüsyon 0.2 mikrometre por çaplı enjektör uyumlu membran filtreden süzölerek sterilize edilmiştir
3- Solüsyon mikrosantrifüj tüplerine 100 µl alikotlanarak -20 °C de stoklanmıştır

5.6.3. Mueller Hinton-Fastidious (MH-F) Sıvı Besiyerinin Hazırlanması

Ticari olarak temin edilen katyon ayarlı MH sıvı besiyeri tozu (Conda, İspanya), üretici firma talimatlarına göre hazırlanmıştır. 1000 ml besiyeri hazırlamak için için 21 gr katyon ayarlı MH sıvı besiyeri tozu gerekmektedir. 100 ml besiyeri hazırlamak için 2.1 gr besiyeri tozu tartılarak (Sartorius, Almanya) kullanılmıştır. EUCAST 2023 yönergeleri doğrultusunda besiyeri içine daha sonra lize edilmiş at kanı da koyulacağı için bu aşamada üretici talimatından farklı olarak 100 ml besiyeri hazırlamak için 10 ml daha az deiyonize su kullanılmış ve besiyeri 90 ml deiyonize su ile hazırlanmıştır. Balon joje içinde hazırlanan besiyeri otoklavda (Nüve steam art 706 10, Türkiye), 121 °C'de 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir. Sterilizasyondan sonra balon joje 45 °C sıcaklığa gelene kadar su banyosunda (Dedeoğlu, Türkiye) soğumaya bırakılmıştır. Bu sıcaklığa gelen besiyeri içine aseptik olarak hazırlanan %50 oranında lize edilmiş stok at kanı solüsyonundan 10 ml ve beta- NAD stok solüsyonundan 100 µl eklenerek iyice karıştırılmıştır. MH-F sıvı besiyeri, antimikrobiyal duyarlılık testi çalışılana kadar buzdolabında (Beko, Türkiye) +4 °C sıcaklıkta 100 ml'lik steril vida kapaklı kapta (FıratMed, Türkiye) saklanmıştır (145). Tablo 5.6'ta MH-F sıvı besiyerini hazırlama basamakları belirtilmiştir.

Tablo 5.6: 100 ml MH-F sıvı besiyerini hazırlama basamakları

1- 90 ml deiyonize su içinde 2.1 gr katyon ayarlı MH sıvı besiyeri tozu çözdürülmüştür
2- 121 °C sıcaklıkta 15 dakika süreyle sterilize edilmiştir
3- Su banyosunda besiyeri sıcaklığı 45 °C olunca 10 ml %50 lize stok at kanı solüsyonu ve 100 µl beta-NAD stok solüsyonundan eklenerek iyice karıştırılmıştır
4- Hazırlanan besiyeri 100 ml'lik vida kapaklı kaba koyularak +4 °C sıcaklıkta saklanmıştır

5.7. Antibiyotik Ana Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

Antibiyotik çözeltisi hazırlamak için tablodaki formül kullanılmıştır:

$$\text{Hacim (ml)} = \frac{\text{ağırlık (mg)} \times \text{potens değeri (}\mu\text{g /mg)}}{\text{konsantrasyon (}\mu\text{g/ml)} (= \text{mg/L})}$$

Hacim	:	stok solüsyonunun istenen hacmi
Ağırlık:	:	antibiyotik tozunun ağırlığı
Potens değeri	:	tozun üretici firma tarafından belirlenmiş aktivite ya da potensi
Konsantrasyon	:	stok solüsyonunun istenen konsantrasyonu

5.7.1. İmipenem Ana Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Ana stok solüsyonu 5 mg imipenem tozu (EP, Fransa) ile hazırlanmıştır. İmipenemin konsantrasyonu kalite kontrol suşunun referans aralığına göre 1280 µg/ml olarak belirlenmiştir. İlacın potensi 1'dir. Bu değerler doğrultusunda formüle göre hesaplanan hacim 0,0039 L (= 3,9 ml) olmuştur.

İmipenemin çözündürülmesi için fosfat tamponu kullanılmıştır (146). Ticari olarak temin edilmiş fosfat tamponu (Sigma, ABD) üretici firma talimatları doğrultusunda hazırlanmıştır. Buna göre balon joje içerisine 200 ml steril deiyonize su ve bir adet fosfat tampon tableti koyularak tamamen çözünene kadar elde karıştırılmıştır. Hassas teraziyle 5 mg imipenem tozu 15 ml'lik santrifüj tüpüne koyularak önce birkaç damla fosfat tamponunda çözündürülmüş daha sonra yine fosfat tamponu ile hacim 3.9 ml'ye tamamlanarak iyice karıştırılmıştır. İmipenem için hazırlanan ana stok solüsyonu 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine 100 µl alikotlanarak -20 °C'de saklanmıştır. Sıvı mikrodilüsyon plakları hazırlanacağı zaman alikotlanmış antibiyotik ana stok solüsyonlarından biri oda sıcaklığında çözündürülmüştür.

5.7.2. Meropenem Ana Stok Solüsyonunun Hazırlanması

Ana stok solüsyonu 5 mg meropenem tozu (Sigma, ABD) ile hazırlanmıştır. Meropenemin konsantrasyonu kalite kontrol suşunun referans aralığına göre 1280 µg/ml olarak belirlenmiştir. İlacın potensi 1'dir. Bu değerler doğrultusunda formüle göre hesaplanan hacim 0,0039 L (=3,9 ml) olmuştur.

Meropenemin çözdrlmesi için deiyonize su kullanılmıştır (146). Hassas teraziyle 5 mg meropenem tozu 15 ml'lik santrifüj tüpüne koyularak önce birkaç damla deiyonize su ile çözüldürülmüş daha sonra yine deiyonize su ile hacim 3.9 ml'ye tamamlanarak iyice karıştırılmıştır. İmipenem için hazırlanan ana stok solüsyonu 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine 100 µl alikotlanarak -20 °C'de saklanmıştır. Sıvı mikrodilüsyon plakları hazırlanacağı zaman alikotlanmış antibiyotik ana stok solüsyonlarından biri oda sıcaklığında zdrlmştir.

5.8. Bakteri İnokulumunun Hazırlanması

Direkt koloni süspansiyonu yöntemi ile hazırlanan bakteri inokulumunun nihai yoğunluğu, mikrodilüsyon plağındaki her bir kuyucukta 5×10^5 KOB/ml olacak şekilde ayarlanmıştır.

Çikolata agar plağında saf olarak remiş *H.influenzae* kolonilerinden ze ile birkaç koloni alınarak, içinde 4000 µl serum fizyolojik bulunan 16x75 mm'lik steril tp içersinde süspanse edilip, 15 saniye vortekslendikten sonra süspansiyonun yoğunluğu nefelometre cihazı kullanılarak yaklaşık olarak $1-2 \times 10^8$ KOB/ml'ye denk gelen 0.5 Mc Farland değerine ayarlanmıştır. Bakteri inokulumunu 1/100 oranında sulandırmak için başka bir tüpe 1980 µl serum fizyolojik koyulmuştur. Bunun zerine 0.5 Mc Farland'a ayarlanmış tüpten pipetle (Socorex accura, İsveç) 20 µl bakteri inokulumu alınarak eklenmişir. Böylece bakteri inoklmun mikrodilüsyon plaklarına koymadan önceki yoğunluğu 1×10^6 KOB/ml'ye ayarlanmıştır.

5.9. U Tabanlı Mikrodilüsyon Plaklarında Sıvı Mikrodilüsyon Yönteminin Uygulanması İmipenem ve Meropenem için MİK Değerlerinin Tespit Edilmesi

5.9.1. Sıvı Mikrodilüsyon Plaklarının Hazırlanması

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi (SMD) 96 kuyucuklu U tabanlı plaklarda (LP İtaliana, İtalya) alışılmıştır. Mikrodilüsyon plakları testin çalışılacağı gün hazırlanmıştır. Bunun için herbir kuyucuğa önce pipetle 50 µl MH-F sıvı besiyeri koyulmuştur.

Sıvı mikrodilüsyon çalışılacak imipenem ve meropenemin konsantrasyonları *H.influenzae* ATCC 49766 suşuna (Microbiologics, ABD) göre belirlenmiştir. Buna göre imipenemin başlangıç konsantrasyonu 64 µg/ml, meropenemin başlangıç konsantrasyonu ise 32 µg/ml olarak belirlenmiştir.

Bu konsantrasyonlara ulaşabilmek için 1280 µg/ml konsantrasyondaki 100 µl imipenem ana stok solüsyonuna 400 µl deiyonize su eklenerek 5 kat sulandırılmış ve konsantrasyon 256 µg/ml olmuştur.

1280 µg/ml konsantrasyondaki 100 µl meropenem ana stok solüsyonuna ise 900 µl deiyonize su eklenerek 10 kat sulandırılmış ve konsantrasyon 128 µg/ml olmuştur.

Bu ayarlama yapıldıktan sonra her kuyucukta 50 µl MH-F besiyeri bulunan mikrodilüsyon plağın her sırasının sadece ilk kuyucuğuna antibiyotik solüsyonundan 50 µl eklenmiştir. Böylece antibiyotiğin başlangıç konsantrasyonu imipenem için 128 µg/ml, meropenem için 64 µg/ml olmuştur. Pipetle içinde toplamda 100 µl besiyeri ve antibiyotik karışımı olan ilk kuyucuktan birkaç sefer al-ver yaptıktan sonra 50 µl aynı sıradaki ikinci kuyucuğa aktarılmıştır. Yine birkaç sefer al-ver işlemi yaptıktan sonra 50 µl üçüncü kuyucuğa aktarılmıştır. Bu işlem son kuyucuğa kadar devam ettirilmiştir. Son kuyucuktan alınan 50 µl karışım ise dışarı atılmıştır. Böylece antibiyotiğin ikişer kat azalan konsantrasyonları sağlanmıştır. Bu işlem imipenem ve meropenem için ayrı plaklarda gerçekleştirilmiştir.

Son aşamada aynı sıranın tüm kuyucuklarına 1×10^6 KOB/ml yoğunluğuna ayarlanmış bakteri inokulumundan 50 µl eklenmiştir. Bu işlem sonucunda bakteri inokulumunun nihai yoğunluğu 5×10^5 KOB/ml, antibiyotik konsantrasyonu ise ilk kuyucukta imipenem için 64 µg/ml, meropenem için 32 µg/ml olmuştur. Böylece hem standart suşu hem de klinik izolatları değerlendirmek amacıyla, imipenem için 64-0.03 µg/ml, meropenem için 32-0.015 µg/ml aralığında uygun antibiyotik konsantrasyonları ayarlanmıştır.

Kalite kontrol için her mikrodilüsyon plağının ilk sırasında *H.influenzae* ATCC 49766 suşu kullanılarak testin referans sınırlar içerisinde çalışıldığı gösterilmiştir. Her mikrodilüsyon plağının son sırasında tüm kuyucuklara MH-F besiyeri konulmuş ve yine bu sıranın sadece son altı kuyucuğuna *H.influenzae* ATCC 49766 suşu eklenmiştir. Böylece bu sıranın ilk altı kuyucuğunda besiyeri sterilite kontrolü, son altı kuyucuğunda bakteri üreme kontrolü yapılmıştır.

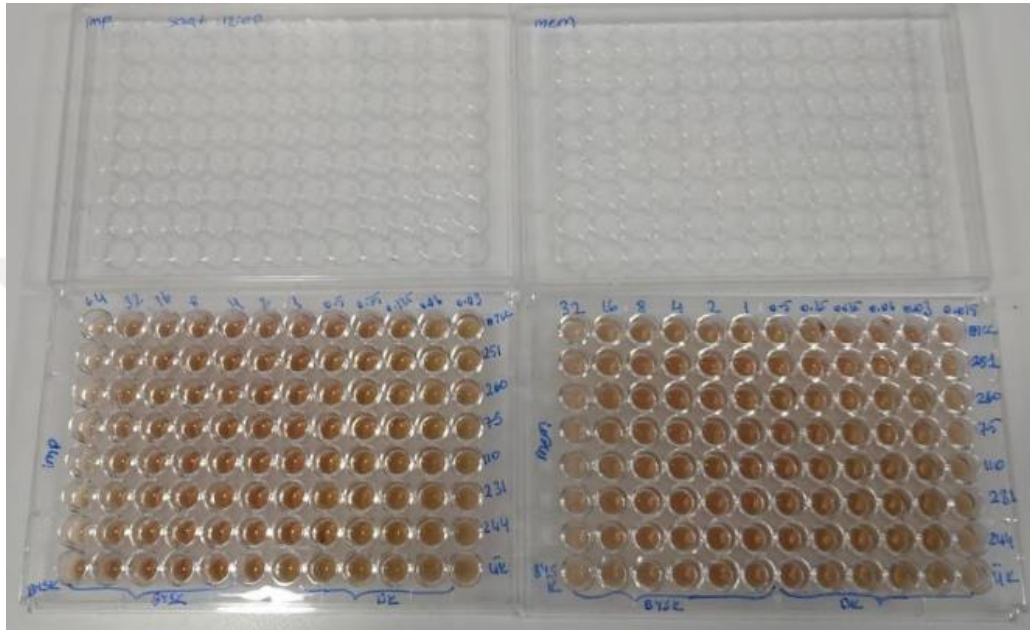
5.9.2. Minimum İnhibitör Konsantrasyon Değerinin Belirlenmesi

Mikrodilüsyon plakları hazırlandıktan sonra kapakları kapatılıp inkübatörde (Nüve, Türkiye) 18 ± 2 saat süreyle, 36°C de, %4-6 CO_2 ’ li ortamda inkübe edilmiştir.

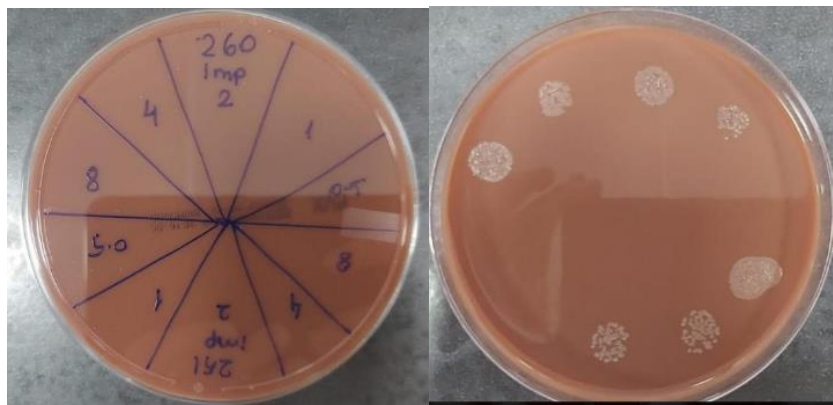
Sonuçlar, cihaz kullanmadan çıplak gözle, yansıtılmış ışıklı ortamda okunmuş ve mikroorganizmanın gözle görünür çoğalmasını engelleyen en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonu, µg/ml olarak ifade edilen Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) olarak kaydedilmiştir. Üreme, U tabanlı kuyucukların ortasında pellet olarak görülmüştür (Şekil 5.1).

5.10. Minimum Bakterisidal Konsantrasyon Değerinin Belirlenmesi

Sıvı mikrodilüsyon plağından MİK değerin belirlendiğı kuyucuktan daha yüksek konsantrasyona doğru pipetle 20 µl alınarak çikolata agara ekilmiştir. Ekim yapılan plaklar 18± 2saat süreyle, 35±1  C'de, %4-6 CO₂'li ortamda inkübe edildikten sonra değerlendirilmiştir. İzolatın ikolata agar plağına yapılan ekimlerinde üremenin olmadığı ilk kuyucuk minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) olarak belirlenmiştir (şekil 5.2).



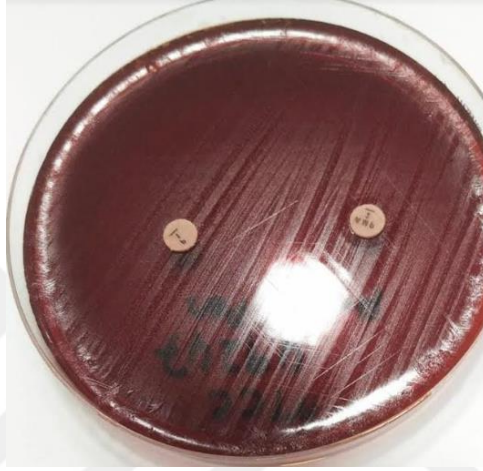
Şekil 5.1: İmipenem ve meropenem için minimum inhibitör konsantrasyon değerlerinin belirlenmesi için hazırlanan sıvı mikrodilüsyon plakları



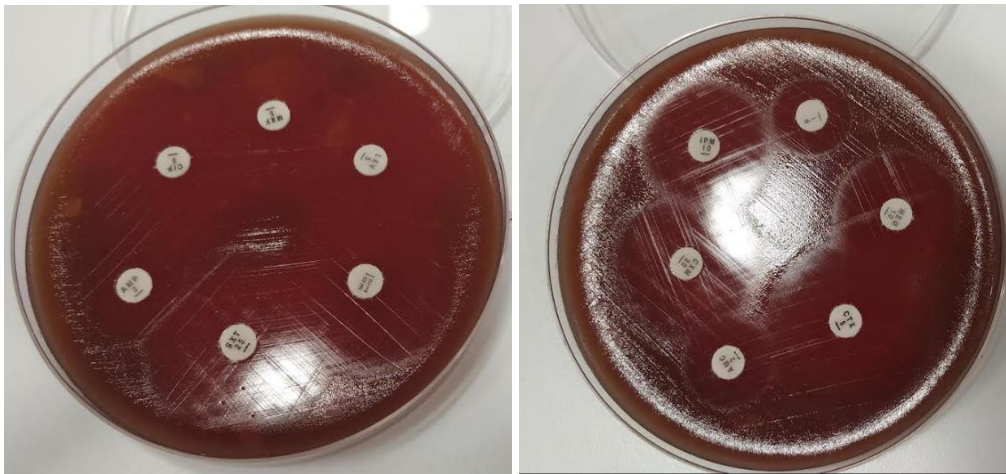
Şekil 5.2: Çikolata agar besiyerinde iki izolata ait imipenem için minimum bakterisidal konsantrasyon değerlerinin belirlenmesi

5.11. Kalite Kontroller

Kalite kontrol testleri EUCAST 2023 yönergeleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Direnç mekanizmasının varlığının kontrolü disk difüzyon yönteminde *H. influenzae* ATCC 49247 (Microbiologics, ABD) standart suşu kullanılarak penisilin ve ampisilin diskleri ile yapılmış ve beklendiği şekilde penisilin ve ampisiline dirençli olduğu gösterilmiştir (Şekil 5.3). Disk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon testlerinin kalite kontrolü için *H. influenzae* ATCC 49766 standart suşu kullanılmıştır. (Şekil 5.4) Kalite kontrol suşlarının MH-F agar ve MH-F sıvı besiyerlerinde üremeleri değerlendirilmiştir.



Şekil 5.3: Mueller Hinton-F agar plağında *H.influenzae* ATCC 49247 standart suşu ile penisilin ve ampisilin diskleri kullanılarak yapılan iç kalite kontrol



Şekil 5.4: Mueller Hinton-F agar plağında *H.influenzae* ATCC 49766 standart suşu ve 12 antibiyotik diski kullanılarak yapılan iç kalite kontrol

5.12. İstatistiksel Analiz

İki uyum katsayısı ($Kappa=0.85$ ile $Kappa=0.45$) arasında % 40 ve üzerindeki farkın klinik olarak önemli olacağı varsayımı altında, %5 yanılma düzeyi ve %80 güç ile değerlendirme yapmak için 44 izolata ihtiyaç duyulmuştur. Değerlendirme duyarlı, yüksek doza duyarlı ve dirençli olarak 3 farklı düzeyde, yüksek doz kategorisinin bulunmadığı antibiyotikler için duyarlı ve dirençli olarak 2 farklı düzeyde yapılmıştır. Çalışma sırasında %15 düzeyinde kayıp veri olabileceği varsayımı altında son örneklem büyüklüğü 52 olarak belirlenmiştir. Çalışmaya 84 izolat dahil edilmiştir. Veriler örnek sayısı (n) ve yüzde (%) olarak ifade edilmiştir.



6. BULGULAR

6.1. İzolatların Genel Özellikleri

Çalışmaya laboratuvarımıza 01.01.2020-01.06.2021 tarihleri arasında farklı poliklinik, klinik ve yoğun bakım ünitelerinden gönderilen balgam, ETA ve bronkoalveolar lavaj (BAL) gibi çeşitli alt solunum yolu örneklerinin kültürlerinde üreyen 84 adet *H.influenzae* izolatı dahil edilmiştir. İzolatlar MALDI-TOF MS ile tanımlanmıştır.

Çalışmadaki izolatlar 59 (%70,23) erkek ve 25 kadın (%29,76) hastadan gönderilen balgam, ETA ve bronkoalveolar lavaj örneklerinden elde edilmiştir. Hastaların yaşları 21-87 arasında değişmekte olup, medyan yaş 59,1'dir. Tablo 6.1'de hastaların yaş ve cinsiyet dağılımı belirtilmiştir.

Tablo 6.1: Hastaların yaş ve cinsiyet dağılımı

Yaş aralığı	Erkek n (%)	Kadın n (%)	Toplam n (%)
20-29	1 (1,19))	1 (1,19)	2 (2,38)
30-39	4 (4,76)	5 (5,95)	9 (10,71)
40-49	7 (8,33)	3 (3,57)	10 (11,90)
50-59	14 (16,66)	7 (8,33)	21 (24,99)
60-69	18 (21,42)	3 (3,57)	21 (24,99)
70-79	9 (10,71)	3 (3,57)	12 (14,28)
80-89	6 (7,14)	3 (3,57)	9 (10,71)
Toplam	59 (70,23)	25 (29,76)	84 (100)

İzolatlar klinik (%54,76), poliklinik (%36,90) ve yoğun bakım ünitelerinden (%8,33) gönderilen balgam, ETA ve BAL örneklerinin kültüründen elde edilmiştir. Bu birimlerden gönderilen örnekler sırasıyla balgam (% 73,80) ETA (% 17,85) ve BAL (% 8,33) dır. Tablo 6.2'de klinik örneklerin gönderildikleri poliklinik, klinik ve yoğun bakım sayı ve yüzdeleri belirtilmiştir.

Tablo 6.2: Klinik örneklerin gönderildikleri poliklinik, klinik ve yoğun bakım sayı ve yüzdeleri

İzolasyon yeri	Örnek sayısı n (%)	Örneğin Geldiği Bölüm		
		Poliklinik n (%)	Klinik n (%)	Yoğun Bakım n (%)
Balgam	62 (73,80)	28 (33,33)	32 (38,09)	2 (2,38)
ETA	15 (17,85)	2 (2,38)	9 (10,71)	4 (4,76)
BAL	7 (8,33)	1 (1,19)	5 (5,95)	1 (1,19)
Toplam	84 (100)	31 (36,90)	46 (54,76)	7 (8,33)

6.2. Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Sonuçları

Disk difüzyon ve gradiyent şerit test yöntemlerinin referans yöntem olan sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile temel uyum (TU) ve kategorik uyum (KU) oranları ISO standartlarına göre belirlenmiştir. KU, test edilen yöntemin referans yöntemle aynı duyarlılık kategorisinde sonuç vermesi, TU ise belirlenen MİK değerinin referans yöntemle göre ± 1 dilüsyon farkla sonuç vermesi olarak tanımlanmıştır. Testlerin “çok büyük hata” (ÇBH) ve “büyük hata” (BH) oranları saptanmıştır. Referans yöntemle dirençli bulunan bir izolatın test edilen yöntem ile duyarlı bulunması ÇBH, referans yöntem ile duyarlı bulunan bir izolatın test edilen yöntem ile dirençli bulunması BH olarak tanımlanmıştır. TU ve KU için $\geq 90\%$, ÇBH ve BH’ler için $\leq 3\%$ olması ISO kriterlere göre kabul edilebilir düzeylerdir (147).

6.2.1. Disk Difüzyon Yönteminin Sonuçları

H. influenzae izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemiyle çalışılmış, elde edilen duyarlılık zon çapları EUCAST 2023 eşik değerleri doğrultusunda değerlendirilmiştir. Çalışmada ampisilin, amoksisilin-klavulanik asit, sefuroksim, sefotaksim, imipenem, meropenem, siprofloksasin, levofloksasin, moksifloksasin, tetrasiklin, trimetoprim/sülfametoksazol için duyarlılık belirlenmiştir. Bir ünite penisilin diski beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı gelişen direnç mekanizmasının varlığını tarama amacıyla kullanılmıştır. Kromojenik sefalosporin diski (nitrosefin diski) beta-laktamaz enzim üretiminin tespiti için kullanılmıştır.

Penisilin diskiyle yapılan taramada 46 (% 54,76) izolatta direnç mekanizması saptanmıştır. Penisilin direnci saptanan izolatların hepsinde ampisilin de (% 54,76) dirençli bulunmuştur. İzolatların 13'ünde (%15,47) nitrosefin diskiyle beta-laktamaz enzim üretimi tespit edilmiştir (Tablo 6.3). İzolatların BLNAS, BLNAR, BLPAR ve BLPACR fenotip sayısı sırasıyla 38 (% 45,23), 33 (% 39,28), 9 (% 10,71), 4 (% 4,76) olarak bulunmuştur (Tablo 6.4).

Tablo 6.3: Penisilin disk tarama sonuçları ve beta-laktamaz enzim üretimi

Penisilin Tarama		Beta- laktamaz Enzim Üretimi	
Pozitif (Penisilin zon çapı < 12mm)	Negatif (Penisilin zon çapı ≥12 mm)	Pozitif	Negatif
46 (% 54,76)	38 (% 45,23)	13 (% 15,47)	71 (% 84,52)

Çalışmada antimikrobiyal dirençleri; ampisilin 46 (% 54,76), amoksisilin-klavulanik asit 24 (%28,57), sefuroksim 33 (%39,28), sefotaksim (%0), imipenem (%0), meropenem (%0), siprofloksasin 11 (% 13,09), levofloksasin 11 (% 13,09), moksifloksasin 11 (%13,09), tetrasiklin 14 (%16,66) ve trimetoprim/sülfametaksazol 25 (% 29,76) olarak belirlenmiştir. Amoksisilin klavulanik asit ve sefuroksimin oral formları için sırasıyla 60 (%71,42) ve 51 (% 60,71) izolat yüksek dozda duyarlı bulunmuştur (Tablo 6.5).

Tablo 6.4: İzolatların fenotip dağılımı

İzolat Fenotipi	n (%)
BLNAS	38 (45,23)
BLNAR	33 (39,28)
BLPAR	9 (10,71)
BLPACR	4 (4,76)

BLNAS: Beta laktamaz negatif ampisilin duyarlı, BLNAR: Beta-laktamaz negatif ampisilin dirençli, BLPAR: Beta-laktamaz pozitif ampisilin dirençli, BLPACR: Beta-laktamaz pozitif amoksisilin- klavulanik asit dirençli

6.2.2. Gradyent Şerit Test Yönteminin Sonuçları

Gradyent şerit test yöntemi imipenem ve meropenem için uygulanmış ve elde edilen duyarlılık sınır değerleri EUCAST 2023 eşik değerleri doğrultusunda değerlendirilmiştir. İmipenem için 59 izolat (%70,23) duyarlı, 25 izolat (%29,76) dirençli bulunmuştur.

Meropenem için 84 (% 100) izolat bu yöntemle duyarlı bulunmuştur (Tablo 6.6). Bu yöntemle MİK değerlerinin dağılımı imipenem için 0,064 - >32 µg/ml, meropenem için 0,047-1 µg/ml aralığında saptanmıştır (Tablo 6.7) (Tablo 6.8).

Tablo 6.5: İzolatların disk difüzyon yöntemiyle antibiyotik duyarlılıklarının dağılımı

Antibiyotik	Duyarlılık Kategorisi		
	S n (%)	YDD n (%)	R n (%)
AMP	38 (45,23)	-	46 (54,76)
AMC (i.v form)	60 (71,42)	-	24 (28,57)
AMC (oral form)	0	60 (71,42)	24 (28,57)
CXM (i.v form)	51 (60,71)	0	33 (39,28)
CXM (oral form)	0	51 (60,71)	33 (39,28)
CTX	84 (100)	-	0
İMP	84 (100)	-	0
MEM	84 (100)	-	0
CİP	73 (86,90)	-	11 (13,09)
LEV	73 (86,90)	-	11 (13,09)
MOX	73 (86,90)	-	11 (13,09)
TET	70 (83,33)	-	14 (16,66)
SXT	56 (66,66)	3 (3,57)	25 (29,76)

S: Duyarlı, R: Dirençli, YDD: Yüksek dozda duyarlı, AMP: ampisilin, AMC: amoksisilin-klavulanik asit, CXM: sefuroksim, CTX: sefotaksim, İMP: imipenem, MEM: meropenem, CİP: siprofloksasin, LEV: levofloksasin, MOX: moksifloksasin, TET: tetrasiklin, SXT: trimetoprim sülfametoksazol, i.v: intravenöz

Tablo 6.6: Gradyent şerit test yöntemiyle izolatların imipenem ve meropenem duyarlılıkları

Antibiyotik	İzolatların Duyarlılık Kategorisi	
	S n (%)	R n (%)
İMP	59 (70,23)	25 (29,76)
MEM	84 (100)	0

İMP: imipenem MEM: meropenem

Tablo 6.7: Gradyent şerit test yöntemiyle imipenem MİK değerlerinin dağılımları

	Antibiyotik MİK değerlerinin saptandığı konsantrasyonlar (µg/ml)													
İMP	0,064	0,094	0,125	0,38	0,50	0,75	1	1,5	2	4	6	8	12	>32
n	2	1	2	3	6	5	14	1	25	1	2	4	1	17
(%)	2,3	1,1	2,3	3,5	7,12	5,95	16,66	1,19	29,76	1,19	2,38	4,76	1,19	20,23

İMP: İmipenem

Tablo 6.8: Gradyent şerit test yöntemiyle meropenem MİK değerlerinin dağılımları

	Antibiyotik MİK değerlerinin saptandığı konsantrasyonlar (µg/ml)									
MEM	0,047	0,064	0,094	0,125	0,16	0,19	0,25	0,38	0,50	1
n	1	3	13	25	1	8	16	4	12	1
(%)	(1,19)	(3,57)	(15,47)	(29,76)	(1,19)	(9,52)	(19,04)	(4,76)	(14,28)	(1,19)

MEM: meropenem

6.2.3. Sıvı Mikrodilüsyon Test Yönteminin Sonuçları

Sıvı mikrodilüsyon (SMD) test yöntemi imipenem ve meropenem için uygulanmış ve elde edilen MİK değerleri EUCAST 2023 kriterlerine göre değerlendirilmiştir. Bu yöntemle imipenem ve meropeneme dirençli izolat bulunmamıştır. İzolatların MİK dağılımı Tablo 6.9 ve 6.10'da verilmiştir. İmipenem için MİK₅₀ değeri 1 µg/ml, MİK₉₀ değeri 2 µg/ml, meropenem için MİK₅₀ değeri 0,06 µg/ml, MİK₉₀ değeri 0,25 µg/ml olarak belirlenmiştir.

Tablo 6.9: Sıvı mikrodilüsyon test yöntemiyle imipenem MİK değerlerinin dağılımı

	Antibiyotik MİK değerlerinin saptandığı konsantrasyon aralığı (µg/ml)						
İMP	0,03	0,06	0,125	0,25	0,50	1	2
(n)	0	0	4	9	23	30	18
(%)	(0)	(0)	(4,76)	(10,71)	(27,38)	(35,71)	(21,42)

İMP: imipenem

Tablo 6.10: Sıvı mikrodilüsyon test yöntemiyle meropenem MİK değerlerinin dağılımı

Antibiyotik MİK değerlerinin saptandığı konsantrasyon aralığı (µg/ml)								
MEM	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,50	1	2
(n)	0	16	32	18	14	2	1	1
(%)	(0)	(19,04)	(38,09)	(21,42)	(16,66)	(2,38)	(1,19)	(1,19)

MEM: Meropenem

Çalışmamızda imipenem ve meropenem için disk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon test sonuçları 84 izolatta (% 100) uyumlu bulunmuştur (Tablo 6.11). BH ve ÇBH saptanmamıştır.

Tablo 6.11: İmipenem ve meropenem için disk difüzyon testinin sıvı mikrodilüsyon test ile uyumu

	İMP (%)	MEM (%)
DD-SMD	84 (100)	84 (100)

İMP: İmipenem, MEM: Meropenem

Gradyent şerit test ile sıvı mikrodilüsyon testi arasında imipenem için kategorik uyum 59 izolatta (% 70,23), temel uyum 35 izolatta (% 41,66) bulunmuştur. İki yöntem arasında ÇBH saptanmazken, BH 25 izolatta (%29,76) saptanmıştır (Tablo 6.12). Kategorik uyumsuzluk gösteren 25 (% 29,76) izolattan 19'u (% 76) BLNAR, 3'ü (% 12) BLPAR, 2'si (% 8) BLPACR ve 1'i (% 4) BLNAS fenotipi olarak belirlenmiştir (Tablo 13)

Gradyent şerit test ile sıvı mikrodilüsyon testi arasında meropenem için kategorik uyum 84 izolatta (% 100), temel uyum 59 izolatta (% 70,23) bulunmuştur. İki yöntem arasında ÇBH ve BH saptanmamıştır (Tablo 6.12).

Tablo 6.12: Gradyent şerit test ve sıvı mikrodilüsyon testlerinin uyumu

GŞT-SMD	İMP				MEM			
	KU (%)	TU (%)	BH (%)	ÇBH (%)	KU (%)	TU (%)	BH (%)	ÇBH (%)
	59 (70,23)	35 (41,66)	25 (29,76)	0	84 (100)	59 (70,23)	0	0

GŞT: Gradyent şerit test, SMD: Sıvı mikrodilüsyon, KU: Kategorik uyum, TU: Temel uyum BH: Büyük hata, ÇBH: Çok büyük hata

Tablo 6.13: Gradyent şerit test ile sıvı mikrodilüsyon testi arasında imipenem için uyumsuzluk gösteren izolatların fenotipik dağılımı

Kategorik Uyumsuz İzolatların Fenotipik Dağılımı	BLNAR	BLPAR	BLPACR	BLNAS
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
	19 (76)	3 (12)	2 (8)	1 (4)

BLNAR: Beta-laktamaz negatif ampisilin dirençli, BLPAR: Beta-laktamaz pozitif ampisilin dirençli, BLPACR: Beta-laktamaz pozitif amoksisilin klavulanik asit dirençli, BLNAS: Beta-laktamaz negatif ampisilin duyarlı

Çalışmada 17 izolatla imipenemde disk difüzyonda zon içi üremeler görülmüştür. EUCAST 2023 kriterlerine göre bu izolatlar, zon çapları klinik sınır değer ve üzerinde olduğu için duyarlı olarak değerlendirilmiştir. İzolatların tamamı sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle de duyarlı bulunmuştur. Gradyent şerit testle bu izolatların 12'sinde (%70.58) heterodirenç göstergesi olan çift zon şeklinde üremeler görülmüştür. (Şekil 6.1) 5 izolat (% 29.41) ise duyarlı bulunmuştur. Fenotip dağılımlarına bakıldığında 13 BLNAR, 2 BLPAR, 1 BLPACR, 1 BLNAS izolat bulunmuştur. BLNAR izolatlarda MİK altı izolatta >32 µg/ml, bir izolatta 12 µg/ml, bir izolatta 8 µg/ml, iki izolatta 2 µg/ml, bir izolatta 0,5 µg/ml, bir izolatta 0,75 µg/ml, bir izolatta 0,094 µg/ml olarak bulunmuştur. İki BLPAR izolatta MİK değeri >32 µg/ml, bir BLPACR izolatta MİK değeri >32 µg/ml ve 1 BLNAS izolatta MİK değeri 4 µg/ml olarak bulunmuştur. (Tablo 6.14 ve 6.15).



Şekil 6.1: Çikolata agar plağında imipenem ve meropenem şerit test striplerinin birbirine paralel ve ters yönde yerleştirilmesi ve imipenem heterodirencinin görünümü

Tablo 6.14: Disk difüzyon testinde zon içi üremesi olan izolatların sıvı mikrodilüsyon ve gradiyent şerit test ile karşılaştırılması

	DD		SMD		GŞT	
	S	R	S	R	S	R
BLNAR	13	0	13	0	5	8
BLPAR	2	0	2	0	0	2
BLPACR	1	0	1	0	0	1
BLNAS	1	0	1	0	0	1
TOPLAM	17	0	17	0	5	12

Tablo 6.15: Disk difüzyon ile zon içi üremesi olan izolatların gradiyent şerit test ile MİK değerlerinin dağılımı

	Heterodirençli izolatların MİK dağılımı (µg/ml)							
	32	12	8	4	2	0,75	0,50	0,094
BLNAR	6	1	1	0	2	1	1	1
BLPAR	2	0	0	0	0	0	0	0
BLPACR	1	0	0	0	0	0	0	0
BLNAS	0	0	0	1	0	0	0	0

Meropenem için disk difüzyon yöntemi ile gradiyent şerit testi arasında uyum 84 izolatta (%100) bulunmuştur. İmipenem için disk difüzyon ve gradiyent şerit test sonuçları 59 izolatta (% 70,23) uyumlu, 25 (% 29,76) izolatta uyumsuz bulunmuştur. Uyumsuzluk en fazla 19 izolat ile BLNAR fenotipinde, en az uyumsuzluk ise bir izolat ile BLNAS fenotipinde görülmüştür. 3 izolat BLPAR ve 2 izolat BLPACR fenotipinde uyumsuzluk göstermiştir.

İzolatların imipenem için MBK değerleri 0,25-16 µg/ml, meropenem için 0,03-4 µg/ml arasında tespit edilmiştir (Tablo 6.16)

Tablo 6.16: İmipenem MBK dağılımı

İMP	0,25 µg/ml	0,50 µg/ml	1 µg/ml	2 µg/ml	4 µg/ml	8 µg/ml	16 µg/ml
n (%)	2 (2,83)	11 (13,09)	23 (27,38)	30 (35,71)	10 (11,90)	6 (7,14)	2 (2,83)

İMP: İmipenem

Tablo 6.17: Meropenem MBK dağılımı

MEM	0,03 µg/ml	0,06 µg/ml	0,125 µg/ml	0,25 µg/ml	0,50 µg/ml	1 µg/ml	4 µg/ml
n (%)	7 (8,33)	24 (28,57)	25 (29,76)	13 (15,47)	8 (9,52)	5 (5,95)	2 (2,83)

MEM: Meropenem

7. TARTIŞMA

Haemophilus influenzae; *Streptococcus pneumoniae* ve *Moraxella catarrhalis* ile birlikte majör solunum yolu patojenleri içerisinde yer alır (148, 149). Çocukluk yaş grubunda Hib konjuge aşısı uygulaması sonrası bu etkene bağlı invaziv hastalık sıklığı oldukça azalmış ancak özellikle yetişkin hastalarda tiplendirilemeyen ve tip b dışı izolatlarla oluşan enfeksiyonlarda artış olmuştur (85).

Çalışma popülasyonumuzun %70,23'ünü erkek, %29,76'sını kadın hastalar oluşturmuştur. Hastaların yaşları 21-87 arasında değişmektedir. Yaşa göre katmanlandırıldığında 20-29 ve 30-39 yaş grubu haricinde hastalarda erkek cinsiyet daha fazla görülmüştür. Hastaların medyan yaş 59,1'dir. Örneklerin %54,76'sı kliniklerden gönderilmiş olup, balgam %73,80 ile en çok incelenen örnek türünü oluşturmuştur.

Puig ve arkadaşlarının İspanya'da 2000-2009 yılları arasında toplum kaynaklı pnömonezi olan yetişkin hastaların balgam örnekleriyle yaptığı çalışmada erkek hastalar tüm hastaların %69,6'sını oluşturmuş, medyan yaş 68,15 olarak bildirilmiştir (150). Wen ve arkadaşlarının Çin'de 2020-2021 arasında yaptığı çalışmada erkek hastalar tüm hastaların %68,75'ini oluşturmuştur. Balgam örneği % 67,5 ile en çok çalışılan örnek türü olmuştur (151). ECDC 2018 raporunda 25-44 yaş dışındaki tüm yaş gruplarında erkek hastaların oranının yüksek olduğunu bildirmiştir (87). Çalışmamızın verileri yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızda 84 izolat içerisinde en fazla bulunan fenotip 38 izolatla (% 45,23) BLNAS olmuştur. Bunu sırasıyla 33 (%39,28), 9 (%10,71) ve 4 (4,76) izolatla BLNAR, BLPAR ve BLPACR fenotipi takip etmiştir. Bir ünite penisilin diskiyle yapılan tarama testinde beta-laktam grubu antibiyotikler için izolatların % 54,76'sında direnç mekanizması saptanmıştır. Dirençli izolatların %15,47'sinin beta-laktamaz enzimi ürettiği saptanmıştır. Ampisilin dirençli izolatların oranı ise %54,76 olarak saptanmıştır. Dünyanın farklı coğrafyalarında direnç oranları farklılık göstermektedir. Fluit ve arkadaşlarının çeşitli Avrupa ülkelerinden sağlanan *H. influenzae* izolatlarıyla yaptıkları çalışmada 2002-2003 yıllarında beta-laktamaz pozitifliği Fransa'da %29, Portekiz'de %38, İspanya'da %14, Birleşik Krallık'ta %21, İrlanda'da %9, BLNAR izolat pozitifliği ise Polonya'da %20, Portekiz ve İspanya'da %12, Birleşik Krallık'ta %18, İrlanda'da %15 olarak bildirilmiştir (152). Jansen

ve arkadaşlarının 2006-2007 tarihlerinde Avrupa’da 18 ve Kanada’da 2 merkezden toplanan 536 *H.influenzae* izolatu ile yaptıkları çalışmada direnç gelişiminin %13,6 ile beta laktamaz üretimi, %11,4 ile BLNAR izolatlar üzerinden geliştiği bildirilmiştir (153). Park ve arkadaşlarının Güney Kore’de 2010 yılında 5 yaş altı çocuklarda yaptığı çalışmada 122 NTHi izolatının %73,8’inde ampisilin için azalmış duyarlılık veya direnç saptanmıştır. Dirençli izolatların %9’u BLPAR, %40,2’si BLNAR, %24,6’sı BLPACR olarak bildirilmiştir (154). Deghmane ve arkadaşlarının Fransa’da 2017 yılında 138 invaziv 100 non-invaziv izolat ile yaptıkları çalışmada invaziv izolatlarda ampisilin direnci %24, non-invaziv izolatlarda ise %51 olarak bildirilmiştir. BLNAR fenotipi, invaziv izolatlarda %7, non-invaziv izolatlarda ise %24 olarak belirlenmiştir (155). Ubukata ve arkadaşlarının Japonya’da 2000-2011 yıllarında çocuk hastalardan izole edilen 1353 *H. influenzae* izolatu ve 23 BOS örneği ile yaptıkları çalışmada ampisilin duyarlılığının 2000’de %32 iken, 2011’de %8’e düştüğü tespit edilmiştir. Ampisilin direncinin özellikle beta laktamaz negatif izolatlar arasında arttığı, 2009’da %60 ve 2011 yılında %70’e yükseldiği bildirilmiştir. 2000 yılında %26 olan BLPAR izolatların yüzdesinin 2011’de %0’a düştüğü saptanmıştır. Aşının Japonya’da 2008’de kullanılmaya başlamasıyla BLNAR izolatların da görülmeye başladığı belirtilmiştir. (156). Potts ve arkadaşları Amerika Birleşik Devletleri’nde 2016 yılında yaptıkları toplum tabanlı surveyans çalışmasında 700 invaziv *H.influenzae* izolatından %28,1’nin ampisiline dirençli, %3,1’nin ampisiline orta derecede duyarlı olduğu, ampisiline dirençli izolatların %88,8’inde beta-laktamaz geninin bulunduğu bildirilmiştir (157).

Ülkemizde de farklı zamanlarda yapılan araştırmaların sonuçları farklılıklar göstermektedir. Özkul ve arkadaşlarının Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi’nde 2003-2006 tarihleri arasında yaptıkları çalışmada beta-laktamaz enzim üretiminin yıllar içinde arttığı bildirilmiştir. 2003 yılında hiçbir izolatta beta laktamaz üretimi yokken 2005 yılında %7, 2006 yılında ise %8 olarak saptanmıştır. Tüm izolatların %5,9’u ampisiline dirençli bulunmuştur. Ampisiline dirençli izolatların hepsinde beta laktamaz üretimi varken, BLNAR izolat saptanmamıştır (158). Gür ve arkadaşlarının Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde Ocak 2018-Ağustos 2019 tarihleri arasında klinik örneklerden izole edilen 480 *H.influenzae* izolatıyla CLSI kriterine göre yaptıkları çalışmada ampisilin direnci % 16,2 olarak tespit edilmiştir. İzolatların % 7,9’u BLNAR, % 8,3’ü BLPAR, % 1,9’u ise BLPACR olarak saptanmıştır (159). Budak ve arkadaşlarının Haziran 2008- Mayıs 2010 tarihleri arasında çocuk hastalardan izole edilen 139 *H. influenzae* izolatu ile yaptıkları çalışmada 105 (%75) izolatla en fazla bulunan serotip NTHi olmuştur. Ampisilin direnci altı izolatta (%4.3) saptanmıştır. Bunlardan dördü NTHi olarak belirlenmiştir. Dört BLPAR

izolatta *bla*_{TEM-1} geni pozitif bulunmuş aynı zamanda PBP3 değişimi de saptanmıştır. Dört adet (%11,1) serotip a, iki adet (%5,5) serotip b ve 30 adet (%83,3) NTHi ise zayıf-BLNAR izolat olarak tanımlanmıştır. *bla*_{TEM-1} pozitif izolatlarla birlikte zayıf-BLNAR izolatları altı adet (%15) serotip a, iki adet (%5) serotip b ve 32 adet (%80) NTHi olarak bulunmuştur. Çalışmada 30 (%83,3) NTHi izolatı zayıf- BLNAR olarak tanımlanarak bu fenotipin yüksekliği gösterilmiştir (160). Alışkan ve arkadaşlarının 2012-2015 tarihlerinde yaptıkları çalışmada izolatların % 15,6'sında beta-laktamaz pozitifliği saptanmıştır. BLNAR izolat oranı % 8.6 olarak bildirilmiştir (161). Bir surveyans çalışması olan Antimikrobiyal Direnç Sürveyansı'nın (SOAR) Türkiye ayağında 2011-2013 sonuçlarında incelenen 339 *H.influenzae* izolatı için beta-laktamaz pozitiflik oranı % 6,8, BLNAR izolat oranı CLSI kriterleriyle % 9,1, EUCAST kriterleriyle %14,7 olarak saptanmıştır (162). SOAR-Türkiye 2015-2017 verilerinde CLSI kriterleriyle 239 *H.influenzae* izolatının 23'ü (%9,6) beta-laktamaz pozitif bulunmuştur. EUCAST sınır değerleriyle 11 (% 4,60), CLSI sınır değerleriyle 5 (% 2,09) izolat BLNAR olarak bildirilmiştir. Ampisilin duyarlılığı EUCAST ve CLSI sınır değerleriyle %87 bulunmuştur (163). Yurttakal ve arkadaşlarının 2020-2021 tarihlerinde Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde 49 *H. influenzae* izolatıyla yaptıkları çalışmada BLNAS, BLPAR, BLNAR, BLPACR izolat oranları sırasıyla % 55,1, %8,1, %34,6 ve % 2,04 olarak bildirilmiştir (164). Çalışmamızda %10,71 olarak tespit edilen BLPAR oranı ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda bulunan %6,8 %8,3, %15,6, %19,7 benzerlik göstermektedir (159, 161, 162, 165). Çalışmamızda %34,28 olarak tespit edilen BLNAR izolat oranı yakın zamanda Yurttakal ve ark'nın yaptığı çalışma ile (%34,6) uyumlu bulunmuştur. Ayrıca Fransa'da Deghmane ve ark'nın yaptığı çalışmada invaziv olmayan izolatlarda %24 olarak bulunan BLNAR izolat oranına da yakın bir değerdir (155). Güney Kore'de Park ve ark'nın %40,2 olarak bildirdikleri BLNAR izolat yüzdesiyle benzer olarak değerlendirilmiştir (154). Bununla birlikte BLNAR izolat yüzdesi Söyletir ve ark'nın 2011-2013 arasında yaptıkları çalışmada %9,1 (162), Alışkan ve ark'nın 2016'da yaptıkları çalışmada %8.6 (161), Gür ve ark'nın 2018-2019 tarihlerinde yaptıkları çalışmada %7,9 (159) olarak bulunmuştur. *H. influenzae* heterojen yapıda bir bakteri olup; farklı coğrafyalar, antibiyotik kullanım alışkanlıkları gibi pek çok etken mikroorganizmanın antibiyotik duyarlılık sonuçlarını etkileyebilmektedir. Ayrıca duyarlılık testlerinde kullanılan yöntem ve temel alınan kılavuz rehberler, aşılarda aşılama takvimlerine giriş tarihi gibi değişkenlerin de farklılığına neden olabileceği raporlanmıştır (146, 150,151).

Çalışmamızda ampisilin direnci % 54,76, amoksisilin-klavulanik asit direnci % 28,57, sefuroksim direnci %39,28 olarak bulunurken sefotaksim, imipenem ve meropenem direnci

bulunmamıştır. *H.influenzae* izolatları ile oluşan enfeksiyonlarda aminopenisilinler ve sefalosporinler uzun yıllar tedavide ilk basamak ilaçlar olarak kullanılmışlardır. Ancak ilerleyen yıllarda bu ilaçlara karşı dünyanın farklı coğrafyalarından farklı direnç oranları bildirilmiştir (11). Türkiye, antibiyotik kullanımında Doğu Avrupa ülkeleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Sefalosporin grubu için birinci, penisilin ve kinolon grubu için dördüncü en yüksek kullanım oranına sahiptir. Aşırı antibiyotik kullanımı ise dirençli mutantların seçilip mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesini kolaylaştırır (166). Taha ve arkadaşlarının 2017-2021 yıllarında Fransa’da non-invaziv izolatlarla yaptıkları çalışmada direnç oranları amoksisilin için % 61,4, amoksisilin-klavulanik asit için % 47,4 ve sefotaksim için % 39,3 olarak saptanmıştır (167). Li ve arkadaşlarının Şangay’da 2015-2018 yıllarında NTHi izolatlarıyla yaptıkları çalışmada ampisilin direnci %45,10, sefuroksim direnci %29,41 olarak belirlenmiştir. Seftriakson direnci ise saptanmamıştır (168). Kiedrowska ve arkadaşlarının 2005-2019 tarihleri arasında yaptıkları çalışmada ampisilin, amoksisilin-klavulanik asit, sefuroksim ve seftriakson direnci sırasıyla % 12,6, %0,2, % 17,1 ve % 0,2 olarak saptanmıştır. İzolatların %9,7’si beta-laktamaz üreticisi olarak bildirilmiştir. Vahaboğlu ve arkadaşlarının 1993 yılında sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle antibiyotik direncini inceledikleri çalışmalarında izolatların %25’i ampisiline dirençli bulunmuş, ampisilin dirençli izolatların %8’inin sefuroksim ve sefotaksime de dirençli olduğu saptanmıştır (88). Torun ve arkadaşlarının Kasım 2003 - Nisan 2004 tarihleri arasında çocuklarda yaptıkları çalışmada direnç oranları ampisilin-sulbaktam için % 0,5, sefuroksim için %1,5 iken, sefotaksim, seftriakson ve imipenem direnci bildirilmemiştir (77). Alışkan ve arkadaşlarının 2012-2015 tarihlerinde yaptıkları çalışmada ampisilin direnci %28,6, sefaklor direnci %36,2, sefuroksim direnci %29,3 olarak bildirilmiştir (161). SOAR-Türkiye 2011-2013 sonuçlarına göre amoksisilin-klavulanik asit duyarlı izolatlar CLSI kriterleriyle % 90 iken EUCAST kriterleriyle % 82,9 olarak belirlenmiştir. Sefuroksim duyarlılıkları kullanılan sınır değerler doğrultusunda oldukça büyük farklılıklar göstermiştir. Sefuroksim duyarlılığı CLSI kriterleriyle % 97 iken, FK/FD değerlerine göre %85 ve EUCAST kriterlerine göre %15 olarak saptanmıştır (162). SOAR-Türkiye 2015-2017 verilerinde sefuroksim (oral) duyarlılığı ise EUCAST sınır değerleriyle %3,8 olarak tespit edilmiştir (163). Gür ve arkadaşlarının 2018-2019 yıllarında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde yaptıkları çalışmada sefuroksim direnci % 3,7 iken meropenem, sefotaksim ve seftriakson direnci bildirilmemiştir (159). Çalışmamızdaki amoksisilin-klavulanik asit ve sefuroksim direncinin ülkemizde bu antibiyotiklerin reçetelenme alışkanlığı ve kullanım sıklığıyla ve kullanılan kılavuzun sınır değerleriyle ilişkili olduğu düşünülmüştür. Antibiyotik duyarlılık testlerini çalışırken kullanılan yöntem ve esas alınan kılavuzların işaret ettikleri besiyerleri ve klinik sınır

değerlerindeki farklılıkların antibiyotiklerin duyarlılık sonuçlarını etkileyebileceğini gösteren bazı çalışmalar mevcuttur. Billal ve arkadaşlarının 2007’de yayımlanan çalışmalarında ampisilin, amoksisilin-klavulanik asit, seftriakson ve meropenemin MİK değerleri gradiyent şerit ve sıvı mikrodilüsyon test yöntemi ile karşılaştırılmıştır. BLNAS ve BLPAR izolatların antibiyotik duyarlılık sonuçlarının uyumu her iki testle %92-100 arasında değişirken, BLNAR ve BLPARC izolatlarda uyum oldukça azalmıştır. Aminopenisilinler ve sefalosporinler için uyum %48,27-100 iken meropenem için %42,10-44,80’e düşmüştür (169). Skaare ve arkadaşlarının 2015’te yayımlanan çalışmalarında PBP3 değişimi gösteren izolatların beta-laktam grubu antibiyotikler için duyarlılık testleri, HTM besiyerinde EUCAST kriterleriyle E-test ve disk difüzyon yöntemleri ile çalışılmış, referans yöntem olan sıvı mikrodilüsyon ile karşılaştırılmıştır. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi hem CLSI hem de EUCAST sınır değerlerine göre değerlendirilmiştir. Ampisilin için E-test sonuçlarının CLSI ile %13, EUCAST ile %34,3 gibi yüksek bir oranda çok büyük hata (ÇBH) verdiği hem temel uyum (TU) hem de kategorik uyumun (KU) oldukça zayıf (< %70) olduğu ve yanlış duyarlı oran (YDO) sonuçlarının CLSI ile % 87, EUCAST ile %88,3 olduğu bildirilmiştir. 2 µg’lık ampisilin diskinin ayarlanmış (+2mm) zon sınır değeriyle ampisilin duyarlılığının kategorizasyonunda E-testten daha üstün olduğu (uyum %74, çok büyük hata %11 ve YDO %28,3) belirtilmiştir. Bu durumun tersine sefuroksimin duyarlılık kategorisini belirlemede E-testin sefuroksim 30 µg’lık diskten daha üstün olduğu (uyum E-testle %57,1 iken diskle %60,4; ÇBH E-testle %2,6 iken diskle %9,7; YDO E-testle %7,1 iken diskle %26,8) bildirilmiştir (170).

Çalışmamızda referans yöntemle imipenem ve meropenem dirençli izolat bulunamamıştır. İmipenem için disk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleri arasındaki uyum %100 iken gradiyent şerit test ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleri arasındaki kategorik uyum %71,42, temel uyum % 41,66 olarak bulunmuştur. Kategorik olarak uyumsuz bulunan 24 izolattan 18’i (% 75) BLNAR, üçü (% 12,5) BLPAR, ikisi (% 8,33) BLPACR ve biri (% 4,16) BLNAS fenotip göstermiştir. Bu iki yöntem arasında çok büyük hata bulunmazken büyük hata % 28,57 olarak bulunmuştur. Meropenem için disk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleri arasındaki uyum %100 iken gradiyent şerit test ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleri arasında kategorik uyum % 100, temel uyum % 69,04 olarak bulunmuştur. Son yıllarda dünyanın pek çok yerinde PBP3 değişimine bağlı dirençli izolatlar beta-laktamaz üretimine bağlı dirençten daha çok görülmeye başlanmıştır (17, 122, 154, 171, 172). Ülkemizde 2009-2011 yıllarında Kuvat ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada BLNAR izolat yüzdesi % 3 olarak bildirilmiş ve iki izolat gradiyent şerit test yöntemi ile meropeneme dirençli bulunmuştur (173). Lam ve arkadaşlarının 2016 yılında Almanya’da 474 izolatla

yaptıkları çalışmada imipenem dirençli izolatların çoğunun g-BLNAR izolatlar olduğu gösterilmiştir. Sefotaksim dirençli izolatların tamamının ve imipenem dirençli izolatların yaklaşık %95'inin PBP3 değişimi içerdiği belirtilmiştir (17). Cerquetti ve arkadaşlarının Ocak 2004- Aralık 2006 tarihleri arasında İtalya'da yaptıkları çalışmada ampisilin duyarlı, imipenem heterojen dirençli iki NTHi izolatu bildirilmiştir. İzolatlar gradiyent şerit test yöntemiyle dirençliken standart sıvı mikrodilüsyon ile duyarlı bulunmuştur. Bakteri inokulumunun $3-4 \times 10^8$ KOB/ml olarak hazırlandığı ve gradiyent şerit test yönteminin kullanıldığı testte MİK değeri $>32 \mu\text{g/ml}$ olarak saptanmıştır. Standart sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile bakteri inokulumu 5×10^5 KOB/ml olarak ayarlandığında ise her iki izolat da duyarlı olarak saptanmıştır. *ftsI* genindeki mutasyonların imipenem direnç fenotipinden sorumlu olup olmadığını araştırmak için, imipeneme duyarlı Rd izolatu, dirençli izolatın PZR ile amplifiye edilmiş *ftsI* geni kullanılarak transforme edilmiştir. Gradiyent şerit testiyle transformantın imipenem MİK değerinin, Rd suşuna kıyasla 10 kat arttığı görülmüştür (174). Kitaoka ve arkadaşlarının 2018 yılında yayımlanan çalışmalarında V525_N526insM içeren değiştirilmiş bir PBP3'e sahip klinik izolatın azalmış karbapenem duyarlılığına neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca AcrR'nin transkripsiyonunun erken sonlanmasına neden olan bazı delesyonlar ile dışa atım pompa aktivitesinin artarak, karbapenem duyarlılığında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (18).

Çalışmamızda imipenem gradiyent şerit test sonuçlarının referans yöntem olan sıvı mikrodilüsyon test yöntemiyle olan uyumsuzluğunun, yapılan diğer çalışmalarla benzer şekildedir. Gradiyent şerit test yöntemi ile dirençli mikroorganizma sayısı daha yüksek olarak tespit edilmiştir. Gradiyent şerit test ile dirençli, sıvı mikrodilüsyon ile duyarlı bulunan izolatların %76'sının BLNAR fenotipte olduğu görülmüştür. Bu farklılığın izolatlarımız içindeki heterodirençli izolatlardan kaynaklandığı düşünülmüştür (Şekil 7.1). MİK değerindeki bu yüksekliğin benzer çalışmalarda olduğu gibi gradiyent şerit test yönteminde daha yüksek (1×10^8 KOB/ml) yoğunlukta bakteri inokulumunun kullanılması buna karşın sıvı mikrodilüsyon test yönteminde ise daha düşük yoğunlukta (5×10^5 KOB/ml) bakteri inokulumunun kullanılmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Çalışmamızda trimetoprim-sülfametoksazol direnci % 29,76 olarak tespit edilmiştir. Trimetoprim-sülfametoksazol direnci dünya genelinde yüksektir. ABD'de Potts ve arkadaşlarının 2016 yılında yaptıkları çalışmada direnç oranının %22,9 olduğu, azalmış duyarlılık gösteren izolatların da dahil edildiğinde oranın % 29,9'a yükseldiği bildirilmiştir (157). İspanya'da Campos ve arkadaşlarının 1996-2002 yıllarında *H. influenzae* serotip f

üzerine yaptıkları çalışmada trimetoprim-sülfametoksazol direnç oranı %44,9 olarak yayımlanmıştır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda da farklı direnç oranları bildirilmiştir. Torun ve arkadaşlarının 2003-2004 tarihlerinde aşılanmamış çocuklarla yaptıkları çalışmada trimetoprim-sülfametoksazol direnci %28,6 olarak bildirilmiştir (77). Özkul ve arkadaşlarının Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yaptıkları çalışmada trimetoprim-sülfametoksazole dirençli izolatların oranı 2006 yılı için %36 olarak bildirilmiştir (158). Bilgi ve arkadaşlarının 2010-2012 yıllarında İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yaptıkları çalışmada trimetoprim-sülfametoksazol direnci %20,5 olarak belirlenmiştir (175). Alışkan ve arkadaşlarının 2012-2015 tarihleri arasında Başkent Üniversitesi Adana Araştırma Uygulama Hastanesine gelen solunum yolu örnekleriyle yaptıkları çalışmada trimetoprim-sülfametoksazol direnç oranı % 43,9 olarak bildirilmiştir (161). SOAR 2015-2016 Türkiye çalışmasında ülkemizdeki trimetoprim-sülfametoksazol direnç oranı %28 olarak raporlanmıştır (163). Çalışmamızın sonuçları ülkemizde elde edilen verilerle uyumludur.

Çalışmamızda kinolon direnci % 13,09 olarak tespit edilmiştir. Florokinolon direnci dünya genelinde düşüktür (12). Gür ve arkadaşlarının 2020'de yayımlanan çalışmalarında kinolon direnci %1 olarak raporlanmıştır (159). SOAR 2011-2013 çalışmasında levofloksasin duyarlılığı %96 olarak bildirilmiştir (162). Ülkemizde yapılan diğer çeşitli çalışmalarda kinolon direnci siprofloksasin için %2.8-21, ofloksasin için %6.8-7 olarak bildirilmiştir (89). Yapılan bazı çalışmalarda solunum yolu enfeksiyonuna neden olan, yüksek prevalansta mutasyon geliştiren *H. influenzae* izolatları bildirilmiştir (138, 176). Vazquez ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada hipermutabilitenin *H. influenzae* izolatlarında florokinolon direnç gelişimi için riskli duruma neden olduğu bildirilmiş, kronik solunum yolu enfeksiyonlarında ise hipermutabil izolatların sık olduğuna dikkat çekilmiştir (138, 177). 2010 yılında Japonya'da tosufloksasinin pediatrik hasta grubunda kullanımı için onay alması, solunum yolu patojenleri arasında artan beta-laktam direnci nedeniyle bu grup ilaçların ampirik tedavide kullanımını arttırmış ve bazı Asya ülkelerinde kinolon direncinde artış raporlanmıştır (178). Çalışmamızdaki kinolon direncinin bu ilaç grubunun ampirik kullanımının artışına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda tetrasiklin direnç oranı %16,66 olarak saptanmıştır. Tetrasiklinin dünyadaki duyarlılık durumu farklılık göstermektedir. Morrissey ve arkadaşlarının Birleşik Krallık ve İrlanda'da 1999-2007 yılları arasında yaptıkları çalışmada tetrasiklin direnci %2,1 olarak bildirilmiştir (179). Yunanistan'da yapılan çalışmada 2009'da %7,6 olan tetrasiklin direnci 2012'de %8,5 olarak bildirilmiştir (180). Ülkemizde yapılan çalışmalarda da direnç

oranlarında farklılıklar gözlenmiştir. Torun ve arkadaşlarının 2003-2004'te yaptıkları çalışmada tetrasiklin direnci %2,4 olarak bildirilmiştir (77). Şener ve arkadaşlarının 2004-2005 yıllarında beş farklı ilden toplanan izolatlar ile yaptıkları çalışmada tetrasiklin direnç oranı %22 olarak raporlanmıştır (181). SOAR 2002-2009 Türkiye çalışmasında tetrasiklin direnci 2004-2005 yıllarında %22, 2007-2009 yıllarında ise %31,1 olarak raporlanmıştır (182). Kuvat ve arkadaşlarının 2009-2011 yıllarında yaptıkları çalışmalarında tetrasiklin direnci % 15 olarak bildirilmiştir (173). Verilerimiz ülkemizde yapılan çalışmalarla uyumlu olarak değerlendirilmiştir.



8. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda bir buçuk yıllık süreçte AÜTF İbni Sina Eğitim ve Araştırma Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen alt solunum yolu örneklerinin kültürlerinde üreyen 84 adet *H.influenzae* izolatının antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemiyle incelenmiştir. İmipenem ve meropenem duyarlılık sonuçları disk difüzyon ve gradiyent şerit test yöntemiyle de değerlendirilerek referans yöntem olan sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile uyumunun incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızda izolatların yarısından fazlası 50 yaş ve üzeri hastalardan izole edilmiştir, çocuk yaş grubuna ait izolat bulunmamaktadır. En sık gözlenen fenotip % 45,23 ile BLNAS olmuştur.

Çalışmamızda disk difüzyon yöntemi ile imipenem, meropenem ve sefotaksim direnci saptanmamıştır. En yüksek direnç % 54,76 ile ampisilinde görülmüştür. En düşük direnç %13,09 ile kinolon grubu antibiyotiklerde görülmüştür.

Çalışmamızda sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile iki karbapeneme de direnç tespit edilmemekle birlikte, gradiyent şerit testi ile 25 izolat imipeneme dirençli bulunmuştur. Önceki çalışmalarla uyumlu şekilde çalışmamızda sıvı mikrodilüsyon yönteminin *H.influenzae* izolatlarının karbapenem duyarlılığının belirlenmesinde özellikle de imipenem duyarlılığı açısından öneme sahip olduğu tespit edilmiştir. İmipenem ve meropenem için disk difüzyon yönteminin sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle uyumu göz önüne alındığında disk difüzyon yöntemi rutin laboratuvar uygulamaları açısından önemini korumaktadır.

Çalışmamızda; incelenen izolatların invaziv izolatlar olmaması, bakterilerin tiplendirilmemesi, direnç mekanizmasını aydınlatmak için moleküler yöntemlerin kullanılmaması kısıtlılıklarımız olarak belirlenmiştir. Bu konuların aydınlatılması için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

H. influenzae izolatları için beta-laktamaz üretimi ve PBP3 değişiminde temel direnç mekanizmasıdır. BLNAR fenotipi dünya genelinde yaygınlaşmaya başlamış ve endişe kaynağı haline gelmektedir. BLNAR izolatlarında özellikle beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı direnç artışı olabilmektedir, bu durum da karbapenem direncinin yaygınlaşması konusunda endişe vericidir.

Gereksiz ve uygunsuz antibiyotik kullanımının da dirençli izolatların seçilmesine neden olabileceği düşünüldüğünde akılcı antibiyotik kullanımına önem verilmelidir. Heterodirençli izolatların görülmesi, dirençli izolatların ortaya çıkışı açısından uyarıcı olabilir. *H.influenzae* izolatlarında direnç oranlarının ve mekanizmalarının ortaya konulabilmesi açısından sürveyans çalışmalarının yapılması önem taşımaktadır. Bu enfeksiyonlardan sorumlu izolatların antimikrobiyal direnç özelliklerinin ortaya konması ve klonlarının yayılımlarının gösterilmesi; tedavi seçeneklerinin belirlenmesine, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin etkin bir şekilde uygulanmasına ışık tutabilecektir.



9. KAYNAKLAR

1. Sondergaard A, San Millan A, Santos-Lopez A, Nielsen SM, Gonzalez-Zorn B, Nørskov-Lauritsen N. Molecular organization of small plasmids bearing blaTEM-1 and conferring resistance to beta-lactams in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(9):4958-60.
2. Turk DC. The pathogenicity of *Haemophilus influenzae*. *J Med Microbiol*. 1984;18(1):1-16.
3. Campos J, Roman F, Perez-Vazquez M, Aracil B, Oteo J, Cercenado E, et al. Antibiotic resistance and clinical significance of *Haemophilus influenzae* type f. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52(6):961-6.
4. Schuchat A, Robinson K, Wenger JD, Harrison LH, Farley M, Reingold AL, et al. Bacterial meningitis in the United States in 1995. *New England journal of medicine*. 1997;337(14):970-6.
5. <https://www.cdc.gov/mmwr> cg. Progress toward elimination of *Haemophilus influenzae* type b invasive disease among infants and children--United States, 1998-2000. *MMWR Morbidity and mortality weekly report [Internet]*. 2002; 51(11):[234-7 pp.].
6. Falla T, Crook D, Brophy L, Maskell D, Kroll J, Moxon E. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. *Journal of clinical microbiology*. 1994;32(10):2382-6.
7. Adams WG, Deaver KA, Cochi SL, Plikaytis BD, Zell ER, Broome CV, et al. Decline of childhood *Haemophilus influenzae* type b (Hib) disease in the Hib vaccine era. *Jama*. 1993;269(2):221-6.
8. Eskola J, Peltola H, Käyhty H, Takala A, Mäkelä P. Finnish efficacy trials with *Haemophilus influenzae* type b vaccines. *Journal of infectious Diseases*. 1992;165(Supplement_1):S137-S13.
9. Bajanca P, Caniça M. Emergence of nonencapsulated and encapsulated non-b-type invasive *Haemophilus influenzae* isolates in Portugal (1989-2001). *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(2):807-10.
10. Giufrè M, Cardines R, Caporali MG, Accogli M, D'Ancona F, Cerquetti M. Ten years of Hib vaccination in Italy: prevalence of non-encapsulated *Haemophilus influenzae* among invasive isolates and the possible impact on antibiotic resistance. *Vaccine*. 2011;29(22):3857-62.

11. Lam TT, Claus H, Elias J, Frosch M, Vogel U. Ampicillin resistance of invasive *Haemophilus influenzae* isolates in Germany 2009-2012. *Int J Med Microbiol.* 2015;305(7):748-55.
12. Tristram S, Jacobs MR, Appelbaum PC. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clinical microbiology reviews.* 2007;20(2):368-89.
13. Rennie RP, Ibrahim KH. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*: how can we prevent the inevitable? Commentary on antimicrobial resistance in *H. influenzae* based on data from the TARGETed surveillance program. *Clin Infect Dis.* 2005;41 Suppl 4:S234-8.
14. Cherkaoui A, Diene S, Emonet S, Renzi G, Francois P, Schrenzel J. Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* isolates in Geneva: serotype, antimicrobial susceptibility, and β -lactam resistance mechanisms. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.* 2015;34(10):1937-45.
15. Shiro H, Sato Y, Toyonaga Y, Hanaki H, Sunakawa K. Nationwide survey of the development of drug resistance in the pediatric field in 2000–2001, 2004, 2007, 2010, and 2012: evaluation of the changes in drug sensitivity of *Haemophilus influenzae* and patients' background factors. *Journal of Infection and Chemotherapy.* 2015;21(4):247-56.
16. Garcia-Cobos S, Arroyo M, Perez-Vazquez M, Aracil B, Lara N, Oteo J, et al. Isolates of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* causing invasive infections in Spain remain susceptible to cefotaxime and imipenem. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(1):111-6.
17. L  m T-T, N  rnberg S, Claus H, Vogel U. Molecular epidemiology of imipenem resistance in invasive *Haemophilus influenzae* infections in Germany in 2016. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2020;75(8):2076-86.
18. Kitaoka K, Kimura K, Kitanaka H, Banno H, Jin W, Wachino JI, et al. Carbapenem-Nonsusceptible *Haemophilus influenzae* with Penicillin-Binding Protein 3 Containing an Amino Acid Insertion. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(8).
19. Harrison L, Da Silva G, Pittman M, Fleming D, Vranjac A, Broome C. Epidemiology and clinical spectrum of Brazilian purpuric fever. Brazilian Purpuric Fever Study Group. *Journal of clinical microbiology.* 1989;27(4):599-604.
20. Pfeiffer R. I.—Preliminary Communication on the Exciting causes of Influenza. *British medical journal.* 1892;1(1620):128.
21. Pfeiffer R. Die   tiologie der Influenza. *Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh Bd.* 1893;13:357.

22. Townsend JF. History of influenza epidemics. *Annals of Medical History*. 1933;5(6):533.
23. Oliver SE, Moro P, Blain AE. *Haemophilus influenzae*. *Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases The Pink Book: Course Textbook*, 14th ed, Hall E, Wodi AP, Hamborsky J, et al (Eds) Public Health Foundation, Washington, DC. 2021.
24. Thjötta T, Avery O. Studies on bacterial nutrition: Growth accessory substances in the cultivation of hemophilic bacilli. *The Journal of Experimental Medicine*. 1921;34(1):97-114.
25. Pittman M. Variation and type specificity in the bacterial species *Hemophilus influenzae*. *Journal of Experimental Medicine*. 1931;53(4):471-92.
26. Pichichero M, Hall C, Insel R. A mucosal antibody response following systemic *Haemophilus influenzae* type B infection in children. *The Journal of Clinical Investigation*. 1981;67(5):1482-9.
27. Alexander HE, Heidelberger M, Leidy G. The protective or curative element in type b *H. influenzae* rabbit serum. *The Yale journal of biology and medicine*. 1944;16(5):425.
28. Anderson P, Peter G, Johnston RB, Wetterlow LH, Smith DH. Immunization of humans with polyribophosphate, the capsular antigen of *Hemophilus influenzae*, type b. *The Journal of clinical investigation*. 1972;51(1):39-44.
29. Schneerson R, Rodrigues LP, Parke Jr J, Robbins JB. Immunity to Disease Caused by *Hemophilus Influenzae* Type b: II. Specificity and Some Biologic Characteristics of "Natural," Infection-Acquired, and Immunization-Induced Antibodies to the Capsular Polysaccharide of *Hemophilus Influenzae* Type b. *The Journal of Immunology*. 1971;107(4):1081-9.
30. Peltola H, Käythy H, Sivonen A, Mäkelä PH. *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide vaccine in children: a double-blind field study of 100,000 vaccinees 3 months to 5 years of age in Finland. *Pediatrics*. 1977;60(5):730-7.
31. Centers for Disease Control and Prevention. *Epidemiology and prevention of vaccine-preventable diseases* <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/index.html>
32. Gilsdorf JR. Hib Vaccines: Their Impact on *Haemophilus influenzae* Type b Disease. *The Journal of infectious diseases*. 2021;224(Supplement_4):S321-S30.
33. Kilian M. A taxonomic study of the genus *Haemophilus*, with the proposal of a new species. *Microbiology*. 1976;93(1):9-62.
34. Gratten M. *Haemophilus influenzae* biotype VII. *Journal of clinical microbiology*. 1983;18(4):1015-6.

35. Sottnek F, Albritton W. *Haemophilus influenzae* biotype VIII. Journal of clinical microbiology. 1984;20(4):815-6.
36. Pohl S. Reklassifizierung der Gattung *Actinobacillus* Brumpt 1910, *Haemophilus* Winslow et. al. 1917 und *Pasteurella* Trevisan 1887 anhand phänotypischer und molekularer Daten, insbesondere der DNS-Verwandtschaften bei DNS: DNS-Hybridisierung [DNS-DNS-Hybridisierung] in vitro und Vorschlag einer neuen Familie, Pasteurellaceae 1979.
37. Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. Science. 1995;269(5223):496-512.
38. Daines DA, Cohn LA, Coleman HN, Kim KS, Smith AL. *Haemophilus influenzae* Rd KW20 has virulence properties. Journal of medical microbiology. 2003;52(4):277-82.
39. Naushad S, Adeolu M, Goel N, Khadka B, Al-Dahwi A, Gupta RS. Phylogenomic and molecular demarcation of the core members of the polyphyletic Pasteurellaceae genera *Actinobacillus*, *Haemophilus*, and *Pasteurella*. International journal of genomics. 2015;2015.
40. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology Türkçe çeviri. 7. baskı ed. Başustaoglu A, Us D, editors. Ankara: Wolters Kluwer, Hipokrat Yayınevi; 2017. 472-595 p.
41. Christensen H, Kuhnert P, Busse H-J, Frederiksen WC, Bisgaard M. Proposed minimal standards for the description of genera, species and subspecies of the Pasteurellaceae. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2007;57(1):166-78.
42. Dewhirst FE, Paster BJ, Olsen I, Fraser GJ. Phylogeny of 54 representative strains of species in the family Pasteurellaceae as determined by comparison of 16S rRNA sequences. Journal of bacteriology. 1992;174(6):2002-13.
43. Nørskov-Lauritsen N, Bruun B, Andersen C, Kilian M. Identification of haemolytic *Haemophilus* species isolated from human clinical specimens and description of *Haemophilus sputorum* sp. nov. International Journal of Medical Microbiology. 2012;302(2):78-83.
44. Nørskov-Lauritsen N. Classification, identification, and clinical significance of *Haemophilus* and *Aggregatibacter* species with host specificity for humans. Clinical microbiology reviews. 2014;27(2):214-40.
45. Nørskov-Lauritsen N. Detection of cryptic genospecies misidentified as *Haemophilus influenzae* in routine clinical samples by assessment of marker genes *fucK*, *hap*, and *sodC*. Journal of clinical microbiology. 2009;47(8):2590-2.

46. Cattoir V, Lemenand O, Avril J-L, Gaillot O. The *sodA* gene as a target for phylogenetic dissection of the genus *Haemophilus* and accurate identification of human clinical isolates. *International journal of medical microbiology*. 2006;296(8):531-40.
47. Nørskov-Lauritsen N, Overballe MD, Kilian M. Delineation of the species *Haemophilus influenzae* by phenotype, multilocus sequence phylogeny, and detection of marker genes. *Journal of bacteriology*. 2009;191(3):822-31.
48. Ledebøer NA, Doern GV. *Manual of Clinical Microbiology*. 11th ed. Michael A. Phaller MA, Jorgensen JH, Carroll KC, Funke G, editors. Canada: ASM Press; 2015. 667-84 p.
49. Flesher AR, Insel RA. Characterization of lipopolysaccharide of *Haemophilus influenzae*. *Journal of Infectious Diseases*. 1978;138(6):719-30.
50. Lehman DC. *Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th ed. Mahon CR, Lehman DC, editors. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2019. 949-92 p.
51. Murray PR, Rosenthal KS. *Medical Microbiology- Tıbbi Mikrobiyoloji*. 6th ed. Başustaoğlu AC, editor. Philadelphia-Ankara: Mosby Elsevier-Atlas Yayıncılık 2010. 343-50 p.
52. Mahoon CR, DC. L. *Textbook of Diagnostik Microbiology*. Sixth ed. St. louis, Missouri: Elsevier Saunder; 2019. 948-69 p.
53. Parija S. *Textbook of Microbiology and Immunology*. 2 ed. Bhattacharya SM, editor. India: Elsevier; 2012. 321-30 p.
54. Chapin K, Doern G. Selective media for recovery of *Haemophilus influenzae* from specimens contaminated with upper respiratory tract microbial flora. *Journal of Clinical Microbiology*. 1983;17(6):1163-5.
55. Fleming W, Fierer J. Nitrate reduction: new method for testing the antibiotic susceptibility of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1978;13(5):791-5.
56. Gilsdorf JR. Antigenic diversity and gene polymorphisms in *Haemophilus influenzae*. *Infection and immunity*. 1998;66(11):5053-9.
57. Musser JM, Barenkamp SJ, Granoff D, Selander R. Genetic relationships of serologically nontypable and serotype b strains of *Haemophilus influenzae*. *Infection and immunity*. 1986;52(1):183-91.
58. Gibson BW, Melaugh W, Phillips NJ, Apicella MA, Campagnari AA, Griffiss J. Investigation of the structural heterogeneity of lipooligosaccharides from pathogenic *Haemophilus* and *Neisseria* species and of R-type lipopolysaccharides from *Salmonella typhimurium* by electrospray mass spectrometry. *Journal of bacteriology*. 1993;175(9):2702-12.

59. Campagnari AA, Gupta M, Dudas K, Murphy T, Apicella M. Antigenic diversity of lipooligosaccharides of nontypable *Haemophilus influenzae*. *Infection and immunity*. 1987;55(4):882-7.
60. Apicella MA, Dudas KC, Campagnari A, Rice P, Mylotte J, Murphy T. Antigenic heterogeneity of lipid A of *Haemophilus influenzae*. *Infection and immunity*. 1985;50(1):9-14.
61. Fournier C, Smith A, Delepelaire P. Haem release from haemopexin by HxuA allows *Haemophilus influenzae* to escape host nutritional immunity. *Molecular microbiology*. 2011;80(1):133-48.
62. Sam I, Smith M. Failure to detect capsule gene *bexA* in *Haemophilus influenzae* types e and f by real-time PCR due to sequence variation within probe binding sites. *Journal of medical microbiology*. 2005;54(5):453-5.
63. Brunham RC, Plummer FA, Stephens RS. Bacterial antigenic variation, host immune response, and pathogen-host coevolution. *Infection and immunity*. 1993;61(6):2273-6.
64. Ishiwada N, Cao L, Kohno Y. PCR-based capsular serotype determination of *Haemophilus influenzae* strains recovered from Japanese paediatric patients with invasive infection. *Clinical microbiology and infection*. 2004;10(10):895-8.
65. LaClaire LL, Tondella MLC, Beall DS, Noble CA, Raghunathan PL, Rosenstein NE, et al. Identification of *Haemophilus influenzae* serotypes by standard slide agglutination serotyping and PCR-based capsule typing. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(1):393-6.
66. Harper JJ, Tilse MH. Biotypes of *Haemophilus influenzae* that are associated with noninvasive infections. *Journal of clinical microbiology*. 1991;29(11):2539-42.
67. Oberhofer TR, Back AE. Biotypes of *Haemophilus* encountered in clinical laboratories. *Journal of Clinical Microbiology*. 1979;10(2):168-74.
68. Albritton W, Penner S, Slaney L, Brunton J. Biochemical characteristics of *Haemophilus influenzae* in relationship to source of isolation and antibiotic resistance. *Journal of clinical microbiology*. 1978;7(6):519-23.
69. Yeh S, Torchia MM. Epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, and treatment of *Haemophilus influenzae*. UpToDate [Internet]. 2019.
70. Figueroa J, Densen P. Infectious diseases associated with complement deficiencies. *Clinical microbiology reviews*. 1991;4(3):359-95.

71. King PT, Ngui J, Gunawardena D, Holmes PW, Farmer M, Holdsworth SR. Systemic humoral immunity to non-typeable *Haemophilus influenzae*. *Clinical & Experimental Immunology*. 2008;153(3):376-84.
72. Peltola H. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clinical microbiology reviews*. 2000;13(2):302-17.
73. Adderson EE, Byington CL, Spencer L, Kimball A, Hindiyyeh M, Carroll K, et al. Invasive serotype a *Haemophilus influenzae* infections with a virulence genotype resembling *Haemophilus influenzae* type b: emerging pathogen in the vaccine era? *Pediatrics*. 2001;108(1):e18-e.
74. Briere EC, Rubin L, Moro PL, Cohn A, Clark T, Messonnier N. Prevention and control of *haemophilus influenzae* type b disease: recommendations of the advisory committee on immunization practices (ACIP). *Morbidity and Mortality Weekly Report: Recommendations and Reports*. 2014;63(1):1-14.
75. Makela PH, Takala AK, Peltola H, Eskola J. Epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. *Journal of infectious Diseases*. 1992;165(Supplement_1):S2-S6.
76. Takala AK, Clements DA. Socioeconomic risk factors for invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. *Journal of Infectious Diseases*. 1992;165(Supplement_1):S11-S5.
77. Torun MM, Namal N, Demirci M, Bahar H, Kocazeybek B. Pharyngeal carriage and antimicrobial resistance of *Haemophilus influenzae* in non-type-b-vaccinated healthy children attending day care centers in Turkey. *Chemotherapy*. 2007;53(2):114-7.
78. Howard A, Dunkin K, Millar G. Nasopharyngeal carriage and antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae* in healthy children. *Epidemiology & Infection*. 1988;100(2):193-203.
79. Soeters HM, Blain A, Pondo T, Doman B, Farley MM, Harrison LH, et al. Current epidemiology and trends in invasive *Haemophilus influenzae* disease—United States, 2009–2015. *Clinical Infectious Diseases*. 2018;67(6):881-9.
80. Turk D. An investigation of the family background of acute *haemophilus* infections of children. *Epidemiology & Infection*. 1975;75(2):315-32.
81. Turk D. Naso-pharyngeal carriage of *Haemophilus influenzae* type b. *Epidemiology & Infection*. 1963;61(2):247-56.

82. Morris SK, Moss WJ, Halsey N. Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine use and effectiveness. The Lancet infectious diseases. 2008;8(7):435-43.
83. Li KI, Dashefsky B, Wald ER. Haemophilus influenzae type b colonization in household contacts of infected and colonized children enrolled in day care. Pediatrics. 1986;78(1):15-20.
84. Centers for Disease Control and Prevention. 2018. Active Bacterial Core Surveillance Report, Emerging Infections Program Network, Haemophilus influenza 2018. Available via the internet: <http://www.cdc.gov/abcs/reports-findings/survreports/hi18.pdf>.
85. MacNeil JR, Cohn AC, Farley M, Mair R, Baumbach J, Bennett N, et al. Current epidemiology and trends in invasive Haemophilus influenzae disease—United States, 1989–2008. Clinical infectious diseases. 2011;53(12):1230-6.
86. Blain A, MacNeil J, Wang X, Bennett N, Farley MM, Harrison LH, et al., editors. Invasive Haemophilus influenzae disease in adults $\geq$ 65 years, United States, 2011. Open forum infectious diseases; 2014: Oxford University Press.
87. European Centre for Disease Prevention and Control. Haemophilus influenzae. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2018. Stockholm: ECDC; 2020. Available in: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/haemophilus-influenzae-annual-epidemiological-report-2018>
88. Vahaboğlu M, Mülazimoğlu L, Yıldırım İ, Avkan V, Taşer B. Nasopharyngeal carriage rate and antimicrobial resistance of haemophilus influenzae in İstanbul-Türkiye. Marmara Medical Journal. 1994;7(2):78-80.
89. Berkiten R. Türkiye'de Haemophilus influenzae: Beta-laktamaz pozitifliği ve antibiyotiklere direnç (1987-2002). Ankem Derg. 2004;18(1):53-60.
90. Aktepe OC, Özçelik U, Çöplü N, Uluutku S, Kiper N, Göçmen A. Kistik fibrosis olgularında Haemophilus influenzae: Bir alt solunum yolu enfeksiyonu etkeni. Flora. 2000;5(1):44-8.
91. Koçak A, Yayla B, Güçlü A, Mirza H, İştär E, Alışkan H, et al. Adana'da bir üniversite hastanesinde izole edilen solunum yolu patojenleri ve antibiyotik direnç profillerinin değerlendirilmesi. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi. 2019;49(4):226-32.
92. Shin H, Kim G, Han SB, Jeong DC, Kang JH. Recurrent Meningitis Caused by β -Lactamase-Positive Amoxicillin/Clavulanate-Resistant Non-Typeable Haemophilus influenzae in a Child with an Inner Ear Malformation: A Case Report. Infection & Chemotherapy. 2021;53(4):808.
93. Kim KS. Acute bacterial meningitis in infants and children. The Lancet infectious diseases. 2010;10(1):32-42.

94. Center for Disease control and Prevention. Progress toward elimination of Haemophilus influenzae type b disease among infants and children-United States, 1998-2000. MMWR Weekly Report March 22,2002/51:234-237)
<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5111a4.htm>
95. Guardiani E, Bliss M, Harley E. Supraglottitis in the era following widespread immunization against Haemophilus influenzae type B: evolving principles in diagnosis and management. The Laryngoscope. 2010;120(11):2183-8.
96. Wagle A, Jones R. Acute epiglottitis despite vaccination with Haemophilus influenzae type B vaccine. Pediatric Anesthesia. 1999;9(6):549-50.
97. Shah RK, Roberson DW, Jones DT. Epiglottitis in the Hemophilus influenzae type B vaccine era: changing trends. The Laryngoscope. 2004;114(3):557-60.
98. Cordero E, Pachón J, Rivero A, Girón JA, Gómez-Mateos J, Merino MD, et al. Haemophilus influenzae pneumonia in human immunodeficiency virus-infected patients. Clinical infectious diseases. 2000;30(3):461-5.
99. Shoar S, Centeno FH, Musher DM, editors. Clinical features and outcomes of community-acquired pneumonia caused by haemophilus influenzae. Open Forum Infectious Diseases; 2021: Oxford University Press US.
100. Hacımustafaoğlu M. İnvaziv H. influenzae tip b enfeksiyonları; klinik ve tedavi. Güncel Pediatri.2(3):112-5.
101. Murphy TF, Faden H, Bakaletz LO, Kyd JM, Forsgren A, Campos J, et al. Nontypeable Haemophilus influenzae as a pathogen in children. The Pediatric infectious disease journal. 2009;28(1):43-8.
102. Murphy T, Sethi S. Chronic obstructive pulmonary disease-Role of bacteria and guide to antibacterial selection in the older patient. Drugs & aging. 2002;19(10):761-75.
103. Murphy TF, Brauer AL, Schiffmacher AT, Sethi S. Persistent colonization by Haemophilus influenzae in chronic obstructive pulmonary disease. American journal of respiratory and critical care medicine. 2004;170(3):266-72.
104. Albritton WL, Hammond GW, Ronald AR. Bacteremic Haemophilus influenzae genitourinary tract infections in adults. Archives of Internal Medicine. 1978;138(12):1819-21.
105. Van Dcynse E, Vermijlen P, Van Noyen G, Van Noyen R. Neonatal sepsis due to nonencapsulated Haemophilus influenzae biotype IV. Acta Clinica Belgica. 1997;52(4):204-6.

106. Aydın D, Ağaçfıdan A, Güvener Z, Kadioğlu A, Ang Ö. Bacterial Pathogens in Male Patients With Urethritis in İstanbul. *Sexually Transmitted Diseases*. 1998;25(8):448-9.
107. Ambler D, Diamond MP, Malone Jr J. *Haemophilus influenzae* abscess: inclusion in the differential diagnosis of a large pelvic mass? *Journal of Minimally Invasive Gynecology*. 2010;17(1):104-6.
108. Matsubayashi T, Tobayama S, Machida H. Acute cholecystitis caused by *Haemophilus influenzae* in a child. *Journal of infection and chemotherapy*. 2009;15(5):325-7.
109. Oksuz S, Ozturk E, Sahin I, Ertor O, Kaya D. Biliary infection and bacteremia caused by beta-lactamase-positive, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* in a diabetic patient. *Jpn J Infect Dis*. 2005;58(1):34-5.
110. Purdy D, Khardori N, Abbas F, Khardori R. Postoperative pancreatic abscess due to *Haemophilus influenzae*. *Clinical infectious diseases*. 1993;949-51.
111. Darras-Joly C, Lortholary O, Mainardi J-L, Etienne J, Guillevin L, Acar J. *Haemophilus* endocarditis: report of 42 cases in adults and review. *Clinical infectious diseases*. 1997;24(6):1087-94.
112. Lewis D. Chancroid: clinical manifestations, diagnosis, and management. *Sexually transmitted infections*. 2003;79(1):68-71.
113. Garcia-Cobos S, Campos J, Lazaro E, Roman F, Cercenado E, Garcia-Rey C, et al. Ampicillin-resistant non-beta-lactamase-producing *Haemophilus influenzae* in Spain: recent emergence of clonal isolates with increased resistance to cefotaxime and cefixime. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51(7):2564-73.
114. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Sistemlere Göre Enfeksiyonlar 3. Baskı, İstanbul: Nobet Tıp Kitabevleri. 2008.
115. Heesemann J. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. *Infection*. 1993;21:S4-9.
116. Kaczmarek FS, Gootz TD, Dib-Hajj F, Shang W, Hallowell S, Cronan M. Genetic and molecular characterization of β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* with unusually high resistance to ampicillin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004;48(5):1630-9.
117. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(3):969-76.

118. Dabernat H, Delmas C, Seguy M, Pelissier R, Faucon G, Bennamani S, et al. Diversity of β -lactam resistance-conferring amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002;46(7):2208-18.
119. Karlowsky JA, Verma G, Zhanel GG, Hoban DJ. Presence of ROB-1 β -lactamase correlates with cefaclor resistance among recent isolates of *Haemophilus influenzae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2000;45(6):871-5.
120. Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical microbiology reviews*. 1995;8(4):557-84.
121. Llanes R, González M, Martínez I, Sosa J, Guzmán D, Gutiérrez O, et al. Evaluation of four methods for detecting the beta-lactamase activity in *Neisseria gonorrhoeae* isolated in Cuba. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2003;98:1089-91.
122. 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*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(6):1693-9.
123. Thornsberry C, Kirven LA. Ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae* as determined by a rapid test for beta-lactamase production. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1974;6(5):653-4.
124. Markowitz S. Isolation of an ampicillin-resistant, non-beta-lactamase-producing strain of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1980;17(1):80-3.
125. Parr Jr TR, Bryan L. Mechanism of resistance of an ampicillin-resistant, beta-lactamase-negative clinical isolate of *Haemophilus influenzae* type b to beta-lactam antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1984;25(6):747-53.
126. Miyazaki S, Fujikawa T, Kanazawa K, Yamaguchi K. In vitro and in vivo activities of meropenem and comparable antimicrobial agents against *Haemophilus influenzae*, including β -lactamase-negative ampicillin-resistant strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001;48(5):723-6.
127. Hasegawa K, Yamamoto K, Chiba N, Kobayashi R, Nagai K, Jacobs MR, et al. Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. *Microbial Drug Resistance*. 2003;9(1):39-46.
128. Matic V, Bozdogan B, Jacobs MR, Ubukata K, Appelbaum PC. Contribution of β -lactamase and PBP amino acid substitutions to amoxicillin/clavulanate resistance in β -lactamase-

- positive, amoxicillin/clavulanate-resistant *Haemophilus influenzae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003;52(6):1018-21.
129. Honda H, Sato T, Shinagawa M, Fukushima Y, Nakajima C, Suzuki Y, et al. Multiclonal expansion and high prevalence of β -lactamase-negative *Haemophilus influenzae* with high-level ampicillin resistance in Japan and susceptibility to quinolones. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2018;62(9):e00851-18.
130. García-Cobos S, Campos J, Lázaro E, Román F, Cercenado E, García-Rey C, et al. Ampicillin-resistant non- β -lactamase-producing *Haemophilus influenzae* in Spain: recent emergence of clonal isolates with increased resistance to cefotaxime and cefixime. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(7):2564-73.
131. Thegerström J, Matuschek E, Su Y-C, Riesbeck K, Resman F. A novel PBP3 substitution in *Haemophilus influenzae* confers reduced aminopenicillin susceptibility. *BMC microbiology*. 2018;18(1):1-7.
132. Zgurskaya HI, Nikaido H. Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Molecular microbiology*. 2000;37(2):219-25.
133. Sanchez L, Pan W, Vinas M, Nikaido H. The *acrAB* homolog of *Haemophilus influenzae* codes for a functional multidrug efflux pump. *Journal of bacteriology*. 1997;179(21):6855-7.
134. Chopra I, Roberts M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and molecular biology reviews*. 2001;65(2):232-60.
135. Peric M, Bozdogan BI, Jacobs MR, Appelbaum PC. Effects of an efflux mechanism and ribosomal mutations on macrolide susceptibility of *Haemophilus influenzae* clinical isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003;47(3):1017-22.
136. Van Bambeke F, Michot J-M, Van Eldere J, Tulkens PM. Quinolones in 2005: an update. *Clinical Microbiology and infection*. 2005;11(4):256-80.
137. Yokota S-i, Ohkoshi Y, Sato K, Fujii N. Emergence of fluoroquinolone-resistant *Haemophilus influenzae* strains among elderly patients but not among children. *Journal of clinical microbiology*. 2008;46(1):361-5.
138. Pérez-Vázquez M, Román F, García-Cobos S, Campos J. Fluoroquinolone resistance in *Haemophilus influenzae* is associated with hypermutability. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(4):1566-9.

139. Jacoby GA. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clinical infectious diseases*. 2005;41(Supplement_2):S120-S6.
140. Enne VI, King A, Livermore DM, Hall LM. Sulfonamide resistance in *Haemophilus influenzae* mediated by acquisition of *sul2* or a short insertion in chromosomal *folP*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002;46(6):1934-9.
141. Sköld O. Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Veterinary research*. 2001;32(3-4):261-73.
142. Saran B, Karahan ZC. Antimikrobiyal ajanlara genel bakış. *Türk Urol Sem*. 2010;1:216-20.
143. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0, 2023. <http://www.eucast.org>.
144. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing Version 11.0 (January 2023) www.eucast.org.
145. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Media for MIC determination by the broth microdilution method. Versio 7. (January 2022) www.eucast.org.
146. CLSI 30th Edition M 100 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Table 6A Solvents and diluents for preparing stock solutions of antimicrobial agents M07 p: 202.
147. International Organization for Standardization (ISO). ISO 20776-2:2007 Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems — Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices — Part 2: Evaluation of antimicrobial susceptibility test devices. Technical Committee ISO/TC 212, 2007.
148. Fadlyana E, Dunne EM, Rusmil K, Tarigan R, Sudigdoadi S, Murad C, et al. Risk factors associated with nasopharyngeal carriage and density of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, and *Staphylococcus aureus* in young children living in Indonesia. *Pneumonia*. 2018;10(1):1-14.
149. DeMuri GP, Gern JE, Eickhoff JC, Lynch SV, Wald ER. Dynamics of bacterial colonization with *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* during symptomatic and asymptomatic viral upper respiratory tract infection. *Clinical Infectious Diseases*. 2018;66(7):1045-53.
150. Puig C, Calatayud L, Marti S, Tubau F, Garcia-Vidal C, Carratala J, et al. Molecular epidemiology of nontypeable *Haemophilus influenzae* causing community-acquired pneumonia in adults. *PloS one*. 2013;8(12):e82515.

151. Wen S, Mai Y, Chen X, Xiao K, Lin Y, Xu Z, et al. Molecular Epidemiology and Antibiotic Resistance Analysis of Non-Typeable *Haemophilus influenzae* (NTHi) in Guangzhou: A Representative City of Southern China. *Antibiotics*. 2023;12(4):656.
152. Fluit A, Florijn A, Verhoef J, Milatovic D. Susceptibility of European β -lactamase-positive and-negative *Haemophilus influenzae* isolates from the periods 1997/1998 and 2002/2003. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005;56(1):133-8.
153. Jansen W, Verel A, Beitsma M, Verhoef J, Milatovic D. Surveillance study of the susceptibility of *Haemophilus influenzae* to various antibacterial agents in Europe and Canada. *Current medical research and opinion*. 2008;24(10):2853-61.
154. Park C, Kim K-H, Shin N-Y, Byun J-H, Kwon E-Y, Lee J-W, et al. Genetic diversity of the *ftsI* gene in β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant and β -lactamase-producing amoxicillin-/clavulanic acid-resistant nasopharyngeal *Haemophilus influenzae* strains isolated from children in South Korea. *Microbial Drug Resistance*. 2013;19(3):224-30.
155. Deghmane A-E, Hong E, Chehboub S, Terrade A, Falguières M, Sort M, et al. High diversity of invasive *Haemophilus influenzae* isolates in France and the emergence of resistance to third generation cephalosporins by alteration of *ftsI* gene. *Journal of Infection*. 2019;79(1):7-14.
156. Ubukata K, Chiba N, Morozumi M, Iwata S, Sunakawa K, Meningitis WGoNSfB. Longitudinal surveillance of *Haemophilus influenzae* isolates from pediatric patients with meningitis throughout Japan, 2000–2011. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2013;19(1):34-41.
157. Potts C, Rodriguez-Rivera L, Retchless A, Buono S, Chen A, Marjuki H, et al. Antimicrobial susceptibility survey of invasive *Haemophilus influenzae* in the United States in 2016. *Microbiology Spectrum*. 2022;10(3):e02579-21.
158. Özkul H, Özbek Ö, Çoban H, Gülay Z. Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesinde 2003-2006 yıllarında üretilen *Haemophilus influenzae* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *Ankem Derg*. 2007;21(2):86-90.
159. Gür H, Hazirolan G. *Haemophilus influenzae* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılık Profillerinin ve Beta-Laktamaz Aktivitesinin Araştırılması. *Ankem Derg*. 2020;34(1):18-24.
160. Budak F, Ocak Z, Gür D. Prevalence and genotypic characteristics of beta-lactamase negative ampicillin resistant *Haemophilus influenzae* in a children's hospital in Turkey/Türkiye'de bir

- çocuk hastanesinde beta-laktamaz negatif ampisilin dirençli *Haemophilus influenzae*'lerin prevalansı ve genotipik özellikleri. Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi. 2016;36(2):86.
161. Alışkan H, Çolakoğlu Ş, Göçmen JS. Solunum yolu örneklerinden izole edilen streptococcus pneumoniae ve haemophilus influenzae suşlarının antibiyotiklere dirençlerinin belirlenmesi. Cukurova Med J. 2016;41(2):201-20.
162. Soyletir G, Altinkanat G, Gur D, Altun B, Tunger A, Aydemir S, et al. Results from the survey of antibiotic resistance (SOAR) 2011–13 in Turkey. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2016;71(suppl_1):i71-i83.
163. Torumkuney D, Tunger A, Sancak B, Bıçakçığıl A, Altun B, Aktas Z, et al. Results from the Survey of Antibiotic Resistance (SOAR) 2015–17 in Turkey: data based on CLSI, EUCAST (dose-specific) and pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) breakpoints. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2020;75(Supplement_1):i88-i99.
164. Yurttakal H, Sağiroğlu P, Parkan Ö, Atalay M, S. G. Tanımlamadan sekansa *Haemophilus*: Antibiyotik direnç profilleri ve moleküler karakterizasyonu. LX Uluslararası Türk Mikrobiyoloji Kongresi 16-20 Kasım 2022 Antalya2022. p. 402.
165. Gazi H, Kurutepe S, Sürücüoğlu S, Teker A, Özbakkaloglu B. Antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens in the oropharynx of healthy school children in Turkey. Indian Journal of Medical Research. 2004;120(5):489.
166. Hacımustafaoğlu M, Gürler N, S Ü. Üst solunum yolu infeksiyonlarının ampirik tedavisinin planlanmasında antimikrobiyal direnç: Türkiye ve dünyadaki mevcut durum ve mücadele stratejileri. ANKEM Derg. 2018;32(3):109-30.
167. Taha A, Adeline F, Taha M-K, Deghmane A-E. *Haemophilus influenzae* drug resistance in France from 2017 to 2021: consideration for treatment of otitis media. Journal of Global Antimicrobial Resistance. 2022;31:222-7.
168. Li X-X, Xiao S-Z, Gu F-F, He W-P, Ni Y-X, Han L-Z. Molecular epidemiology and antimicrobial resistance of *Haemophilus influenzae* in adult patients in Shanghai, China. Frontiers in public health. 2020;8:95.
169. Billal DS, Hotomi M, Yamanaka N. Can the Etest correctly determine the MICs of β -lactam and cephalosporin antibiotics for beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*? Antimicrobial agents and chemotherapy. 2007;51(9):3463.

170. Skaare D, Lia A, Hannisdal A, Tveten Y, Matuschek E, Kahlmeter G, et al. *Haemophilus influenzae* with non-beta-lactamase-mediated beta-lactam resistance: easy to find but hard to categorize. *Journal of clinical microbiology*. 2015;53(11):3589-95.
171. Puig C, Grau I, Marti S, Tubau F, Calatayud L, Pallares R, et al. Clinical and molecular epidemiology of *Haemophilus influenzae* causing invasive disease in adult patients. *PLoS One*. 2014;9(11):e112711.
172. Skaare D, Anthonisen IL, Caugant DA, Jenkins A, Steinbakk M, Strand L, et al. Multilocus sequence typing and *ftsI* sequencing: a powerful tool for surveillance of penicillin-binding protein 3-mediated beta-lactam resistance in nontypeable *Haemophilus influenzae*. *BMC microbiology*. 2014;14:1-16.
173. Kuvat N, Nazik H, Berkiten R, Öngen B. TEM-1 and ROB-1 presence and antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae* strains, Istanbul, Turkey. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 2015;46(2):254.
174. Cerquetti M, Giufrè M, Cardines R, Mastrantonio P. First characterization of heterogeneous resistance to imipenem in invasive nontypeable *Haemophilus influenzae* isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(9):3155-61.
175. Bilgi EA, Gönüllü N, Küçükbaşmacı Ö, Altinkum S, Torun MM, Kiraz N. Antibiotic Resistance of Bacteria Isolated from Upper and Lower Respiratory Tract Infections of Children. *JAREM Journal of Academic Research in Medicine*. 2013;3(3):103.
176. Watson JM, Burns J, Smith A. Hypermutable *Haemophilus influenzae* with mutations in *mutS* are found in cystic fibrosis sputum. *Microbiology*. 2004;150(9):2947-58.
177. Bastida T, Perez-Vazquez M, Campos J, Cortés-Lletget M, Roman F, Tubau F, et al. Levofloxacin treatment failure in *Haemophilus influenzae* pneumonia. 2003.
178. Tanaka E, Wajima T, Uchiya K, Nakaminami H. Quinolone resistance is transferred horizontally via uptake signal sequence recognition in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2022;66(2):e01967-21.
179. Morrissey I, Maher K, Williams L, Shackcloth J, Felmingham D, Reynolds R. Non-susceptibility trends among *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* from community-acquired respiratory tract infections in the UK and Ireland, 1999–2007. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2008;62(suppl_2):ii97-ii103.
180. Maraki S, Papadakis I. Antimicrobial resistance trends among community-acquired respiratory tract pathogens in Greece, 2009–2012. *The Scientific World Journal*. 2014;2014.

181. Şener B, Tunçkanat F, Ulusoy S, Tünger A, Söyletir G, Mülazimoğlu L, et al. A survey of antibiotic resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* in Turkey, 2004–2005. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007;60(3):587-93.
182. Torumkuney D, Gur D, Soyletir G, Gurler N, Aktas Z, Sener B, et al. Results from the Survey of Antibiotic Resistance (SOAR) 2002–09 in Turkey. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016;71(suppl_1):i85-i91.

