

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*HAEMOPHILUS INFLUENZAE*'LARDA TIPLENDİRME  
YÖNTEMLERİ VE ÖNEMİ

GÖKÇE KIRCA

Tıbbi Mikrobiyoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ANKARA

2021



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***HAEMOPHILUS INFLUENZAE*'LARDA TİPLENDİRME  
YÖNTEMLERİ VE ÖNEMİ**

Gökçe KIRCA

Tıbbi Mikrobiyoloji Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Ayşe Gülşen HASÇELİK

ANKARA

2021

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*Haemophilus influenzae'*larda Tiplendirme Yöntemleri ve Önemi

Öğrenci: Gökçe Kırca

Danışman: Prof. Dr. Ayşe Gülşen Hasçelik

Bu tez çalışması 09.02.2021 tarihinde jürimiz tarafından "Tıbbi Mikrobiyoloji Programı" nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

**Jüri Başkanı:** *Prof. Dr. Sevtap Arıkan Akdağlı*  
*Hacettepe Üniversitesi*

**Tez Danışmanı:** *Prof. Dr. Ayşe Gülşen Hasçelik*  
*Hacettepe Üniversitesi*

**Üye:** *Prof. Dr. Güllü İştah Dolapçı*  
*Ankara Üniversitesi*

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuştur.

25 Şubat 2021

Prof. Dr. Diclehan Orhan

**Enstitü Müdürü**

## YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe Üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan **“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”** kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H.Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir. <sup>(1)</sup>
- Enstitü / Fakülte yönetim kurulunun gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ... ay ertelenmiştir. <sup>(2)</sup>
- Tezimle ilgili gizlilik kararı verilmiştir. <sup>(3)</sup>

03/03/2021

(İmza)

Gökçe Kırca

i

<sup>i</sup>“Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge”

- (1) Madde 6. 1. Lisansüstü teze ilgili patent başvurusu yapılması veya patent alma sürecinin devam etmesi durumunda, tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu** iki yıl süre ile tezin erişime açılmasının ertelenmesine karar verebilir.
- (2) Madde 6. 2. Yeni teknik, materyal ve metotların kullanıldığı, henüz makaleye dönüşmemiş veya patent gibi yöntemlerle korunmamış ve internette paylaşılması durumunda 3. şahıslara veya kurumlara haksız kazanç imkanı oluşturabilecek bilgi ve bulguları içeren tezler hakkında tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulunun** gerekçeli kararı ile altı ayı aşmamak üzere tezin erişime açılması engellenebilir.
- (3) Madde 7. 1. Ulusal çıkarları veya güvenliği ilgilendiren, emniyet, istihbarat, savunma ve güvenlik, sağlık vb. konulara ilişkin lisansüstü tezlerle ilgili gizlilik kararı, **tezin yapıldığı kurum** tarafından verilir \*. Kurum ve kuruluşlarla yapılan işbirliği protokolü çerçevesinde hazırlanan lisansüstü tezlere ilişkin gizlilik kararı ise, **ilgili kurum ve kuruluşun önerisi** ile **enstitü** veya **fakültenin** uygun görüşü üzerine **üniversite yönetim kurulu** tarafından verilir. Gizlilik kararı verilen tezler Yükseköğretim Kuruluna bildirilir.
- Madde 7.2. Gizlilik kararı verilen tezler gizlilik süresince enstitü veya fakülte tarafından gizlilik kuralları çerçevesinde muhafaza edilir, gizlilik kararının kaldırılması halinde Tez Otomasyon Sistemine yüklenir

\* Tez **danışmanın** önerisi ve **enstitü anabilim dalının** uygun görüşü üzerine **enstitü** veya **fakülte yönetim kurulu tarafından karar verilir.**

## ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, Prof. Dr. Ayşe Gülşen Haşçelik danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Yönergesine göre yazıldığımı beyan ederim.

(İmza)

Gökçe Kırcı

## TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince bilimsel gelişimime katkıda bulunan, desteğini, yol göstericiliğini, tecrübesini hiçbir zaman esirgemeyen ve bana hep geniş ufuklar açan danışmanım sayın Prof. Dr. Ayşe Gülşen Hasçelik'e,

Tez çalışmalarım sırasında bana bölümdeki tüm olanakları sağlayan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı saygıdeğer Prof. Dr. Sevtap Arıkan Akdağlı'ya, değerli hocalarıma ve bölümümüz teknisyenlerinden Coşkun Erdem'e,

Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı sorumlu hocaları Prof. Dr. Banu Sancak ve Doç. Dr. Gülşen Hazırolan'a

Kurumun hiçbir imkanını esirgmeden her konuda yardımcı olan Türkiye Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Refersans Laboratuvarları ve Biyolojik Ürünler Dairesi Başkanlığı'ndan Doç. Dr. Selin Nar Ötğün, Sinem Tuncer Bedir ve Hakan Hedef olmak üzere tüm çalışma ekibine,

Yüksek lisans sürecinin bana kazandırdığı başta Nergis Emanet ve Öznur Gürpınar olmak üzere bölüm arkadaşlarıma,

Yürüdüğüm yolları benimle gelerek keyifli kılan Vildan Korkmaz, Yunus Kaan Akıncı, Ahmet Cemil Özturhan, Sedef Sayman ve Sebhat Tekcan Düğenci başta olmak üzere tüm dostlarıma,

Çocukluğum Gözde Ok'a, izcilik aileme,

Varlıkları ihtiyacım olan bütün cesareti veren, sorgusuz sualsiz beni hep destekleyen annem Sedef Kırca, babam Hasan Fehmi Kırca ve aileme,

Çok teşekkür ederim. Sizler olmasaydınız bu tez olmazdı.

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje No: THD-2018-16924) tarafından desteklenmiştir.

## ÖZET

**Gökçe Kırca, *Haemophilus influenzae*'larda Tiplendirme Yöntemleri ve Önemi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2021.** *Haemophilus influenzae* sistemik ve invaziv enfeksiyonlara neden olabilen gram negatif, kokobasil veya basil yapısında bir bakteridir. *H.influenzae*'nin serotiplendirmesi konvansiyonel olarak kapsüle özgü antiserumlarla veya kapsül proteinlerini kodlayan genlerin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile taranmasıyla yapılabilmektedir. Yapılan çalışmalar konvansiyonel serotiplendirmenin moleküler yöntemlere göre duyarlılığının daha az olduğunu ve tiplendirilemeyen *H.influenzae*'ları (NTHi) doğru tanımlayamadığını ortaya koymuştur. Ülkemizde 2007 yılında aşı takvimi kapsamına alınan Hib aşısından sonra *H.influenzae* enfeksiyonlarında etken yaygın serotip ve biyotiplerin insidansı değişmiş, daha çok NTHi'nin neden olduğu invaziv enfeksiyonlar tanımlanmaya başlamıştır. İzole edilen *H.influenzae*'ların hızlı ve doğru biçimde tiplendirilmesi gerekmektedir. Ayrıca serotip ve biyotipe bağlı olarak, bu bakterinin  $\beta$ -laktamaz aktivitesi ve ampisilin direnci de çeşitlilik göstermektedir. Çalışmamız kapsamında; Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarına gelen klinik örneklerden izole edilen *H.influenzae* suşlarının serotip ve biyotip dağılımları, antibiyotik duyarlılıkları ve  $\beta$ -laktamaz aktiviteleri araştırıldı. Elde edilen verilerin ışığında hastanemizdeki serotiplendirilen ve NTHi'nin oranı, biyotiplendirmesi ve antibiyotik duyarlılıkları belirlendi. Yaptığımız çalışmada konvansiyonel yöntemle NTHi (%78,9)'nin en yaygın serotip olduğu, bunu Hif (%7,9) ve Hie (%5,6)'nin takip ettiği, moleküler serotiplendirmede ise %66,9 NTHi, %15,1 Hie ve %6,8 oranında Hib bulundu. Konvansiyonel ve moleküler testler arasındaki uyumun ise %74,5 olduğu gösterildi. Biyotip III görülme sıklığı en yüksek biyotip (%29,8) olarak belirlendi. Ampisilin direnci %25 olarak saptanırken, bu izolatların %44'ünün  $\beta$ -laktamaz negatif ampisilin dirençli (BLNAR) olduğu ortaya kondu. Sonuç olarak erişkin hastalarda *H. influenzae*'ya bağlı enfeksiyonlarda NTHi'lerin arttığı, serotiplendirmede testler arasındaki uyumun orta düzeyde olduğu gösterildi.

**Anahtar Kelimeler:** *H. influenzae*, serotiplendirme, biyotiplendirme, BLNAR, antibiyotik direnci

Bu çalışma Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje No: THD-2018-16924) tarafından desteklenmiştir.

## ABSTRACT

**Gökçe Kırca, Typing Methods Of *Haemophilus influenzae* and It's Importance Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Medical Microbiology Program Master Thesis, Ankara, 2021.** *Haemophilus influenzae* is a gram-negative, cocobacilli or bacillus bacterium that can cause systemic and invasive infections. Serotyping of *H.influenzae* can be done conventionally by capsule-specific antisera or by polymerase chain reaction (PCR) via screening of genes encoding capsule expression. Studies have shown that conventional serotyping is less sensitive than molecular methods and cannot accurately identify non-typable *H.influenzae* (NTHi). In Turkey, the incidence of common serotypes and biotypes in *H.influenzae* infections has changed after the Hib vaccine, which has been included in the vaccine schedule in 2007, and invasive infections caused by NTHi have started to be defined. Isolated *H. influenzae* should be typed rapidly and accurately. In addition,  $\beta$ -lactamase activity and ampicillin resistance of this bacterium vary depending on serotype and biotype. Within the scope of our study, serotype and biotype distributions, antibiotic susceptibility and  $\beta$ -lactamase activities of *H.influenzae* strains isolated from clinical samples from Hacettepe University Hospitals Central Laboratories were investigated. In the light of the data obtained, the rate of serotyped *H.influenzae* and NTHi, biotyping and antibiotic susceptibilities of the strains isolated in our hospital were determined. In our study, NTHi (78.9%) was the most common serotype by conventional method, followed by Hi f (7.9%) and Hi e (5.6%). In molecular serotyping by NTHi (%66.9) was followed by Hi e (%15.1) and Hi b (6.8%). The correlation between the tests in serotyping was found to be 74.5%. The incidence of biotype III was the highest. Ampicillin resistance was found to be 25% and 44% of these isolates were BLNAR. In conclusion, it was observed that NTHi's were increased in *H. influenzae*-related infections in adult patients, and the agreement rate between the conventional and molecular serotyping methods was moderate.

**Keywords:** *H. influenzae*, serotyping, biotyping, BLNAR, antibiotic resistance

This study was supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit (Project No: THD-2018-16924).

## İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
ŞEKİLLER	xvii
TABLolar	xviii
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b>	<b>4</b>
2.1. Tarihçe	4
2.2. <i>Haemophilus influenzae</i>	5
2.2.1. Mikrobiyolojisi	5
2.2.2. Üreme Özellikleri	8
2.2.3. Antijenik Yapı	9
2.3. Patogenez ve Virülans Faktörleri	9
2.4. Epidemiyoloji	11
2.5. Risk Faktörleri	13
2.6. Klinik Tanı	14

2.6. Laboratuvar Tanısı	18
2.6.1. <i>Haemophilus influenzae</i> Suşlarının Makroskopik ve Mikroskopik Tanısı	18
2.6.2. <i>Haemophilus influenzae</i> Suşlarının Biyotiplendirilmesi	18
2.6.3. <i>Haemophilus influenzae</i> Suşlarının Serotiplendirilmesi	19
2.6.3. In vitro Antibiyotik Duyarlılığı	20
2.6.4. $\beta$ -laktamaz Testleri	22
2.7. Tedavi ve Koruma	23
2.7.1. Tedavi	23
2.7.2. Korunma	24
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>28</b>
3.1. Bakteri İzolatları	28
3.1.1. Stokların Canlandırılması	28
3.1.2. Güncel İzolatların Çalışılması	29
3.1.3. İzole Edilen Suşların Doğrulanması	29
3.1.3. Lam Aglütinasyonla Serotiplendirmenin Yapılması	29
3.2. Biyotiplendirme	31
3.2.1. İndol Testi	31
3.2.2. Üreaz Testi	31
3.2.3. Ornitin Dekarboksilasyon Testi	32
3.3. Moleküler Yöntemler	34
3.3.1. Kullanılan Primerler	35
3.3.2 DNA İzolasyon Protokolü	36

3.3.3. <i>bexA</i> Geninin Gerçek Zamanlı PZR ile Taranması	38
3.3.4. Serotipe özgü genlerin Gerçek Zamanlı PZR ile Taranması	40
3.4. In-vitro Antimikrobiyal Duyarlılığın Belirlenmesi	43
3.5.1 Kullanılan Antibiyotikler	43
3.5.2 İzolatların Hazırlanması	44
3.6 $\beta$ -Laktamaz Aktivitesinin Belirlenmesi	45
3.7. Biyoistatistiksel Değerlendirme	46
<b>4. BULGULAR</b>	<b>47</b>
4.1 Örneklerin Dağılımı	47
4.2. Hastaların Demografik ve Klinik Özellikleri	48
4.3. Serotiplendirme	48
4.4. Biyotiplendirme Sonuçları	51
4.5. PZR ile Taranan <i>bexA</i> ve <i>hpd</i> Gen Bölgelerine Ait Sonuçlar	52
4.6. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları	53
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>55</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>62</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>63</b>
<b>8. EKLER</b>	<b>85</b>
EK-1: Orjinallik Raporu	
EK-2: Turnitin Dijital Makbuz	
EK-3: Tez Orijinallik Raporu	
<b>9. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>88</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>AOM</b>	Akut Otitis Media
<b>ABD</b>	Amerika Birleşik Devletleri
<b>AMC</b>	Amoksisilin Klavulanik Asit
<b>SAM</b>	Ampisilin Sulbaktam
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>BPIG</b>	Bakteriyel Polisakkarit İmmünoglobulin
<b>β</b>	Beta
<b>BD</b>	Becton Dickinson
<b>BOS</b>	Beyin Omurilik Sıvısı
<b>CDC</b>	Centers for Disease Control and Prevention
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standarts Institute
<b>dk</b>	Dakika
<b>DNA</b>	Deoksiribo nükleik asit
<b>g</b>	Gram
<b>Hia</b>	<i>Haemophilus influenzae</i> tip a
<b>Hib</b>	<i>Haemophilus influenzae</i> tip b
<b>Hic</b>	<i>Haemophilus influenzae</i> tip c
<b>Hid</b>	<i>Haemophilus influenzae</i> tip d
<b>Hif</b>	<i>Haemophilus influenzae</i> tip e
<b>Hie</b>	<i>Haemophilus influenzae</i> tip f
<b>HTM</b>	Haemophilus Test Medium

<b>NTHi</b>	Non-typeable <i>Haemophilus influenzae</i>
<b>HbOC</b>	<i>Haemophilus</i> B Konjüge Aşısı CRM 197-Nontoksik Difteri Toksini
<b>PRP-OMP</b>	<i>Haemophilus</i> B Konjüge Aşısı <i>Neisseria meningitidis</i> Dış Membran Kompleksi
<b>IV</b>	İntra-Venöz
<b>kg</b>	Kilogram
<b>KKA</b>	Koyun Kanlı Agar
<b>CO<sub>2</sub></b>	Karbondioksit
<b>L,l</b>	Litre
<b>LOS</b>	Lipooligosakkarit
<b>Ig</b>	İmmüoglobülin
<b>ml</b>	Mililitre
<b>µl</b>	Mikrolitre
<b>µm</b>	Mikrometre
<b>mg</b>	Miligram
<b>µg</b>	Mikrogram
<b>MGW</b>	molecular grade water
<b>MALDI-TOF MS</b>	Matriks Assisted Lazer Desorption İonization Time Of Flight Mass Spectrometry
<b>MİK</b>	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
<b>NAD</b>	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
<b>PZR</b>	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>PRP</b>	Poliribozil Ribotil Fosfat

<b>PRP-D</b>	Poliribozil Ribotil Fosfat-Difteri Toksoidi
<b>PRP-T</b>	Poliribozil Ribotil Fosfat-Tetanoz Toksoidi
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PBP</b>	Penisilin Bağlayan Protein
<b>TZP</b>	Piperasilin Tazobaktam
<b>°C</b>	Santigrat fDerece
<b>CEC</b>	Sefaklor
<b>SF</b>	Serum Fizyolojik
<b>NaCl</b>	Sodyum Klorür
<b>Cq</b>	Quantification Cycle
<b>WHO</b>	World Health Organisation
<b>%</b>	Yüzde
<b>BLNAR</b>	$\beta$ -lactamase Negative Ampicillin Resistant
<b>BLPAR</b>	$\beta$ -lactamase Positive Ampicillin Resistant
<b>BLNAI</b>	$\beta$ -lactamase Negative Ampicillin İntermediate
<b>BLPAI</b>	$\beta$ -lactamase Positive Ampicillin İntermediate
<b>BLNASR</b>	$\beta$ -lactamase Negative Ampicillin Sulbactam Resistant
<b>BLPASR</b>	$\beta$ -lactamase Positive Ampicillin Sulbactam Resistant

## ŞEKİLLER

Şekiller	Sayfa
2.1. <i>Heamophilus</i> ve <i>Aggregatibacter</i> cinslerinin genetik yakınlıkları	7
3.1. Lam aglütinasyon testi sonuçları	30
3.2. İndol testi sonucu	31
3.3. Üreaz testi sonucu	32
3.4. Ornitin dekarboksilasyon testi sonucu	33
3.5. Gerçek zamanlı PZR sonuçları	34
3.6. Disk diffüzyon antibiyogram sonucu	44
3.7. $\beta$ -laktamaz test sonucu	45
3.8. Biyoistatistiksel değerlendirme için R-Studio'da yazılan kod	46

## TABLOLAR

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
3.1. İndol, Üreaz ve Ornitin test sonuçlarına göre biyotip türleri.	33
3.2. Çalışmada kullanılan primerlerin tasarımı.	35
3.3. <i>H. influenzae</i> gerçek zamanlı PZR tarama kitinin içeriği.	37
3.4. <i>H. influenzae</i> tarama PZR karışımının içeriği.	37
3.5. <i>hpd</i> geninin gerçek zamanlı PZR ile taramasında amplifikasyon programı.	38
3.6. <i>bexA</i> tarama kitinin içeriği.	39
3.7. <i>bexA</i> tarama PZR karışımının içeriği.	39
3.8. <i>bexA</i> geninin gerçek zamanlı PZR ile taramasında amplifikasyon programı.	40
3.9. <i>Haemophilus influenzae</i> gerçek zamanlı PZR serotiplendirme kitinin içeriği.	41
3.10. <i>H. influenzae</i> tarama PZR karışımının içeriği.	42
3.11. Serotipe özgü genlerin gerçek zamanlı PZR ile taramasında amplifikasyon programı.	42
3.12. Kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları.	43
4.1. <i>H. influenzae</i> 'ların izole edildiği yılların dağılımı (n: 252).	47
4.2. <i>H. influenzae</i> 'nin izole edildiği klinik örneklerin dağılımı (n: 252).	47
4.3. <i>H. influenzae</i> suşlarında moleküler ve konvansiyonel serotiplendirme.	49
4.4. Serotiplendirme sonuçlarının karşılaştırmalı çapraz sonuçları.	50
4.5. Yıllara göre <i>H. influenzae</i> 'ların moleküler serotiplendirmelerinin dağılımı.	51

4.6. <i>H. influenzae</i> 'larda biyotiplendirme sonuçları (n: 252).	51
4.7. Moleküler olarak serotiplendirilen <i>H. influenzae</i> 'ların biyotiplendirme sonuçlarına göre dağılımı.	52
4.8. <i>H. influenzae</i> 'ların çalışılan antibiyotiklere karşı in vitro duyarlılık sonuçları (n: 251).	53
4.9. Ampisilin ve ampisilin-sulbaktam direnci gösteren suşların $\beta$ -laktamaz aktiviteleri.	54



## 1. GİRİŞ

*Haemophilus influenzae* insanların mukozal yüzeylerinde kolonize olabilen, kokobasil şeklinde, sporsuz, hareketsiz, gram negatif bakteridir. Bu bakteri Pfeiffer tarafından 1892 yılında influenza epidemisi etkeni olarak tespit edilmiş ve bu nedenle "influenza basili" olarak tanımlanmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalar her ne kadar *H. influenzae*'nin, influenza epidemilerinin birincil etkeni olmadığını ortaya koymuş olsa da isimlendirmesinde değişikliğe gidilmemiştir (1, 2).

*H. influenzae* kapsüllü ve kapsülsüz olmak üzere iki gruba ayrılmakta, kapsüllü olanlar kapsüllerinde bulunan polisakkaritlerine göre a, b, c, d, e ve f şeklinde isimlendirilen 6 serotip (3, 4), ayrıca indol üretimi, üreaz ve ornitin dekarboksilaz testlerine göre ise sekiz farklı biyotip (I-VIII) olarak sınıflandırılmaktadır (5-7).

*Haemophilus* türü bakteriler insan ve hayvanlarda zorunlu parazit olmakla birlikte, *H. influenzae* sadece insanlarda enfeksiyon oluşturmaktadır. *H. influenzae* özellikle boğaz ve nazofarenks bölgesinde kolonize olurken, nadiren konjonktiva, burun ve genital sistemde de kolonize oldukları tespit edilmektedir. *H. influenzae*'nin kapsülsüz suşları ve kapsüllü olanlardan *H. influenzae* tip b (Hib) her yaştaki insanın üst solunum yollarında kolonize olmakta (2), özellikle *H. influenzae* tip b serotipi (Hib), beş yaş altı çocuklarda pnömoni, menenjit, bakteriyemi ve epiglotit gibi ölümcül olabilen invaziv enfeksiyonlara neden olmaktadır (8). Kapsülsüz suşlar ise erişkinlerde toplum kaynaklı pnömoni, akut orta kulak iltihabı, akut sinüzit ve kronik bronşitin akut alevlenmeleri şeklinde seyretmektedir (1).

*H. influenzae*'nin serotiplendirmesi konvansiyonel olarak kapsül spesifik antiserumlarla yapılabildiği gibi kapsül genlerini kodlayan *cap* lokusundaki *bexABCDEF* genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile taranmasıyla da

yapılabilmektedir. Yapılan çalışmalar konvansiyonel olarak serotiplendirmede moleküler yöntemlere göre daha fazla yanılma payı olduğunu ve tiplendirilemeyen kapsülsüz *H. influenzae*'ları (NTHi) tanımlayamadığını ortaya koymuştur. Ayrıca konvansiyonel yöntemlerle b tipi suşların kapsülsüz mutantları (b<sup>-</sup>) da tanımlanamamaktadır. 2007 yılından beri ulusal aşı takvimi kapsamına alınan Hib aşısından sonra *H. influenzae* enfeksiyonlarında, etken yaygın serotip insidansı değişmiş ve daha çok NTHi'nin neden olduğu invaziv enfeksiyonlar görülmeye başlamıştır. Daha önceki çalışmalar serotip ve biyotiplerin yeni insidanslarının coğrafi bölgelere göre farklılık gösterdiğini ortaya koymuştur. Aynı zamanda serotip ve biyotipe göre  $\beta$ -laktamaz aktivitesi ve buna bağlı olarak ampisilin direnci de çeşitlilik göstermektedir. Bu nedenlerle hastalardan izole edilen *H. influenzae* suşlarının hızlı ve doğru biçimde serotiplendirilmesi gerekmektedir.

Son yıllarda bu bakterilerin antibiyotik dirençlerinin giderek arttığı saptanmıştır (9). *H. influenzae* enfeksiyonlarının tedavisinde her ne kadar ampisilin akla gelen ilk seçenek olsa bile plazmid aracılı  $\beta$ -laktamaz üretimi sebebiyle ampisiline karşı gelişen direnç tüm dünyada hızla artmaktadır. *H. influenzae* suşunun ampisilin direnci, ilk olarak 1974 yılında bildirilmiştir (10). Günümüzde ise  $\beta$ -laktamaza bağlı ampisilin direncinin tüm dünyada artış gösterdiği ve bunun yanında özellikle İspanya, Fransa, Güney Kore ve Japonya gibi bazı ülkelerde de  $\beta$ -laktamaz negatif ampisilin direncinin arttığı tespit edilmiştir. Bu nedenle bu durumun ülkemiz için belirlenmesi oldukça değerli ve önemlidir (2, 11).

*H. influenzae* kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde aminopenisilinler, aminopenisilin ve beta laktamaz inhibitörlerinin kombinasyonları, antipseudomonal olmayan sefalosporinler, sefotaksim veya seftriakson, kinolonlar (levofloksasin, moksifloksasin) veya bunların kombinasyonları tercih edilmektedir. Ancak direnç oranının hızlı artışı tedavi için kullanılan antibiyotiklerde güncelleme yapılmasını gerektirmektedir (12-14).

Çalışmamızın amacı Hacettepe Üniversitesi Hastanelerinde izlenmekte olan hastalardan izole edilen *H. influenzae* suşlarının biyotip, serotip dağılımlarının ve antibiyotik duyarlılıklarının araştırılmasıdır. Bunun için hastalardan alınan, çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve etken olduğu belirlenen *H. influenzae*'ların önce biyotiplendirmesi ve konvansiyonel yöntemlerle serotiplendirmesi yapılmış, daha sonra moleküler yöntemlerle yapılmış serotiplendirme konvansiyonel serotiplendirme sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Elde edilen verilerin ışığında Hacettepe Üniversitesi Hastanesindeki tiplendirilen ve tiplendirilemeyen *H. influenzae*'ların oranı çıkartılmıştır. Ayrıca izolatların in vitro olarak antibiyotik duyarlılık testleri ve  $\beta$ -laktamaz aktiviteleri belirlenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tarihçe

İlk olarak Robert Koch 1882 yılında konjktiva materyalinde *Haemophilus aegyptius* saptamıştır (15). Bunu takiben Richard Pleiffer 1892 yılında Avrupa influenza pandemisi sırasında yaşamını yitiren hastaların balgam örneklerinden ve akciğer dokularından *H. influenzae* izole etmiştir (16). Pleiffer bulduğu bu bakteriyi “Pleiffer’s bacillus” veya “*Bacillus influenzae*” olarak isimlendirilmiştir. Slawyk (17) 1899 yılında ve Cohen (18) ise 1909 yılında menenjit hastalarının beyin omurilik sıvılarından *H. influenzae*’yi üretmiştir.

Amerikan Bakteriyoloji Derneği 1920 yılında bu bakteriyi üretmek için kan faktörlerine gereksinim duyan *Haemophilus influenzae* olarak isimlendirmiştir (19). Pitmann 1931 yılında kapsüllü ve kapsülsüz *H. influenzae* suşlarını tanımlamıştır. Ayrıca kapsül bulunduran suşların da kapsüler polisakkaritlerindeki antijen farklılıklarına göre a, b, c, d, e ve f olmak üzere altı farklı serotipe ayrıldığını saptamıştır (19-22).

Fothergill ve Wright 1935 yılında *H. influenzae* tip b’ye karşı bakterisidal antikörlerin serum düzeyi ve Hib hastalıklarının görülme yaşı arasındaki ilişkiyi tanımlamış (23), Lucas ve arkadaşları 1994 yılında ise sıçanlarda Hib inoküle edilmesiyle menenjit gelişimine karşı hiperimmün cevap geliştirdiğini bildirmiştir (24).

*H. influenzae* tedavisinde 1950 yılında kloramfenikol kullanımının Hib enfeksiyonlarına bağlı mortaliteyi azalttığı gösterilmiştir (25), 1970 yılında ise Schneerson ve arkadaşları Hib polisakkarit kapsül komponenti olan oliribozil ribotil fosfatı (PRP) aşı immünojeni olarak pürifiye etmiş (26), Peltola ise (1974) Finlandiya’da 18 aydan büyük 100.000 çocuk üzerinde yapılan aşı çalışmasında PRP’nin Hib enfeksiyonuna karşı koruyucu olduğunu göstermiştir (27).

*H. influenzae*'nin biyokimyasal özelliklerine göre beş ayrı biyotipe ayrıldığı Kilian ve arkadaşları (1979 yılı) tarafından bildirilmiş, önce bu bakteriler biyotip I-IV olarak isimlendirilmiş, ancak daha sonra bu biyotiplere V'den VIII'e kadar olan diğer biyotipler de eklenmiştir (8-11).

*H. influenzae*'nin 1980 yıllarında aşı çalışmaları ile ilgili yapılan yayınlarda, 18 aydan küçük çocuklarda immünojeniteyi artırmak için oliribozil ribotil fosfat'ın (PRP) çeşitli proteinlerle konjuge edildiği gösterilmiş (28), Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) ise 1985 yılında PRP aşısının 24 aydan büyük çocuklara uygulanması için lisans alınmıştır (29). Finlandiya'da 1985-1987 yılları arasında 6 ile 12 aylık çocuklara poliribosilribitol fosfat-difteri toksoidi (PRP-D)'nin uygulandığı kontrollü bir çalışmada aşının koruyucu olduğu gösterilmiştir. ABD'de 1987 yılında PRP-D 18 aylık çocuklarda ve 1990 yılında Haemophilus b konjüge aşısı (CRM 197-nontoksik difteri toksini(HbOC)) ve Haemophilus b konjüge aşısı (*Neisseria meningitidis* dış membran kompleksi(PRP-OMP)) 2 aya kadar küçük çocuklarda kullanılmak üzere lisans almıştır. 1993 yılında ise aynı ülkede poliribosilribitol fosfat-tetanoz toksoidi (PRP-T) ve DTP-HbOC Diphtheria, Tetanus, Pertussis/ *Haemophilus influenzae* type b ( $\geq 6$  hft – 6 yıl)) kombinasyonu aşılarda lisans alıp kullanıma girmiştir. Yapılan birçok çalışmada 1995 yılından itibaren ABD'de Hib hastalıklarının önceki görülme sıklığının %5-10'una oranında azaldığını gösterilmiştir (30). Ülkemizde ise *H. influenzae* tip b aşısı 2007 yılında aşılamaya takvimine alınmıştır (31). *H. influenzae*'nin tam genom analizi ise 1995 yılında tamamlanmıştır (32, 33).

## **2.2. *Haemophilus influenzae***

### **2.2.1. Mikrobiyolojisi**

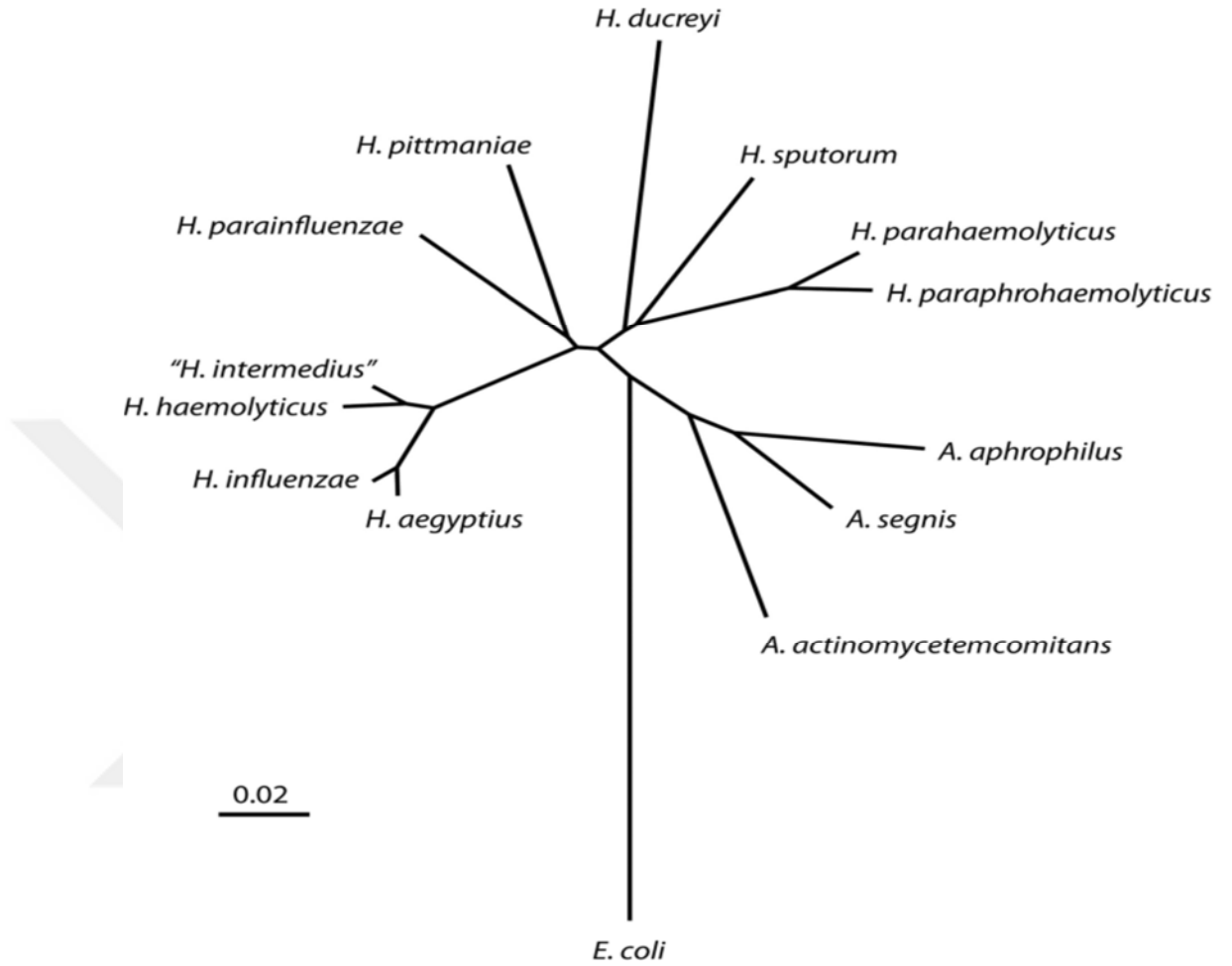
Pasteurellaceae familyasında *Haemophilus* cinsi yanında *Actinobacillus*, *Pasteurella* ve *Aggregatibacter* cinsleri bulunmaktadır. Bu familya geniş bir

hastalık yelpazesine sahip olmakla birlikte genel olarak gram negatif ve fakültatif anaerop basillerdir (34-37). *Haemophilus* cinsi insanların mukoz membranlarında kolonize olan, 0.5-2.0 µm boyunda, 0.2-0.3 µm eninde, bazen pleomorfik olarak görünen, gram negatif basillerdir. Bu bakterilerin çoğu izolasyon için zenginleştirilmiş besiyerlerine ihtiyaç duymaktadır (34-37). *Haemophilus* cinsinin günümüze kadar bildirilmiş 19 türü bulunmaktadır. Bilinen en önemli türlerinden *Haemophilus influenzae*, pediyatrik hastalarda enfeksiyonlarla ilişkili olarak en sık bildirilen türdür (38). *Haemophilus* türlerinden insanla ilişkili olduğu tanımlanan diğer türler ise *H. aegyptius*, *H. haemolyticus*, *H. ducreyi*, *H. parainfluenzae*, *H. parahaemolyticus*, *H. aphrophilus*, *H. paraphrophilus*, *H. segnis*, *H. pittmaniae* ve nadir olarakta *H. paraphrohaemolyticus*'dur (8).

*Haemophilus* (Haemo: kan, philos: seven) cinsi yalnız insanda bulunmakta ve doğal hayvan konağı bulunmamaktadır (39). Cins ismini in-vitro üremede kanda bulunan yardımcı büyüme faktörlerine duyulan ihtiyaçtan dolayı almıştır. Bu faktörler; X faktör (hemin) ve V faktör (Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD))'dür. Diğer türlerin çoğu bu faktörlerden yalnızca birine gereksinim duyarken, *H. influenzae* ise her ikisine de gereksinim duymaktadır. Bu bakteriler için en iyi üreme ısı 33-37 °C'dir (40).

Yapılan moleküler çalışmalar sonucunda *Haemophilus* cinsinde bulunan bazı türler; *H. aphrophilus*, *H. segnis*, *H. paraphrophilus* türleri *Aggregatibacter* cinsine, *H. avium*, *H. paragallinarum* türleri *Avibacterium* cinsine ve *H. pleuropneumoniae* ise *Actinobacillus* cinsine transfer edilmiştir (39).

Geleneksel sınıflandırma kriteriyle, *H. influenzae* ve *H. aegyptius* ayrı türler olarak sınıflandırılmıştır (41). Ayrıca bu türlerin popülasyon genetik analizlerinde farklı bakteri popülasyonları oluşturdukları ve klinik bulgularının farklı patojenik potansiyellere sahip olduklarını göstermiştir. Bazı yayınlar *H. aegyptius*'un *H. influenzae* biyogrup *aegyptius* olarak adlandırılmasının daha doğru olduğunu belirtmektedirler (42, 43)(Şekil 1).



Şekil 2.1. *Heamophilus* ve *Aggregatibacter* cinslerinin genetik yakınlıkları.

*H. influenzae* solunum yolu mikrobiyotasındabulunan ve özellikle çocukluk çağındaki bireylerde menenjit, otitis media, üst solunum yolu enfeksiyonları ve pnömoni gibi hastalıkların önemli etkenleri arasında yer alan bir bakteridir. Aşılama yöntemleri ortaya çıkana kadar tüm dünyada bakteriyel menenjitin en önemli üç ana etkeninden biri olarak kayıtlara geçmiştir. Semptomlar genellikle 3 ila 36 aylık çocuklarda görülürken, insidansın en yüksek olduğu dönem 6-7 aylık

çocuklardır. Bu vakaların hemen hepsinden *H. influenzae* serotip b ve biyotip l'in sorumlu olduğu bildirilmiştir (30, 44, 45).

### 2.2.2. Üreme Özellikleri

Aerob veya fakültatif anaerob bir bakteri olan *H. influenzae* adi besiyerlerinde üreyememektedir. Aerob koşullarda üreyebilmek için besiyerlerinde X ve V faktörlerinin bulunmasına gereksinim duymaktadır (46).

X faktörü; ısıya dayanıklı tetrapirel bileşikler grubunu (hemin, hematin) oluşturan kan komponentidir; bakteri tarafından yapısında hem bulunan demirli solunum enzimleri olan sitokrom oksidaz, katalaz ve peroksidazın sentezinde kullanılır.

V faktörü (ısıya duyarlı bir koenzim (NAD)) hücre metabolizmasında hidrojen alıcısı olarak kullanılmaktadır. V faktörü taze kanlı besiyerlerinde bozulmamış eritrositlerin içerisinde hapsedilmiştir. *Staphylococcus aureus* başta olmak üzere bazı difteroid basiller, streptokoklar, neisserialar ve pseudomonaslar fazla miktarda V faktörü sentezler. Buna bağlı olarak, *H. influenzae* koyun kanlı agarda (KKA) *S. aureus* kolonilerinin hemen yanında üreyebilmekte, bu olay "satellit fenomeni" veya "süt anne fenomeni" olarak bilinmektedir (5, 47). Bazı *Haemophilus* türleri %5 at veya tavşan kanlı agarda üreyebilmekte ve beta-hemolitik koloniler oluşturabilmektedirler (7).

Çikolata agarda bu bakterilerin kapsüllü olmayan suşlarının kolonileri tipik olarak grimsi renkte, şeffaf, düzgün yüzeyli ve konveks görünüme sahiptir. Kapsüllü suşlar ise daha geniş, daha opak ve mukoid koloniler oluşturmaktadır (8, 40).

*H. influenzae* 37°C'de ve pH 7.4 – 7.6'da iyi üremekte ve %5-10'luk CO<sub>2</sub> ortamına gereksinim duymaktadır (45).

### 2.2.3. Antijenik Yapı

*Haemophilus* türleri, gram negatif bakteri türlerinin hücre duvarına benzemektedir. Bazı *H. influenzae* suşlarında kalın bir hücre duvarı bulunduğu bildirilmektedir. Bazı *H. influenzae* suşlarında ise kendilerini makrofaj ve nötrofillerin fagositozundan koruyan 0,25 µm kalınlığında, negatif yüklü ve hidrofobik bir kapsül bulunmaktadır. Kapsül polisakkarit yapısında olup antijenlerinin yapısına göre altı tipe (a, b, c, d, e ve f) ayrılmıştır. Herbir serotip, kapsül disakkarit alt ünitelerden meydana gelen lineer bir polimerden oluşmaktadır. Tip b kapsülü negatif yüklü bir fosfodiester ile bağlantılı PRP lineer polimerini içermektedir. Serotip a, b, c ve f'nin kapsül antijenleri, teikoik asit içermektedir. Fosfat içermeyen serotip d ve e kapsülleri glikozidik olarak bağlantılı polisakkaritlerdir (48, 49).

Kapsül bulundurmeyen suşlar tiplendirilemeyen (kapsülsüz) suşlar olarak adlandırılmaktadır. Bu suşlar da biyotipleme, dış membran proteinleri (molekül ağırlık farkları), lipooligosakkarit (LOS) antijenik farklılıkları ve elektroforetik tiplendirmedeki genetik farklılıklar olmak üzere kendi içlerinde çeşitli yöntemlerle sınıflandırılabilir (50).

### 2.3. Patogenez ve Virülans Faktörleri

*Haemophilus* türlerine, özellikle *H. parainfluenzae* ve *H. influenzae* başta olmak üzere, bebeklik çağından itibaren tüm hayat evrelerinde rastlanabilmektedir. Bu bakteriler insanların üst solunum yolu mukoz membranına kolonize olmakta, lokal olarak yayılabilmekte, orta kulak iltihabı ve sinüzite, alt solunum yollarında ise bronşit, pnömoni gibi hastalıklara neden olmaktadır. *H. influenzae*'nin özellikle b serotipi (biyotip I), üst solunum yollarında nadiren bulunmakta, aşılammış çocuklarda menenjit, epiglottit (obstrüktif larenjit), selülit gibi hastalıklara yol açmaktadır (37, 51).

*H. influenzae*'nin en önemli virulans faktörleri:

**1) Kapsül:** *H. influenzae* tip *b* major virülans faktörü riboz, ribitol (5-karbonlu şeker alkolü) ve fosfat içeren, PRP olarak bilinen, antifagositik polisakkarit kapsüldür. Kapsüle karşı oluşan antikolar, fagositozu ve kompleman aracılı bakterisidal aktiviteyi stimüle etmektedir (5, 52).

**2) Pili (Fimbriyalar):** Kapsüllü ve kapsülsüz suşlarda bulunan fimbriyalar, ağız ve üst solunum yolu ve adenoid epiteline tutunmada rol oynamakta ve kolonizasyonu sağlamaktadır. Ayrıca bu yapı eritrositleri aglütine etmektedir (50).

**3) Adezyon proteinleri:** HMW1 ve HMW2 gibi adezin proteinleri, solunum yolundaki insan epitel hücrelerine bağlanmaya aracılık etmektedir. Bu proteinler özellikle tiplendirilmeyen *H. influenzae* (NTHi) suşlarının epitel ve endotel invazyonu için önemli bir rol oynamaktadır (53).

**4) Lipooligosakkaritler (LOS):** *H. influenzae* suşları ekzotoksin üretimi yapmamaktadır. Lipooligosakkarit, bu suşların invazyonunda etkili bir endotoksindir. LOS solunum epitel hücresi silyalarının üst tabakasını paralyze ederek, konağın spesifik olmayan savunma mekanizmasının bir parçası olan ortamdaki uzaklaştırma işlemini engellemektedir.

**5) IgA1 proteaz:** *H. influenzae* suşları IgA1 proteaz üreterek Immunglobulin A'nın menteşe bölgesinin açılmasına neden olmaktadır. IgA1 proteaz aktivitesi sonucu patojenin mukozal yüzeydeki aglutinasyonu ve bunun ardından ortamdaki uzaklaştırılması engellenmiş olmaktadır. İnsanlarda *H. influenzae* invazyonunun artışı ve IgA1 proteaz aktivitesinin artışı arasında korelasyon olduğu saptanmıştır (54, 55).

**6) Faz varyasyonu:** Konak ortamındaki değişikliklere uyum sağlamasına yardımcı olan patojenin dış yüzeý proteininin modifikasyonudur. Bu sayede patojen konağın immun sisteminden kaçma fırsatı bulmaktadır. Buna örnek olarak hemoglobin bağlayıcı proteinler (HgbA, HgbB, HgBC) ve adezinler (OapA, HMW1, HMW2) gösterilebilmektedir (53).

#### 2.4. Epidemiyoloji

*Haemophilus* türleri, yetişkinlerin %85'inden fazlasının orofarenks ve nazofarenks mikrobiyotasının elemanıdır. Orofaringeal bölgeden izole edilen suşların çoğu kapsülsüz olmakla birlikte, bu bölgede kapsüllü *H. influenzae* (kapsüler serotipler a, b, c, d, e ve f) türleri de bulunabilmektedir (5). *H.influenzae*'nin patojenitesi, kapsülün varlığına ve spesifik kapsül türüne göre değişmektedir (56). *H. influenzae* tip b aşılarının uygulanmasına kadar, *H. influenzae* enfeksiyonlarının % 95'inden fazlasının *H. influenzae* tip b ile meydana geldiği gösterilmiştir (55). *H. influenzae* b aşılamasından sonra bütün yaş gruplarında tip b enfeksiyonlarının insidansının azaldığı (57, 58) , diğer kapsüler (a, c, f) ve NTHi suşların insidansının arttığı belirlenmiştir (6, 59, 60). *Haemophilus* türü bakteriler, sağlıklı insanların üst solunum yolu mikrobiyotasının yaklaşık %10'unu oluşturmaktadır. Oral kavite ve farenkste en fazla *H. parainfluenzae* (%75) bulunmakla birlikte, bu türün nazal kavitede bulunmadığı gösterilmiştir (43, 61, 62). *H. influenzae*'nin oluşturduğu nazofaringeal kolonizasyon, ortalama 1,5-2 ay kadar süren taşıyıcılık ile karakterize dinamik bir olaydır. Lokal enfeksiyon süresince *H. influenzae* kolonisi, genellikle farinks ve nazal kavitedeki floraya hakim olmakta (61-63), kalabalık ortamların yüksek taşıyıcılık hızına katkıda bulunduğu düşünölmektedir (63, 64). Aşısız 0-36 ay arasındaki çocukların üst solunum yollarında %3-5 oranında, okul öncesi çocuklarda %8-12 oranında tip b taşıyıcılığı tanımlanmıştır (43). Sağlıklı çocuklarda baskın olarak bulunan biyotip II veya biyotip III kapsülsüz *H. influenzae* suşları genellikle farenkste bulunmakta, ancak toplam bakteri florası'nın %2'sinden daha azını oluşturmaktadır (33).

Bakteri nadir olarak konjonktiva mukozası ve genital yolda da kolonize olmaktadır (34). Birçok popülasyon da çocukların konjuge aşı ile aşılmasından sonra oluşan antikorlara bağlı olarak, Hib taşıyıcılığının belirgin bir şekilde azaldığı gösterilmiştir (64-66). Her ne kadar *H. influenzae* tip b, sistemik hastalığa neden olan en yaygın serotip olsa da, *H. influenzae* aşısının uygulanmasından önceki dönemlerde, sağlıklı çocuklardan da nadir olarak izole edildiği bilinmektedir (67, 68).

*H. influenzae* yalnız insan patojeni olup, başka doğal konağı bulunmamaktadır (69). *H. influenzae* tip b (Hib), gelişmekte olan ülkelerde bebek ve çocuklarda morbidite ve mortaliteye yol açan menenjit, pnömoni ve diğer invaziv enfeksiyonların (ampiyem, artrit, perikardit, epiglottit, osteomyelit, bakteriyemi) en yaygın nedenlerinden birisidir. Hib kaynaklı menenjit ve pnömonilerin, dünyada her yıl 375.000'den fazla çocuğun 5 yaşına varmadan ölmesine neden olduğu tahmin edilmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde 5 yaşından küçük çocuklarda *H. influenzae* menenjiti nedeniyle her yıl yaklaşık 200.000 vaka ve 37.000 ölüm meydana gelmektedir. Gelişmiş ülkelerde ise Hib menenjit oranı yılda %0.008, tüm invaziv Hib hastalıklarının oranları ise %0.0021-0.0100 arasındadır. Yetişkin insanlarda Hib hastalığı insidansı her 100.000 olguda 0.85'dir ve bunların çoğunun kronik akciğer hastalığı ve diğer immün direnç düşüklüğü ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (37, 67).

*H. influenzae* insandan insana damlacık veya salgılarıyla doğrudan temas yoluyla bulaşmaktadır. İnvaziv Hib enfeksiyonlarının inkübasyon süresi bilinmemektedir (34).

*H. influenzae* enfeksiyonları iki ana tip altında sınıflandırılabilir:

**1. *H. influenzae*'nin primer patojen olduğu, sıklıkla bakteriyemi ile gelişen akut ve ciddi enfeksiyonlar:** Bunlar genellikle 3 ile 48 ay grubundaki çocuklarda görülmektedir. Erişkinlerde ise birçok invaziv hastalık kapsülsüz suşlarla oluşmaktadır.

**2. *H. influenzae*'nin primer etken olmadığı, ancak daha önce hasar görmüş dokuya kolonize olarak önemli bir sekonder rol oynadığı enfeksiyonlar:** Bu enfeksiyonlar kronik bronşit, bronşektazi, kistik fibroz, pnömoni, sinüzit, orta kulak iltihabı ve konjunktivittir. Bu klinik tablolardan izole edilen bakteriler genellikle kapsülsüzdür. Bu kapsülsüz suşlar aynı zamanda erişkinlerde menenjit de yapabilmektedir. Bu olguların çoğunda predispozan faktörler (kafa travması, orta kulak iltihabı, sinüzit) bulunmaktadır (69, 70).

## 2.5. Risk Faktörleri

*H. influenzae* enfeksiyonlarının epidemiyolojisinde aile özellikleri, yaş, cinsiyet, kalabalık ortamlarda bulunma, mevsim ve farklı coğrafik bölgelerde bulunma gibi faktörler önem taşımaktadır (34, 41).

Epidemiyolojik risk faktörleri arasında önemli olan kriter yaştır. Yenidoğanlar, Hib enfeksiyonlarına karşı anneden geçen antikorlarla pasif olarak korunmaktadır. Ancak özellikle 6-11. aylar arasında Hib enfeksiyonlarının sıklığı artmaktadır. Doğal antikorların gelişmeye başlaması ile bu sıklık azalmakta, yaklaşık iki yaş civarında belirgin bir düşüş göstermekte ve beşinci yaşla birlikte yaşa spesifik bir sıklıkta görülmeye başlamaktadır. Yedi yaşından küçük olan çocuklar en yüksek nazofaringeal Hib taşıyıcılığı oranına sahiptir. Cinsiyete göre dağılım benzerdir (70).

Kapsüle karşı koruyucu antikorların bulunmaması, IgG sentezinde yetersizlikler, orak hücreli anemi ve splenektomi de risk faktörleri arasındadır. *H. influenzae* enfeksiyonlarında ailenin kalabalık olması, kardeşlerin sayısı ve yaşı,

ilkokula giden kardeşlerin bulunması da önemli risk faktörleri arasında sayılmaktadır.

*H. influenzae* menenjitli bir çocuk ile aynı evde bulunan çocuklarda sekonder enfeksiyon riski %2-4 oranındadır. Kapsülsüz *H. influenzae* ile oluşan orta kulak iltihabı bulunan kardeşlerde yapılan araştırmalarda, aynı evdeki çocuklar arasında kapsülsüz *H. influenzae* suşlarının kişiden kişiye geçebileceği gösterilmiştir (71).

## 2.6. Klinik Tanı

*H. influenzae* yalnız insanlarda enfeksiyona neden olan bir bakteridir. Yaptığı enfeksiyonlar:

**a. Menenjit:** Tüm dünyada bakteriyel menenjite neden olduğu bilinen üç etken arasında *H. influenzae*, *S. pneumoniae* ve *N. meningitidis* bakterileri yer almaktadır. *H. influenzae*'ya bağlı menenjit olguların çoğunluğu 3 ila 36 ay arasındaki çocuklarda görülmekte olup enfeksiyon insidansı 6-7 ay civarında en yüksek değerine ulaşmaktadır. Genellikle bu dönemde izole edilen suşların *H. influenzae* serotip *b* (Hib) ve *H. influenzae* biyotip I olduğu gözlenmiş ve bu iki özelliğin septisemi ile ilişkili akut epiglottitin major etiyolojik ajanları arasına da sayılmasına neden olmuştur (45, 57). Hib enfeksiyonu, aşı programlarının uygulanmaya başlanmasından önce, her yaş grubunda meydana gelen bütün menenjitlerin yaklaşık yarısının nedeni olmuştur (72, 73). Klinik bulguların erken tanısı ve özellikle menenjit tanısının konması, emzirme çağındaki ve küçük çocuklarda oldukça zor olmaktadır. Bağışıklığı düşük olan çocuklarda, nazofarinkteki bakteriyemik yayılımdan dolayı meydana gelen enfeksiyon, diğer bakterilerden kaynaklanan enfeksiyonlardan ayırt edilememektedir. Tanısı konmuş vakalarda tedavi uygulanmış olsa dahi mortalite hızı küçük çocuklarda %30 seviyesine kadar ulaşabilmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde her yıl 200.000 menenjit vakası gerçekleşmekte olup, bunların yaklaşık 37.000'i ölümle

sonuçlanmaktadır. Bu vakaların oluşumunun %97'den fazlasının ise Hib kaynaklı olduğu tespit edilmiştir (72, 74).

**b. Epiglottit:** *H. influenzae* enfeksiyonlarının önem sıralamasında ikinci sırada yer almaktadır. Epiglottitin en sık nedeni *H. influenzae* bakterisidir. Genel olarak 2 ila 4 yaş arasındaki çocuklarda görülen akut epiglottit, supraglottik enflamasyon ve obstrüksiyona yol açarak ölüme neden olacağından dolayı pediatri kliniklerinde acil durum olarak kabul edilmektedir. Solunum yollarının tıkanmasına neden olabileceği için krup sendromlarından bağımsız olarak ele alınması gerekmektedir. Aşı uygulamasının hayata geçirilmesiyle bu hastalık insidansı oldukça düşük değerlere ulaşmıştır (75).

**c. Pnömoni:** Hib kaynaklı pnömoni 4 – 48 ay arasındaki çocuklarda kış ve ilkbahar aylarında görülmektedir. Çocukluk döneminde ise pnömoni ve menenjit gelişmesi eşit miktardadır. Kan kültürü, radyolojik ve klinik bulgular sonucu Hib kaynaklı pnömoni insidansının %50 oranında olduğu saptanmıştır. Hib kaynaklı pnömoni, stafilokok ve pnömokok pnömonisinden daha yavaş seyirli olması nedeniyle farklılık göstermektedir (8). Özellikle kanser, alkolizm, HIV enfeksiyonu ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı bulunan bireylerde kapsülsüz suşlar tarafından bazen invaziv enfeksiyonlar oluşabilmektedir. Kapsüllü olan suşlardan a, c, d veya e serotipli olan suşlar sağlıklı bireylerin solunum yolları florasında doğal olarak bulunmakla birlikte bazen enfeksiyonlara neden olabilmektedir (55, 76). Pnömoni vakalarının %10-30'una akut orta kulak iltihabı (akut otitis media) (AOM), menenjit, septik artrit gibi bazı diğer lokal enfeksiyonlar eşlik edebilmektedir. *H. influenzae* pnömonilerinde yaklaşık %1 vakada sekel (bronşektazi ve reaktif hava yolu hastalığı başta olmak üzere) gelişebilmektedir (72).

**d. Selülit:** Genellikle yüz ve periorbital bölgede meydana gelen selülit, kızarıklık, ağrı, morumsu renk değişikliği ile karakterize bir çocuk hastalığıdır. Tanı, kan kültürü ve yanaktan alınan aspirattan üretilen enfeksiyon etkeninin tanısı ile konulmaktadır. Bu vakalara menenjit veya bakteriyemi de eşlik edebilmektedir. Bu durum özellikle 24 aydan küçük çocuklarda görülmekte olup, bakteriyemi sonrası metastatik odak olarak gelişebilmektedir (30, 38, 72, 75).

**e. Bakteriyemi:** Sık ve erken görülen bu klinik tablo, yeni doğanlarda perinatal bulaşma sonucu ortaya çıkmaktadır. Yeni doğan döneminden sonra görülen bakteriyemi vakalarının % 90-95'i Hib tarafından oluşturulmaktadır (5).

**f. Artrit:** Küçük çocuklarda meydana gelen Hib kaynaklı artrit ile *S. aureus* kaynaklı artrit birbirinden tam olarak ayırt edilememektedir. Enfeksiyonun bakteriyemi oluşturmasından sonra başta kalça eklemi olmak üzere, tek ve büyük eklemlerde görülmektedir. Hastalık genel olarak çocuk yaş grubunda gözlenmekte, yetişkinlerde ve büyük çocuklarda ender olarak saptanmaktadır (38). Ayrıca Hib menenjiti sırasında kültür negatif ve eklemlerde immün kompleks birikimine bağlı olarak gelişen reaktif artrit (septik artrit olmadan) meydana gelebilmektedir (72).

**e. Akut orta kulak iltihabı(Otitis media):** Orta kulak iltihabı sıklıkla 6-24 ay arası çocuklarda görülmekte, 6-13 aylık çocuklarda insidansı en yüksek olmakta ve 72 aydan sonra düşmektedir. Akut ve kronik orta kulak iltihabının en yaygın iki nedeni arasında *H. influenzae* (Tiplendirilemeyen grup) ve *S. pneumoniae* suşları yer almaktadır (38, 77, 78).

**f. Osteomyelit:** *H. influenzae* çocuklarda nadiren osteomyelite neden olmaktadır.

Bu hastalıkların dışında *H. influenzae* tip *b* perikardit, orbital sellülit, endoftalmit, üriner sistem enfeksiyonları, neonatal sepsis, şant enfeksiyonları, nekrotizan fasiit, peritonit, skrotal abse, beyin absesi, poliserozit, tenosinovit, epididimit, akciğer absesi, periapendiküler abse ve bakteriyel trakeite neden olmaktadır (77, 79) .

Diğer *Haemophilus* suşlarının neden olduğu enfeksiyonlar;

***Haemophilus parainfluenzae:*** Üst solunum yollarında kommensal olarak bulunan bu tür, ağız florasında en sık izole edilen türdür. *H. parainfluenzae* farenjit, epiglottit, otitis media, sinüzit, konjuktivit, diş abseleri, pnömoni, ampiyem, sepsis, endokardit, septik artrit, osteomyelit, peritonit, üriner ve genital sistem enfeksiyonları nadiren de menenjit ve beyin absesine neden olmaktadır (80).

***Haemophilus aphrophilus:*** Oral kavite ve üst solunum yollarının normal flora üyesidir. HACEK grubu bakterilerinden biri olmakla birlikte endokardit etkenidir (81).

***Haemophilus segnis:*** Farinks normal florasında ve özellikle diş plağında bulunmaktadır. Ayrıca endokardite neden olabilmektedir (82).

***Haemophilus aegyptius:*** Koch-Weeks basili olarak da adlandırılan *H. aegyptius* akut ve pürülan bir konjunktivite neden olmaktadır.

***Haemophilus ducreyi***: İnsanda seksüel yolla bulaşan bir hastalık olan şankroid (yumuşak yara) etkenidir. *H. ducreyi* suşunun vücuda giriş bölgesinde, erkeklerde genellikle peniste, kadınlarda ise labiumlarda, oluşturduğu lezyonlarla tipiktir. Genel olarak kadınlar asemptomatik olup, hastalık belirtisi görülmebilmektedir. Lezyonla temastan 1-5 gün sonrasında genital veya perianal bölgede eritamatöz, yumuşak bir papül gelişmektedir. Genital lezyon hassas bir papül olarak başlar, püstüler şekle dönüşmekte ve daha sonra ülserleşmektedir. Lezyonlar, tek taraflı inguinal lenfadenit ile birleşerek daha geniş ülserlere neden olmaktadır. Şankroid tanısı, bir veya daha fazla ağrılı ülserin varlığı, sifilize ait negatif laboratuvar sonucu ve klinik tipik ülser görüntüsü ile konulmaktadır (38, 78). Bu hastalık, HIV'nin endemik olduğu popülasyonlarda yeniden önem kazanmıştır (5, 8).

## 2.6. Laboratuvar Tanısı

### 2.6.1. *Haemophilus influenzae* Suşlarının Makroskobik ve Mikroskobik Tanısı

*H. influenzae* çikolata agarda 37°C'de %5'lik CO<sub>2</sub>'li etüvde 24 ile 48 saat inkübasyon sonrası küçük, saydam, kenarları düz S şeklinde koloniler oluşturarak üremektedir. Diğer *Haemophilus* türlerinden ayrımını yapabilmek için besiyerine X ve V faktörleri veya faktörleri içeren diskler eklenebilmektedir.

Kolonilerden yapılan Gram boyamada 0,3 – 0,5 µm en ve 0,5 – 2.0 µm boyunda uçları yuvarlak, ikili kısa zincirler ve kümeler halinde gram negatif kokobasil morfolojisinde gözlenmektedirler.

### 2.6.2. *Haemophilus influenzae* Suşlarının Biyotiplendirilmesi

Kilian (40), tür hakkındaki taksonomik çalışmasında hemofilik bakterileri tanımlamak ve karakterize etmek için bazı biyokimyasal testleri ortaya koymuştur. Biyotiplendirme için indol üretimi, üreaz ve ornitin dekarboksilaz testleri

kullanılmaktadır. *H. influenzae* suşları, serotipten bağımsız olan (a-f) sekiz biyotipe ayrılmaktadır. *Haemophilus* türlerinin biyotiplendirilmesi; özgül biyotiplerin ayrı enfeksiyonlara yol açmaları, vücudun farklı yerlerinden izole edilmeleri, antijenik özellikleri ve antibiyotik dirençlerinin değişmesiyle ilişkilidir. *H. influenzae* biyotip I suşları çoğunlukla 1 yaşından küçük çocukların beyin omurilik sıvısı (BOS), kan ve solunum yolu sekresyonlarından, *H. influenzae* biyotip II ve III 1-5 yaş arasındaki çocukların konjonktiva ve balgam kültürlerinden ve 20 yaşından büyük erişkinlerden izole edilmektedir. Biyotip II ve III aynı zamanda oküler enfeksiyonlarla da ilişkilidir. *H. influenzae* biyotip IV obstetrik, jinekolojik, perinatal ve neonatal enfeksiyonlarda etken olarak görülmektedir (5, 40).

### **2.6.3. *Haemophilus influenzae* Suşlarının Serotiplendirilmesi**

*H. influenzae* enfeksiyonlarında serotiplendirmenin doğru şekilde yapılması ve tiplendirilemeyen suşlarla, tip b mutant suşların doğru tanımlanması önem arz etmektedir.

Serotiplendirme için lam aglütinasyon testi uygulanmakta ve kapsüllü *H.influenzae* suşları kapsüle özgü antiserumlarla altı farklı serotiple (a-f) tanımlanmaktadır (5). Günümüzde, lamaglutinasyonuyla serotiplendirme *H.influenzae* için kapsüler tipi tanımlamada en sık kullanılan yöntemdir. Bazen bu yöntemin hatalı sonuç verdiği gösterilmiştir (7, 83). Bu nedenle *H. influenzae*'nın kapsüler tiplendirmesi için kesin bir metoda ihtiyaç duyulmaktadır. Kapsül tipine özgü genlerin saptanması ile kesin bir kapsüler tiplendirme yapılabilmektedir. Bu özellikle Hib aşısı olmuş hastalardaki *H. influenzae* kapsüler tipi için geçerli olmaktadır (6). Kromozomun cap olarak adlandırılan bir bölgesi (cap lokusu) *H. influenzae*'da kapsül ekspresyonu için gerekli gen kümesini içermektedir (84). Altı kapsül tipinin her birindeki cap lokusu, 3 bölgeden oluşan ortak bir yapı bulundurmaktadır; 1. ve 3. cap bölgeleri bütün *H.influenzae*'larda ortak, 2. cap bölgesi ise kapsül türüne özgüdür. Kapsüllü bütün *H.influenzae*'lar cap bölgesinde *bexA* genini içerirken, kapsülsüz olanlarda (NTHi) bu gen bölgesi

bulunmamaktadır. Ayrıca spontan olarak ortaya çıkan b tipi suşların kapsül içermeyen ( $b^-$ ) (capsule deficient hib) mutantları da *cap* lokusunda *bexA* genini taşımaktadır. Bu nedenle mutant suşlar ve tiplendirilemeyen türler sadece moleküler olarak ayrılabilir. Bu mutant suşlar geleneksel serotiplendirme teknikleriyle NTHi suşlarından ayırt edilememektedir (6, 85). Konvansiyonel serotiplendirmenin bu dezavantajları nedeni ile son yıllarda moleküler yöntemler önem kazanmıştır. İlk defa 1994 yılında Falla ve arkadaşları (6) moleküler yöntemlerden Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile kapsül tiplerini ayırt etmişlerdir. Daha sonra Gonin (86) ve arkadaşları bu yöntemi modifiye ederek Multipleks PZR yöntemini kullanmışlar ve bu yöntemin lam aglütinasyonuna göre daha güvenilir bulmuşlardır. Bu yöntem birçok araştırmacı ve Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ve World Health Organisation (WHO) tarafından kabul görmüştür (6, 59, 85, 86).

### 2.6.3. *In vitro* Antibiyotik Duyarlılığı

Antimikrobiyal ilaçlara karşı direnç gelişimi, önemli bir tedavi sorunu oluşturmaktadır. Antimikrobiyal ilaçlara dirençli *Haemophilus* suşları, özellikle çocuklarda yüksek morbidite ve mortaliteye neden olabilmektedir (8, 50).

*Haemophilus* suşlarının vahşi-tip suşları ampisilin, sefalosporinler, kloramfenikol, sülfonamidler, tetrasiklinler ve makrolid-ketolid grubu antimikrobiyallere karşı duyarlılık göstermektedir. Bunun yanı sıra başlıca yol olarak konjugatif plazmidlerin yayılması nedeniyle, klinik izolatların büyük bir kısmı, ampisilin ve diğer birçok beta laktam antibiyotiğe, kloramfenikole ve tetrasiklinlere karşı direnç kazanmıştır (87, 88).

*H. influenzae*'da ampisilin ve diğer  $\beta$ -laktamlara karşı oluşan direnç ya  $\beta$ -laktamaz üretimine ya da  $\beta$ -laktamazlara karşı afinitesi azalan değişmiş penisilin bağlayan protein (PBP)'lerin varlığına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Çok az izolatta ise her iki direnç mekanizması birlikte görülür. *H. influenzae*'da şimdiye kadar azalmış hücre geçirgenliği ve pompa atım sistemleri ile ilgili direnç gelişimi

tek bir vaka haricinde bildirilmemiştir (89). Ampisilin direncine neden olan genler plazmidler üzerinde taşınmaktadır. Çok nadir olsa da görülen mekanizmalardan biri de hücre duvarı geçirgenliğinin azalmasıyla bağlantılıdır (3, 4, 90, 91)

*H. influenzae*'da  $\beta$ -laktamaza bağlı ampisilin direnci ilk kez 1970 yılında Avrupa'da saptanmıştır. *H. influenzae*'da  $\beta$ -laktamazlar TEM-1 ve ROB-1  $\beta$ -laktamazlarıdır ve plazmid aracılığı ile sağlanmaktadır. Bunların her ikisi de sınıf A serin  $\beta$ -laktamazları grubuna ait olup ampisiline direnç oluştururlar ve klavulanik asit gibi  $\beta$ -laktamaz inhibitörleri ile inhibe olmaktadır (92).

$\beta$ -laktamaz oluşturma kapasitesi hastanın yaşından, bölgeden ve izolasyonun yapıldığı mevsim gibi bazı faktörlerden etkilenmektedir. Küçük çocuklarda meydana gelen invaziv enfeksiyonların etkeni olan suşlarda ve *H. influenzae* tip *b*'de  $\beta$ -laktamaz pozitifliği diğer suşlara göre çok daha yüksektir (2).

*H. influenzae* bakterilerinde PBP değişimlerinin kökenini kromozomal mutasyonlar oluşturmaktadır. Kromozomdaki PBP3'ün kodlandığı *ftsI* geninin mutasyonu ile oluşan bu direnç, PBP3'ün affinitesindeki azalma sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu direnç mekanizmasına sahip olan suşlar ilk olarak 1980 yılında Markowitz tarafından endokardit ve menenjitli hastalardan bildirilmiş ve  $\beta$ -laktamaz negatif ampisilin dirençli (BLNAR) suşlar olarak tanımlanmıştır (93).

BLNAR suşlarını net bir şekilde tanımlamak zordur. Bu suşlar,  $\beta$ -laktamaz negatif ve ampisilin için saptanmış olan MİK değeri, Amerika Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute)'nün (CLSI) önerdiği 4 $\mu$ g/mL'ye eşit yada büyük olmalıdır. MİK değeri 2  $\mu$ g/mL olan suşlar, CLSI kriterlerine göre duyarlı ve dirençli sınırlar arasında kaldığı için, değerlendirmek zordur ve bu suşlar orta duyarlı olarak kabul edilmekte, fakat duyarlı olmadıkları için genelde BLNAR olarak değerlendirilmektedir (89).

Sefalosporinin yaygın kullanımının selektif baskısı altında oluşan *ftsI*'daki mutasyonlar, *H. influenzae*'daki sefalosporin direncinin temelini oluşturmaktadır. Ayrıca, BLNAR suşları aminoasit değişimi açısından Ubukata tarafından 3 gruba

ayrılmaktadır. Bunlar Grup I Arg-517-His, Grup II Asn-526-Lys, Grup III ise Asn-526-Lys değişimi yanı sıra Met-377, Ser-385 ve Leu-389 olarak belirlenmiştir (75).

Ampisilin orta duyarlı suşlar yaygın olarak grup I ve II'de bulunmakta ve bunlar zayıf BLNAR olarak kabul edilmektedir. Zayıf BLNAR suşlar aynı zamanda  $\beta$ -laktamaz negatif ampisilin orta duyarlı (BLNAI) olarak da adlandırılmaktadır.  $\beta$ -laktamaz pozitif olanlar ise  $\beta$  – laktamaz pozitif ampisilin orta duyarlı (BLPAI) olarak isimlendirilmektedir. Yüksek düzey BLNAR suşları ise genelde Grup III olarak değerlendirilir ve yalnızca yüksekampisilin MİK'i değil, diğer  $\beta$ -laktam antibiyotikler ve özellikle de sefalosporinlere de azalmış duyarlılık göstermektedirler (75, 77, 94). Bu mekanizma sonucu sadece ampisiline karşı değil, diğer  $\beta$ -laktam antibiyotiklerine, özellikle sefalosporinlere de direnç gelişebilir. BLNAR izolatları için sefaklor direncinin ampisilin direncinden daha iyi bir gösterge olabileceği önerilmiştir. Hatta bu suşlar CLSI önerilerine göre amoksisilin/klavulanik asit (AMC), ampisilin/sulbaktam (SAM), piperasilin/tazobaktam (TZP), sefaklor (CEC), sefuroksim, lorakarbef ve sefprozile in-vitro duyarlı saptansalar bile dirençli kabul edilmektedirler (2, 89).

#### **2.6.4. $\beta$ -laktamaz Testleri**

İlk olarak Abraham ve Chain (95) tarafından tanımlanan  $\beta$ -laktamaz enzimi çeşitli organizmalar tarafından üretilmekte olup, penisilin ve sefalosporinlere dirençlerinin bir mekanizmasıdır (96).  $\beta$ -laktamaz saptamada iyodometrik, asidimetrik ve kromojenik sefalosporin yöntemleri kullanılmaktadır (52, 97-99).

Kromojenik sefalosporin  $\beta$ -laktamaz testi bakteriler tarafından  $\beta$ -laktamaz üretimini saptamak için kullanılan kalitatif bir yöntemdir. Reaksiyon, nitrosefin substratı,  $\beta$ -laktamaz üreten kültüre maruz bırakıldığında renkli bir bileşik üretime dayanmaktadır (100).  $\beta$ -laktamaz, kültür ile üretildiğinde, sefalosporanik asit oluşturarak nitrosefin  $\beta$ -laktam halkasına hidrolize olur (101). Bu reaksiyon ile ayırt edici bir renk değişimi gerçekteşir. Soluk sarı nitrosefin, hidrolizden sonra pembeye dönüşür (52, 97-100). Hem aerobik hem de anaerobik  $\beta$ -laktamaz

üreten bakteriler bu renk değişimini oluşturur (102, 103).  $\beta$ -laktamaz negatif organizmalar test süre sınırları içerisinde nitrosefinin soluk sarı rengini değiştirmezler.

## 2.7. Tedavi ve Koruma

### 2.7.1. Tedavi

Etkeni *H. influenzae* olan menenjit ve epiglottit vakalarının tedavi edilmemesi durumunda mortalite oranının %90'a kadar ulaşabildiği ortaya konmuştur. Bu bakteride ampisilin direnci ülkelere göre değişmekle birlikte, direncin %50 oranlarına çıktığı bildirilmiştir. Ülkemizde ampisilin direnci %3-3,5 oranlarındadır (104).

Alınan klinik örnekte kültürde üreme olduğunda, antibiogram sonucuna göre tedavide ampisilin kullanılabilir. Ancak bazı vakalarda, ampisilin dirençli ve duyarlı suşlar aynı anda bulunabilmekte, bu nedenle durumu ciddi olan hastalarda bu konunun dikkate alınması gerekmektedir (104, 105). Genellikle beta laktamaz üretimine ve nadiren azalmış penisilin bağlayıcı proteinlere yönelik gelişmiş olan ampisilin direnci nedeniyle ampirik tedavide ampisilin tercih edilmemektedir (106, 107).

İnvaziv *H. influenzae* enfeksiyonlarının tedavisinde genellikle üçüncü kuşak (sefotaksim ve seftriakson) ve ikinci kuşak (sefuroksim) sefalosporinler tercih edilmektedir (72, 104).

Sefotaksim ve seftriakson antibiyotikler beta laktamaz üreten ve azalmış penisilin bağlayıcı proteinlere bağlı dirençte etkili olmaktadır. Orta şiddetli sinüzit ve otitis media enfeksiyonlarının tedavisinde sefalosporin veya azitromisin kullanılmaktadır (108, 109). Sefuroksim grubu antibiyotiklerin BOS geçişi istenen ölçülerde olmadığından menenjit veya menenjit riskinde tercih edilmemektedir (72). Sefuroksim; 100-200 mg/kg/g (iv, sefotaksim; 100-200 mg/kg/g (iv),

seftriakson; 50-100 mg/kg/g (iv) verilmektedir. Sefalosporinlere karşı allerjisi olan vakalarda ise kloramfenikol 50-100mg/kg/g (iv) verilebilmektedir. Antibiyotik tedavisine ek olarak hastalığın bulgularına göre uygun olan destek ve diğer adjuvan tedaviler de uygulanmaktadır (örneğin; menenjit için deksametazon gibi). Septik artrit, osteomyelit, parapnömonik efüzyon, perikarditte uygun cerrahi konsültasyon ve drenaj gerekli olmaktadır. Subdural efüzyonda cerrahi drenaj gerekebilmektedir. İnvaziv *Hib* enfeksiyonlarında hastanın ateşi düştükten sonra tedaviye 3-5 gün daha devam edilmekte, toplam süre komplikasyonsuz olgularda 7-10 gün kadar olmaktadır. Ancak endoftalmi, endokardit, osteomyelit, septik artritte daha uzun süre tedavi verilmektedir (72, 110).

Parenteral tedaviyi takiben, hastane dışında tedaviyi tamamlamak için sefiksim, amoksisilin/klavulonat veya kloramfenikol gibi antibiyotikler oral yoldan kullanılabilir (111). Çok ilaca dirençli *Hib* enfeksiyonlarının tedavisinde ise seftizoksim ve seftazidim gibi sefolosporinler tercih edilmektedir (112).

### **2.7.2. Korunma**

Schneerson ve arkadaşları *Hib* polisakkarit kapsül komponenti olan PRP aşısı immünojeni olarak pürifiye etmiştir (26). Daha sonra 1974 yılında Finlandiya'da 18 aydan büyük 100.000 çocuk üzerinde yapılan aşısı çalışmasında, PRP'nin *Hib* enfeksiyonuna karşı koruyucu olduğunu göstermiştir (27).

İlk *Hib* aşısı (PRP) 1985 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde lisans almıştır. Etkinliği %58-88 arasında olup 24 aydan büyük çocuklarda uygulanmaya başlanmıştır (113). T hücrelerinden bağımsız antijenik özellik gösteren PRP aşısı, emniyetli bir aşısıdır. Ancak 14 aydan küçük çocuklardaki riskli grup bağımsız T hücre yanıtından dolayı konjüge olmayan aşılarda aşılanamadığından, bebek aşılması için önerilen bir aşısı olmamakla beraber erişkin yaş grubunun aşılmasında güvenle kullanılabilir (112, 114).

Finlandiya'da 1985-1987 yılları arasında 6 ila 12 aylık çocuklarda kontrollü olarak uygulanan Difteri toksoidi ile konjuge PRP (PRP-D) aşısının koruyucu olduğu gösterilmiştir (30). Amerika Birleşik Devletleri'nde 1987 yılında difteri toksoidi ile konjuge ilk PRP aşısı (PRP-D) ProHIBİT® lisans almıştır. Bunu sırasıyla nontoksik mutant difteri toksini CRM197 ile konjuge (HbOC) HibTITER® ve *N. meningitidis* grup b'in dış membran proteini ile konjuge [PRP-OMP (Haemophilus b Conjugate Vaccine (Meningococcal Protein Conjugate))] PedvaxHIB® aşıları izlemiştir. Bu aşılar 18 ay ve üzeri çocuklarda rutin olarak kullanılmaya başlanmış ve bu aşının kullanılması ile birlikte Hib hastalıklarına karşı daha yüksek bağışıklık sağlanmıştır. Vaka-kontrol çalışmalarında konjuge aşılardan bu yaş grubu üzerinde kullanılması ile aşılardan etkinliğinin %80-90 oranında olduğu tespit edilmiştir (58).

Finlandiya'da yapılan bir çalışmada, poliribitol fosfat-difteri (PRP-D) ile HbOC (Haemophilus b Conjugate Vaccine (Diphtheria CRM 197 Protein Conjugate)) aşıları karşılaştırılmış, çalışma sonunda her iki aşının da Hib hastalıklarına karşı koruyucu olduğu, fakat HbOC'un immunijenitesi ve koruyuculuğunun PRP-D'den daha yüksek olduğu bulunmuştur (58, 114). HbOC ve PRP-OMP konjuge aşılardan 1990 yılında 2 aydan büyük çocuklarda kullanılması adına lisans verilmiştir. Bu olayla birlikte Hib epidemiyolojisine uygun aşılama programı başlatılmıştır. Genel olarak bu gruptaki konjuge aşılardan bir yaşından önce üç doz uygulanması ile %94-97 oranında aşı etkinliği elde edilmiştir (58, 115). Tetanoz toksoidi ile konjuge edilen Hib aşısı (PRP-T (Hib-polyribosylribitol phosphate (PRP) polysaccharide conjugate vaccine covalently linked to tetanus toxoid)) Act-HIB® , 1993 yılında lisans almıştır. Bu aşı bütün yaş gruplarında immünojenik özellik göstermektedir. DTP-HbOC (Diphtheria, Tetanus, Pertussis/ Haemophilus influenza type b) gibi DTP ve DTP-inaktif polio aşılardan kombine versiyonları da bulunmaktadır. Bağışıklık sağlama %100 oranında olup dünyada şu an en yaygın kullanılan aşı çeşididir (116, 117).

Bu üç tip aşı arasında (HbOC, PRP-OMP, PRP-T) yan etki ve etkinlik açısından belirgin bir fark yoktur. Mevcut aşuların koruyuculuğu konusunda kesin bilgilerin edinilebilmesi için aşıllı çocukların uzun süre izlenmesi ve epidemiyolojik çalışmaların yapılması gerekmektedir(112). PRP-T aşısı ile İngiltere’de yapılan geniş bir epidemiyolojik çalışmada; PRP-T aşısının 2, 3 ve 4. aylarda yapılmasını takiben sistemik Hib olgularının ve nazofarengeal Hib taşıyıcılığının anlamlı bir şekilde azaldığı, 3’üncü doz aşudan sonra aşı başarısızlığının olmadığı bildirilmiştir (116).

Konjuge aşular, bebek ve çocukları Hib enfeksiyonlarına karşı etkin şekilde korumaktadır (112). Bununla beraber kişisel özelliklerden dolayı bazı riskli gruplarda konjuge aşular ile yeterli koruma sağlanamamaktadır. Kanseri tedavi alan çocuklar, AIDS hastaları, primer veya sekonder hipogammaglobulinemili çocuklar, kronik lenfositik lösemili çocuklar, multipl miyeloma ve Hodgkin hastalığı olan çocuklar bu riskli grubu oluşturmaktadır. Risk altındaki çocukları Hib hastalıklarından korumak için, yüksek titrede Ig içeren bakteriyel polisakkarit immünglobulin (BPIG) kullanılabilir. Pasif immünizasyonda minimum koruyucu anti-Hib konsantrasyonu 0.05-0.15 mg/l olmalıdır. Riskli gruplara BPIG 0.5 mg/kg dozunda intramusküler yapılabilir. BPIG uygulamasını takiben 4-6 saatte koruyucu etki başlar ve bu etki bir aya kadar devam eder. BPIG ile DTP ve HbOC aşuları beraber uygulanabilir, aralarında interferens yoktur (118).

Ig G tipindeki anti Hib antikoru plasenta yoluyla bebeğe geçmektedir. Zamanında doğan bebeklerin Hib antikoru ile anne kanındaki Hib antikoru arasında güçlü bir korelasyon vardır, fakat zamanında doğmayan bebeklerde bu ilişki daha zayıftır (119). Anneden geçen bu antikoru bebeği 3-6 ay boyunca Hib enfeksiyonlarına karşı korumaktadır. Yapılan çalışmalarda, 20 gebeye üçüncü trimesterde bir doz PRP aşısı yapıldığında, bebeğe geçen antikor titresinin arttığı ve bebeklerin bir yaşına kadar Hib enfeksiyonlarına karşı korunduğu gözlenmiştir (120, 121).

Primer vaka ile aynı evi paylaşan aile fertleri, sekonder hastalık açısından risk altındadır. Primer vaka ile aynı evi paylaşan beş yaş altındaki çocuklarda sekonder hastalık oluşma riskinin böyle bir ilişkisi olmayan çocuklara göre 600 kat daha fazla olduğu bulunmuştur. Ev içinde ilişkide olan beş yaşından küçük çocuklara en kısa sürede rifampin profilaksisi (20 mg/kg/gün, dört gün) başlanmalıdır. İlişkide bulunanlardan birinde ateş çıkarsa, acilen medikal tedaviye başlanması gerekmektedir (112).

Hib enfeksiyonlarına karşı aşılama, 1999 yılında 38 ülkede uygulanmaya başlamıştır. 2004 yılının sonlarına doğru bu sayı 89'a ulaşmıştır (122, 123). Aşı, Türkiye Ulusal Bağışıklama Programına ise 2006 yılında DBT aşısı ile aynı anda ancak ayrı bir bölgeden yapılmak üzere eklenmiş, 2007 yılında beşli aşı (DaBT-İPV-Hib) içinde yer almaya başlamıştır. Güncel aşı programında, 2, 4, 6, ve 18. aylarda uygulanmaktadır. Bir yaşından sonra aşı tek doz olarak uygulanmakta ve verilen rapel doz antikor yanıtı düzeyini değiştirmemektedir. 5 yaş sonrası yalnız riskli gruplara uygulanmaktadır. (124).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Bakteri İzolatları

Çalışmada 2000 – 2019 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Hastanelerine başvurmuş hastalardan alınan klinik örneklerden enfeksiyon etkeni olarak izole edilen toplam 252 *H. influenzae* suşu kullanıldı. Tez başlangıç tarihine (Nisan 2018) kadar izole edilen ve -80°C de stoklanan bakteriler tekrar üretilerek, bu tarihten sonra gelen klinik örneklerden izole edilen suşlar ise kültürden taze olarak çalışıldı. Kalite kontrol suşları olarak *Haemophilus influenzae* tip a ATCC 9006, *Haemophilus influenzae* tip b ATCC 102011, *Haemophilus influenzae* tip c ATCC 9007, *Haemophilus influenzae* tip d ATCC 9332, *Haemophilus influenzae* tip e ATCC 8142 ve *Haemophilus influenzae* tip f ATCC 9833 kullanıldı.

##### 3.1.1. Stokların Canlandırılması

Ocak 2000 - Nisan 2018 yılları arasında -80°C'de stok besiyeri (%5 gliserol içeren beyin kalp infüzyon sıvı besiyeri) içerisinde stoklanmış ve *H.influenzae* olarak tanımlanmış 306 suştan canlandırılabilmiş 130 suş ve bu tarihten sonra izole edilen ve *H.influenzae* olarak tanımlanmış ve tanısı doğrulanmış 122 suş çalışmaya dahil edildi.

Stoktan çalışılan suşlar için canlandırma işlemi; stok bakteriler oda ısısında çözüldükten sonra 50 µl örnek tek koloni yöntemiyle çikolata besiyerine (RTA, Türkiye) ekilerek ve %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 24 saat inkübasyona bırakılarak yapıldı. İnkübasyon süresinin sonunda üreme olmadığı durumda, tekrar stoktaki bakteri oda sıcaklığında çözüldükten sonra tavşan serumu (Gibco, Amerika) eklenmiş sıvı besiyerine ekilerek (%5 maya özütü içeren beyin kalp infüzyon sıvı besiyeri) 24 saat %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübasyona bırakıldı. 24 saat sonrasında zenginleştirici besiyerinden alınan 50 µl bakteri süspansiyonu çikolata besiyerine ekilerek inkübasyon süresinin sonunda değerlendirildi.

### 3.1.2. Güncel İzolatların Çalışılması

Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarları Bakteriyoloji birimine gelen çeşitli klinik örneklerden enfeksiyon etkeni olarak izole edilen *H.influenzae* suşları stok besiyeri içerisinde -20°C'de saklanarak tüm örneklerle birlikte çalışıldı.

### 3.1.3. İzole Edilen Suşların Doğrulanması

Bütün suşların önce çikolata agardaki makroskopik olarak koloni morfolojisi değerlendirildi. *H.influenzae* olabileceği düşünülen kolonilerden Gram boyama yapıldı. Gram negatif basil ya da kokobasil görünümünde, uçları yuvarlak, ikili kısa zincirler veya küme halinde incelenen bakterilerin Triptik Soy Agar'da (BD, Almanya) X ve V (BD, Amerika) faktörlerine gereksinimleri incelendi. X ve V faktörlerine gereksinimlerine göre *H.influenzae*'yı diğer türlerden (*H.aegyptius*, *H.haemolyticus* ve *H.aprophilus* gibi) ayırmak için *Haemophilus influenzae* polivalan serumu (BD, Amerika) ile çikolata besiyerinde (RTA, Türkiye) üretilmiş 24 saatlik taze örneklerden tek koloni alınarak lam aglütinasyon yöntemi ile doğrulama yapıldı. Ayrıca çalışmaya alınan tüm suşlar Matriks Aracılı Lazer Dezorpsiyon İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (MALDI TOF MS) (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) ile çalışıldı. Konvansiyonel doğrulamadan sonra örnekler ayrıca *hpd* ve *bexA* genlerine bakılarak moleküler yöntemlerle de doğrulandı. Moleküler yöntemlerle ilgili detaylı bilgiler Moleküler Yöntemler başlığında verildi.

### 3.1.3. Lam Aglütinasyonla Serotiplendirmenin Yapılması

Lam aglütinasyonu serotiplendirmenin yapılması Anabilim Dalımızda ve T.C Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Referans Laboratuvarında yapıldı. Serotiplendirme için kapsüle özgü antiserumlar (BD, Amerika) kullanıldı.

Lam aglütinasyonunda;

1. Çalışılacak örnekler bir gün önceden bölümümüzde çikolata agara inoküle edilerek 18-24 saat inkübe edildi.
2. Üreme gözlenen izolatlardan 300 µl pH'ı 7.3'e ayarlanmış phosphate buffered saline (PBS) içerisinde 1 McFarland bulanıklığında çözelti hazırlandı.
3. Lam üzerine bu çözeltilerden her kapsül tipi için 20 µl damlatılarak üretici talimatlarına göre sulandırılan anti serumlardan 20 µl eklendi.
4. Karışım döndürülerek karıştırıldı ve 1 dakika sonunda lamda aglütinasyon görülmesi pozitif olarak değerlendirildi.

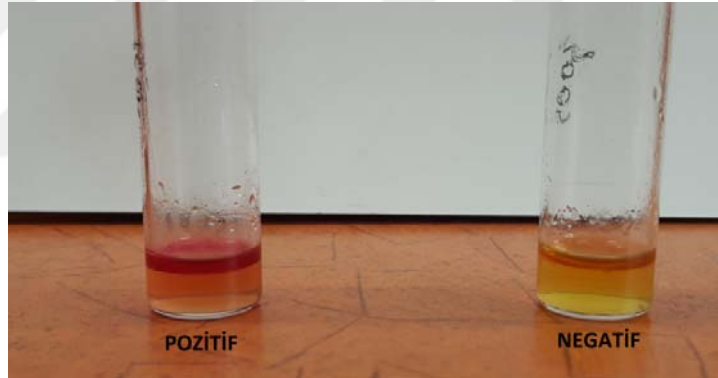


Şekil 3.1. Lam aglütinasyon testi sonuçları.

## 3.2. Biyotiplendirme

### 3.2.1. İndol Testi

1. İndol testi için pH 8 olan 0.05M fosfat tampon çözeltisi ile %0.1'lik triptofan hazırlandı ve 3 ml olarak tüplere dağıtıldı.
2. Yoğun inokülasyon sonrasında 18 saat inkübasyona bırakıldı.
3. Bu sürenin sonunda Kovacs ayracı (BD, ABD) damlatılıp çalkalandı; sarı halka oluşumu negatif, kırmızı halka oluşumu pozitif sonuç olarak değerlendirildi.

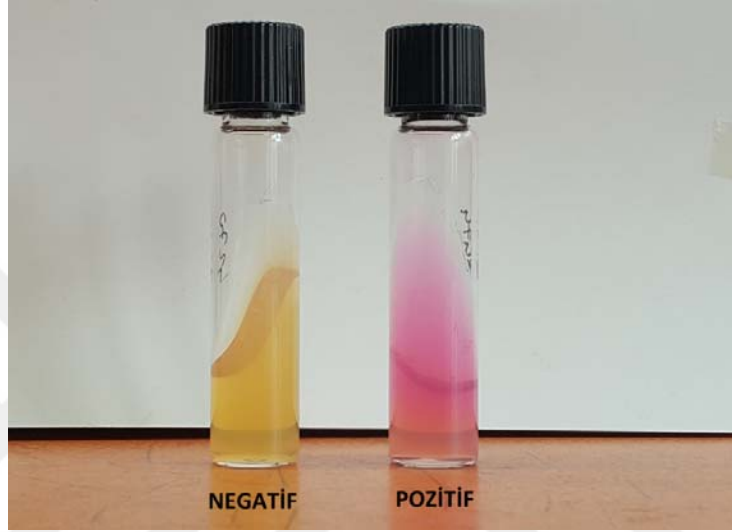


Şekil 3.2. İndol testi sonucu.

### 3.2.2. Üreaz Testi

1. 100 ml'ye %0.1  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , %0.5 NaCl ve %2lik fenol kırmızısı çözeltisinden 5 ml eklenerek hazırlanan üreaz testi pH 7'ye ayarlanıp otoklavlanlandı.
2. Filtrasyonla steril edilen 10 ml suda çözülmüş üre ve agar eklenerek çözelti küçük tüplere dağıtıldı.

- Yoğun bakteri inokülasyonundan sonra tüplerin ağızı tam kapatılmadan 18 saat inkübasyona bırakıldı.
- Besiyerindeki pembe renk pozitif sonuç olarak değerlendirildi.



Şekil 3.3. Üreaz testi sonucu.

### 3.2.3. Ornitin Dekarboksilasyon Testi

- Hazır temin edilen ornitin dekarboksilasyon sıvı besiyerine (BD, Amerika) bakteri inokülasyonu yapıldı.
- Örneklerin üstü steril mineral yağ ile kapatıldıktan sonra 24 saat inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda mavi/mor renk değişimi pozitif sonuç olarak değerlendirildi.



Şekil 3.4. Ornitin dekarboksilasyon testi sonucu.

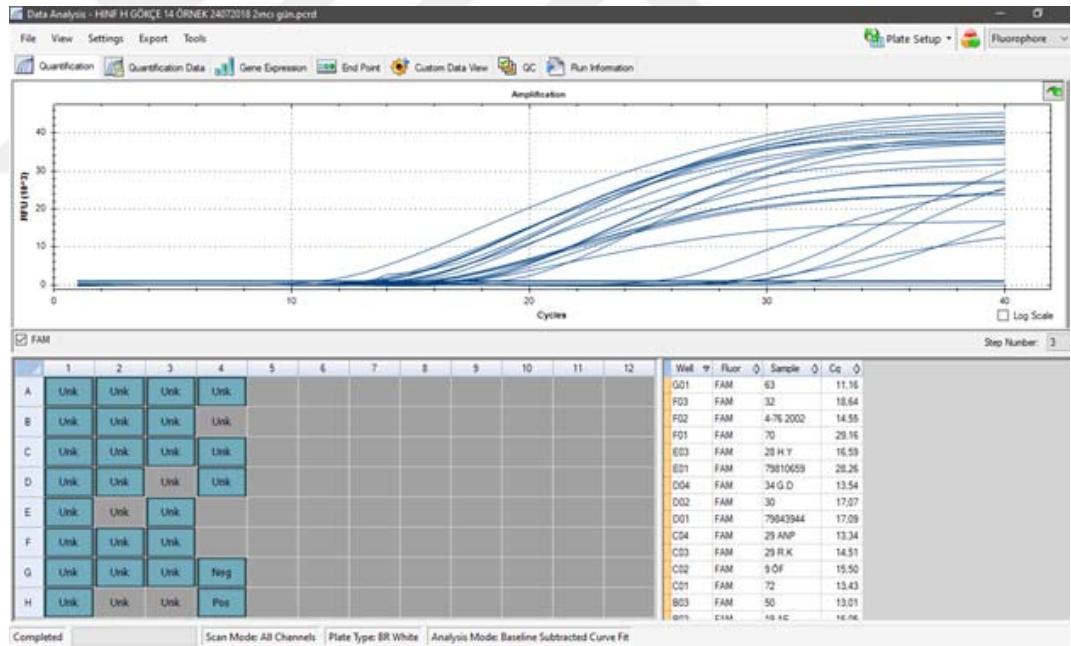
Biyotiplendirme için indol, üreaz ve ornitin testlerinin sonucu Oberhofer ve Sottnek'in yaptığı çalışmaların sonuçlarına göre değerlendirildi (42, 93, 125).

Tablo 3.1. İndol, Üreaz ve Ornitin test sonuçlarına göre biyotip türleri.

Biyotip	İndol	Üreaz	Ornitin
I	+	+	+
II	+	+	-
III	-	+	-
IV	-	+	+
V	+	-	+
VI	-	-	+
VII	+	-	-
VIII	-	-	-

### 3.3. Moleküler Yöntemler

Çalışmanın moleküler yöntemleri T.C Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı, Ulusal Solunum Yolu Patojenleri Referans Laboratuvarında yapıldı. Moleküler yöntemlerin seçilmesinde ve primerlerin tasarlanmasında referans olarak “Centers for Disease Control and Prevention (CDC)”nin yayınladığı kılavuz kullanıldı (126). Gerçek Zamanlı PZR reaksiyonlarının gerçekleştirilmesi için Bio-Rad CFX96 Gerçek Zamanlı PZR Sistemi (Bio-Rad, ABD) kullanıldı ve eşik döngü sayıları ( $C_q$ ) yine sistemin yazılımı kullanılarak belirlendi.  $C_q$  değeri 37'nin altında reaksiyonlar pozitif olarak değerlendirildi.



Şekil 3.5. Gerçek zamanlı PZR sonuçları

### 3.3.1. Kullanılan Primerler

İzole edilen suşların moleküler olarak doğrulamasının yapılabilmesi için *Hpd* gen bölgesine bakılırken mutant b suşların gözden kaçırılmaması için *bexA* gen bölgesine bakıldı. Moleküler olarak serotiplendirilmenin yapılması için kapsül spesifik genlere bakıldı (6,29).

Çalışmada kullanılan primerlerin tasarımı Tablo 3.2.'de verilmektedir.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan primerlerin tasarımı.

Gen Bölgesi	Forward	Reverse	Prob
<i>Hpd</i>	GGTTAAATATGCCGAT GGTGTTG	TGCATCTTTACGCACGGTGTA	TTGTGTACACTCCGT"TTGGT AAAAGAACTTGACAC
<i>ascB</i>	GGTCTGCGGTGTCCTG TGT	CCGGTCATCTTTTATGCTCCAA	TAATTTTCTTGC"TTCAATACC GCCTTCCCA
<i>bcsB</i>	TGATGCATTGAA AGAAGGTGT AATTT	CCTGCGGTAATAACATGATCAT AAA	TGTCGTGCAG"TTAGCAAACC GTAACCTTACTC
<i>ccsD</i>	CATTGGTGATGG TCAGTTATTGG	TACAGCATTTCAGCAATAATGGG	ATTGCA"TT"CGCCGCAGGAGT TCCCG
<i>dcsE</i>	CCTAAAATACGG ACCTAGTGACAC	CCGATGAGACCAAGTATGGTTA	AACGAGC"TT"AGAGCTGGTGC TGAA
<i>ecsH</i>	ACTAAAATATGGCCCA AACCAC	CCGATGAGCCCAAGTATGATG A	AACGAGCAAAAGCCGG"TT"GC GGAT
<i>bexD</i>	CCCTGAAAAGCGTTGA CTTTG	CCAACTTCAGGACCAAGTCATT C	TGCTGCTAAC"TT"TAGATGCA TCAGCTCCTT
<i>bexA*</i>	CTGAATTRGGYGATTA TCTTTATGA	ACAATCAAAYTCAACHGAAAGH GA	AGGGATGAAAGCYCGRCTTG CAT

\**bexA* primerinin tasarlanmasında 29 no'lu referans kullanıldı.

### 3.3.2 DNA İzolasyon Protokolü

1. -20 °C'de molecular grade water (MGW) içerisinde stoklanmış örnekler oda sıcaklığında çözdürüldükten sonra 1 dk vortekslendi.
2. 1,5 ml'lik PZR tüplerinin içerisine 900 µl DNA tamponu (Bio-Speedy, Türkiye) eklendi.
3. Tüplerin üzerine 100 µl örnek konuldu.
4. Tüpler 1 dakika vortekslendi.
5. Örnekler 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
6. Tüplerdeki süpernatant atıldı.
7. Peletin üzerine 250 µl DNA tamponu eklendi.
8. Tüpler 1 dakika vortekslendi.
9. 98 °C ısı bloğunda 10 dakika bekletildi.
10. Örnekler 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
11. Süpernatant alınarak temiz PZR tüplerine aktarıldı.

#### ***hpd* Geninin Gerçek Zamanlı PZR ile Taraması**

İzole edilen suşların moleküler olarak doğrulamaları *hpd* gen bölgesine bakılarak yapıldı. Tarama için *H. influenzae* Gerçek Zamanlı PZR Tarama Kiti (Bio-Speedy, Türkiye) kullanıldı.

### ***hpd* Geninin Gerçek Zamanlı PZR ile Taramasında Kit İçeriği**

Kit içeriği Tablo 3.3'te verilmektedir.

Tablo 3.3. *H. influenzae* gerçek zamanlı PZR tarama kitinin içeriği.

<b>Tüp İsmi</b>	<b>İçerik</b>
2X qPCR Mix	2X qPCR enzim ve tapmon karışımı
Poz- Oligo Mix	<i>Homo sapiens</i> ve pDNA hedefli oligonükleotidler
Hin- Oligo Mix	<i>Haemophilus influenzae</i> hedefli oligonükleotidler

### ***hpd* Geninin Gerçek Zamanlı PZR ile Taramasında PZR Protokolü**

Kit içerisinden çıkan oligo karışımları kullanım kılavuzu doğrultusunda 500 µl 2X qPCR Mix ile sulandırıldı. PZR karışımının içeriği Tablo 3.4.'te verilmektedir.

Tablo 3.4. *H.influenzae* tarama PZR karışımının içeriği.

<b>Malzeme</b>	<b>Miktar</b>
Hin-Oligo Mix	5 µl
DNA	5 µl
Total Konsantrasyon	10 µl

PZR Koşulları: Okumalar kitin kullanım kılavuzu gereği FAM ve HEX kanallarında yapıldı. Amplifikasyon programı Tablo 3.5.'te verilmektedir.

Tablo 3.5. *hpd* geninin gerçek zamanlı PZR ile taramasında amplifikasyon programı.

Ön inkübasyon	95 °C	3 dakika
Denatürasyon	95 °C	10 saniye
Bağlanma/Uzama + Okuma	65 °C	50 saniye

PZR döngüleri yukarıda verilen değerler doğrultusunda ön inkübasyon hariç 40 döngü olarak ayarlandı.

### 3.3.3. *bexA* Geninin Gerçek Zamanlı PZR ile Taranması

Kapsül ifadesinin varlığı *bexA* gen bölgesi taranarak yapıldı (127-129). Tarama için *bexA* Gerçek Zamanlı PZR kiti (Bio-Speedy, Türkiye) kullanıldı.

### ***bexA* Geninin Gerçek Zamanlı PZR ile Taranmasında Kit İçeriği**

Kit içeriği Tablo 3.6'da verilmektedir.

Tablo 3.6. *bexA* tarama kitinin içeriği.

<b>Tüp İsmi</b>	<b>İçerik</b>
2X qPCR Mix	2X qPCR enzim ve tapmon karışımı
<i>bexA</i> - Oligo Mix	<i>bexA</i> hedefli oligonükleotidler

### ***bexA* Geninin Gerçek Zamanlı PZR ile Taranması PZR Protokolü**

PZR karışımının içeriği Tablo 3.7'de verilmektedir.

Tablo 3.7. *bexA* tarama PZR karışımının içeriği.

<b>Malzeme</b>	<b>Miktar</b>
2X qPCR Mix	5 µl
<i>bexA</i> primer-prob	3 µl
DNA	2 µl
Total Konsantrasyon	10 µl

PZR Koşulları: Okumalar kitin kullanım kılavuzu gereği FAM kanalında yapıldı. Amplifikasyon programı Tablo 3.8.'de verildi.

Tablo 3.8. *bexA* geninin gerçek zamanlı PZR ile taramasında amplifikasyon programı.

Ön inkübasyon	95 °C	3 dakika
Denatürasyon	95 °C	10 saniye
Bağlanma/Uzama + Okuma	55 °C	50 saniye

PZR döngüleri yukarıda verilen değerler doğrultusunda ön inkübasyon hariç 40 döngü olarak ayarlandı.

#### 3.3.4. Serotipe özgü genlerin Gerçek Zamanlı PZR ile Taranması

*bexA* tarama pozitif sonuçları gelen izolatların serotiplerinin belirlenmesi, negatif gelenlerin ise daha önceki yayınlarda belirtildiği üzere *Haemophilus influenzae* tip e ve f'nin (Hi e, Hi f) Gerçek Zamanlı PZR ile *bexA* geninde yeterli ışımaya yapmamasından dolayı doğrulama amacıyla serotiplendirmeleri moleküler olarak yapıldı (129-131). Serotipe özgü genlerin taranması sırasında *Haemophilus influenzae* Gerçek Zamanlı PZR Serotiplendirme Kiti (Bio-Speedy, Türkiye) kullanıldı. Pozitif kontrol olarak kalite kontrol suşları her döngüye dahil edildi.

### Serotipe özgü genlerin Gerçek Zamanlı PZR ile Taranmasında Kit İçeriği

Kit içeriği Tablo 3.9.'da verilmektedir.

Tablo 3.9. *Haemophilus influenzae* gerçek zamanlı PZR serotiplendirme kitinin içeriği.

Tüp İsmi	İçerik
2X qPCR Mix	2X qPCR enzim ve tapmon karışımı
HinA – Oligo Mix	<i>Haemophilus influenzae</i> Serotip A hedefli oligonükleotidler
HinB – Oligo Mix	<i>Haemophilus influenzae</i> Serotip B hedefli oligonükleotidler
HinC – Oligo Mix	<i>Haemophilus influenzae</i> Serotip C hedefli oligonükleotidler
HinD – Oligo Mix	<i>Haemophilus influenzae</i> Serotip D hedefli oligonükleotidler
HinE – Oligo Mix	<i>Haemophilus influenzae</i> Serotip E hedefli oligonükleotidler
HinF – Oligo Mix	<i>Haemophilus influenzae</i> Serotip F hedefli oligonükleotidler
NC	Negatif Kontrol Template (Moleküler Ölçekli Su)
PC Hin-SE	Tüm hedefleri içeren DNA dizisi (Plazmid içinde)

### Serotipe özgü genlerin Gerçek Zamanlı PZR ile Taranmasında PZR Protokolü

Kit içerisinde bulunan oligo karışımları kullanım kılavuzu doğrultusunda 500 µl 2X qPCR Mix ile sulandırıldı. PZR karışımının içeriği Tablo 3.10.'da verilmektedir.

Tablo 3.10. *H. influenzae* tarama PZR karışımının içeriği.

Malzeme	Miktar
Serotipe özgü oligo-mix	5 µl
DNA	5 µl
Total Konsantrasyon	10 µl

PZR Koşulları: Okumalar kitin kullanım kılavuzu gereği FAM kanalında yapıldı. Amplifikasyon programı Tablo 3.11.'de verilmektedir.

Tablo 3.11. Serotipe özgü genlerin gerçek zamanlı PZR ile taramasında amplifikasyon programı.

Ön inkübasyon	95 °C	3 dakika
Denatürasyon	95 °C	10 saniye
Bağlanma/Uzama + Okuma	65 °C	50 saniye

PZR döngüleri yukarıda verilen değerler doğrultusunda ön inkübasyon hariç 40 döngü olarak ayarlandı.

### 3.4 *In-vitro* Antimikrobiyal Duyarlılığın Belirlenmesi

Antibiyotik duyarlılık testleri “Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)” önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi. İzolatların antimikrobiyal duyarlılık testleri için CLSI önerilerine göre hazırlanan Haemophilus Test Medium (HTM) (Oxoid, İngiltere) besiyeri kullanıldı (132).

### 3.5.1 Kullanılan Antibiyotikler

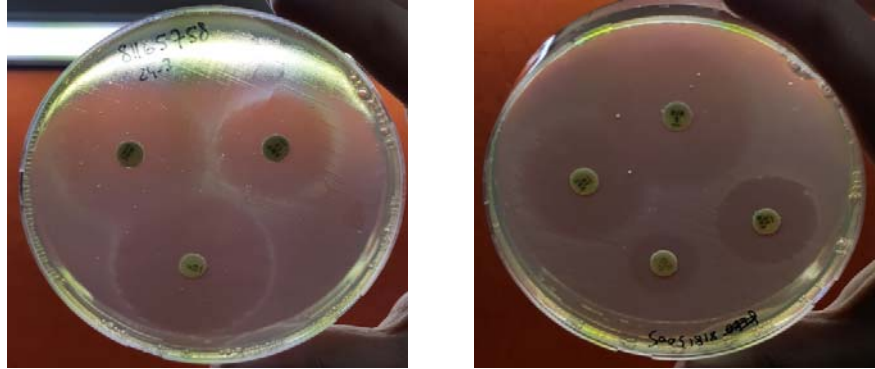
Çalışmada disk diffüzyon yöntemi için ampisilin, ampisilin-sulbaktam, sefuroksim, sefotaksim, klaritromisin, kloramfenikol, tetrasiklin, trimetoprim-sulfametoksazol ve siprofloksasin/moksifloksasin (Oxoid, İngiltere) antibiyotik diskleri kullanıldı. Kullanılan disklerin antibiyotik içerikleri Tablo 3.12’de verilmektedir.

Tablo 3.12. Kullanılan antibiyotikler ve konsantrasyonları.

Antibiyotik	Konsantrasyon
Ampisilin	10 µg
Ampisilin-Sulbaktam	20 µg
Sefuroksim	30 µg
Sefotaksim	30 µg
Klaritromisin	15 µg
Kloramfenikol	30 µg
Tetrasiklin	10 µg
Trimetoprim-sulfametaksazol	25 µg
Siprofloksasin/Moksifloksasin	5 µg

### 3.5.2 İzolatların Hazırlanması

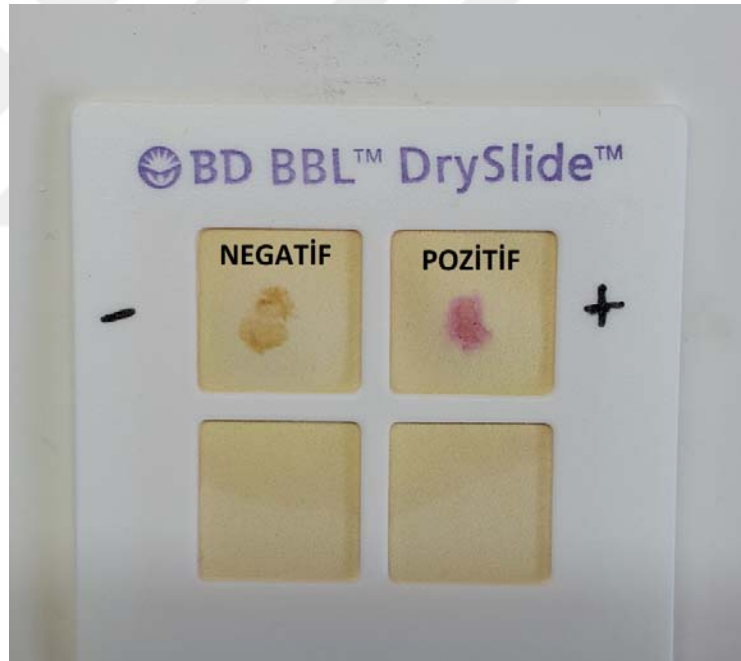
1. Test edilecek izolatlar çikolata agar plaklarına pasajlandı.
2. 24 saat %5'lik CO<sub>2</sub>'li etüvde inkübe edilen besiyerinden, öze yardımı ile alınan birkaç koloniden, 2 ml %0,9 NaCl izotonik serum fizyolojik (SF) içerisinde 0,5 McFarland bulanıklığında süspansiyonlar hazırlandı.
3. Bu süspansiyonlar HTM (Oxoid,İngiltere)'a ekildikten sonra 3 cm ara ile antibiyotik diskleri yerleştirildi.
4. Petriler CLSI önerileri doğrultusunda %5'lik CO<sub>2</sub>'li etüvde 16-18 saat inkübasyona bırakıldı.
5. İnkübasyon süresi sonunda zon çapları ölçülerek CLSI 2019 kılavuzuna göre değerlendirildi (132).



Şekil 3.6. Disk diffüzyon antibiyogram sonucu

### 3.6 $\beta$ -Laktamaz Aktivitesinin Belirlenmesi

1. İzolatların  $\beta$ -laktamaz aktivitelerinin belirlenmesi için BBL DrySlide Nitrocefim (BD, Amerika) kullanıldı.
2. Pastör pipeti ile bir damla distile su Dryslide Nitrocefim üzerine damlatıldıktan sonra üzerine öze ile bakteri inokülasyonu yapıldı.
3. Kullanım kılavuzunun önerisi doğrultusunda sonuçlar beşinci dakikadan sonra bir saat boyunca izlendi, bu sürenin sonunda pembe/mor renk değişimi pozitif sonuç olarak değerlendirildi.



Şekil 3.7.  $\beta$ -laktamaz test sonucu

### 3.7. Biyoistatistiksel Değerlendirme

Sonuçların değerlendirilmesi sırasında R-Studio programından yararlanıldı. Serotiplendirme yöntemlerinin kıyaslanması için R-Studio'da caret kütüphanesi ve Şekil 9.'daki koddan faydalanıldı.

Şekil 3.8. Biyoistatistiksel değerlendirme için R-Studio'da yazılan kod

```
>>> library(caret)
> veri<-read.csv("C:/Users/gokce/Desktop/veri1.csv")
veri$SerotipAglutinasyon<-as.factor(veri$SerotipAglutinasyon.) veri$SerotipMolekuler<-as.factor(veri$Seroti
pMolekuler.) confusionMatrix(veri$SerotipAglutinasyon, veri$SerotipMolekuler., mode = "everything")
```

## 4. BULGULAR

### 4.1 Örneklerin Dağılımı

Çalışma kapsamına 130'u stoktan ve 122'si taze izolat olmak üzere enfeksiyon etkeni olduğu belirlenen 252 suş değerlendirmeye alındı. Suşların yıllara göre dağılımı Tablo 4.1'de verildi.

Tablo 4.1. *H.influenzae*'lerin izole edildiği yılların dağılımı (n: 252).

2001	2002	2006	2009	2010	2017	2018	2019
8	14	21	22	1	53	115	18

Çalışmaya alınan suşların 200'ü balgamdan izole edilirken, bunu bronkoalveolar lavaj ve derin trakeal aspirat izledi (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. *H.influenzae*'nin izole edildiği klinik örneklerin dağılımı (n: 252).

Klinik Örnek	Balgam	BAL <sup>1</sup>	DTA <sup>2</sup>	Kan	Konjonktiva	Püy	Vajen
n	200	22	18	7	2	2	1

<sup>1</sup> BAL: Bronkoalveolar lavaj,

<sup>2</sup> DTA: Derin trakeal aspirasyon

## 4.2. Hastaların Demografik ve Klinik Özellikleri

Çalışmaya dahil edilen hastaların bilgileri toplandığında 252 hastadan 154'ünün (%61,1) erkek, 98'inin (%31,9) kadın olduğu kaydedildi. En genç hastanın 3, en yaşlısının ise 91 yaşında olduğu hastaların yaş ortalaması  $35,1 \pm 23,9$  olarak hesaplandı. Bu hastaların 52'sinin çocuk, 200'ünün ise erişkin poliklinik ve servislere başvurduğu belirlendi. Örneklerin izole edildiği servislere göre dağılımı; %51,6 (n:130)'sı göğüs hastalıkları polikliniği, %29 (n:73)'u dahiliye servisi, %4,8 (n:12)'i acil servis, %4,4 (n:11)'ü yoğun bakım üniteleri, %2,8 (n:7)'i allerji ve immünoloji polikliniği, %1,2 (n:3)'si anestezi birimi ve %4,8 (n:12)'i diğer poliklinikler şeklinde bulundu. 4 hastanın tedavi gördüğü bölüm/servis verisine ulaşamadı.

## 4.3. Serotiplendirme

Konvansiyonel serotiplendirmede 199 (%78,9) suş tiplendirilemeyen olarak saptanırken, bunu 20 suş ile *H.influenzae* tip f (%7,9), 14 suş (%5,6) ile *H.influenzae* tip e ve 12 suş (% 4,8) ile *H.influenzae* tip b takip etti. Moleküler serotiplendirmede ise 169 suş (%66,9) tiplendirilemeyen olarak bulunurken, bunu 38 suş ile (%15,1) *H.influenzae* tip e ve 17 suş ile (%6,8) *H.influenzae* tip b izledi. Lam aglütinasyon ve moleküler yöntemlerle serotiplendirilen suşlar, moleküler yöntem referans alındığında 187 (%74,5) suшта uyumlu bulunurken, kategoriler arasında uyum katsayısı olarak bilinen kappa katsayısı ise R (Sürüm 3.5.1) ile 0,441 hesaplandı (133). Bu katsayıya göre kategoriler arasındaki uyum tesadüf olamayacak şekilde orta düzey olarak yorumlandı. En yüksek uyum %100 ile NTHi'(n:100), en düşük uyum ise Hi c ve Hi d (n:0)'de saptandı (Tablo 4.3). Bulunan verilere ait karşılaştırmalı sonuçlar Tablo 4.4'te verilmektedir.

Tablo 4.3. *H. influenzae* suşlarında moleküler ve konvansiyonel serotiplendirme.

Serotip	Serotiplendirme Yöntemi (n)		Uyum	Özgüllük	Duyarlılık
	Moleküler	Konvansiyonel			
			N	%	%
<b>Hi a</b>	8	1	1	100	12,5
<b>Hi b</b>	17	12	4	97	24
<b>Hi c</b>	4	3	0	99	0
<b>Hi d</b>	3	3	0	99	0
<b>Hi e</b>	38	14	10	98	26
<b>Hi f</b>	12	20	4	93	31
<b>NTHi</b>	169	199	168	64	100

Tablo 4.4. Serotiplendirme sonuçlarının karşılaştırmalı çapraz sonuçları.

			Moleküler							Total	
			Hia	Hib	Hic	Hid	Hie	Hif	NTHi		
Lam Aglutinasyon	Hia	Sayı	1	0	0	0	0	0	0	1	
		Uyum(%)	Moleküler Serotiplendirme ile	12,5	0	0	0	0	0	0	0,4
			Total ile	0,4	0	0	0	0	0	0	0,4
	Hib	Sayı	0	4	0	0	6	2	0	12	
		Uyum(%)	Moleküler Serotiplendirme ile	0	23,5	0	0	15,8	15,4	0	4,8
			Total ile	0	1,6	0	0	2,4	0,8	0	4,8
	Hic	Sayı	0	1	0	0	2	0	0	3	
		Uyum(%)	Moleküler Serotiplendirme ile	0	5,9	0	0	5,3	0	0	1,2
			Total ile	0	0,4	0	0	0,8	0	0	1,2
	Hid	Sayı	0	1	0	0	2	0	0	3	
		Uyum(%)	Moleküler Serotiplendirme ile	0	5,9	0	0	5,3	0	0	1,2
			Total ile	0	0,4	0	0	0,8	0	0	1,2
	Hie	Sayı	2	0	1	0	10	1	0	14	
		Uyum(%)	Moleküler Serotiplendirme ile	25	0	25	0	26,3	7,7	0	5,6
			Total ile	0,8	0	0,4	0	4	0,4	0	5,6
	Hif	Sayı	1	6	1	1	7	4	0	20	
		Uyum(%)	Moleküler Serotiplendirme ile	12,5	35,3	25	33,3	18,4	30,8	0	8
			Total ile	0,4	2,4	0,4	0,4	2,8	1,6	0	8
	NT Hi	Sayı	4	5	2	2	11	6	169	199	
		Uyum(%)	Moleküler Serotiplendirme ile	50	29,4	50	66,7	28,9	46,2	100	78,9
Total ile			1,6	2	0,8	0,8	4,4	2,4	66,9	78,9	

*H. influenzae* suşlarının serotiplendirilmesinin yıllara göre değiştiği ve son yıllarda tiplendirilemeyen *H. influenzae*'lerin giderek arttığı dikkati çekmiştir. Çalışılan suşlarda yıllara göre serotiplerin dağılımı Tablo 4.5'te verilmektedir.

Tablo 4.5. Yıllara göre *H.influenzae*'lerin moleküler serotiplendirmelerinin dağılımı.

Yıllar	Serotip (n)						
	Hi a	Hi b	Hi c	Hi d	Hi e	Hi f	NTHi
2001		6			1		1
2002		5			4		5
2006					2	2	17
2009				1	3	2	16
2010							1
2017	2	2	1	1	10	1	35
2018	5	4	3	1	7	7	79
2019	1				1		15

#### 4.4. Biyotiplendirme Sonuçları

İndol, üreaz ve ornitin dekarboksilasyon testlerinin sonuçlarına göre hastanemizde izole edilen *H.influenzae*'larda en çok biyotip III (%29,8) görülürken bunu, biyotip I (%20,3) ve biyotip II (%18,7) izlediği saptandı(Tablo 4.6).

Tablo 4.6. *H.influenzae*'larda biyotiplendirme sonuçları (n: 252).

Biyotip	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
n(%)	51(20,3)	47(18,7)	75(29,8)	24(9,5)	27(10,7)	21(8,3)	3(1,2)	4(1,6)

Moleküler serotiplerin biyotiplere göre dağılımları (Tablo 4.7) incelendiğinde, NTHi'lerin ağırlıklı olarak Biyotip III'te (%20,2) kümelenildiği gözlemlendi. Bu sonuç istatistiksel olarak incelendiğinde NTHi ile biyotip III arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığı saptandı ( $p>0.05$ ).

Tablo 4.7. Moleküler olarak serotiplendirilen *H.influenzae*'lerin biyotiplendirme sonuçlarına göre dağılımı.

Biyotip	Hi a	Hi b	Hi c	Hi d	Hi e	Hi f	NTHi
I	3	2	-	-	9	2	35
II	2	1	1	2	6	2	33
III	2	5	2	-	8	7	51
IV	1	1	-	-	6	1	15
V	-	6	1	-	3	-	17
VI	-	1	-	1	6	1	12
VII	-	1	-	-	-	-	2
VIII	-	-	-	-	-	-	4

#### 4.5. PZR ile Taranan *bexA* ve *hpd* Gen Bölgelerine Ait Sonuçlar

Çalışmaya alınan 252 örneğin *hpd* gen bölgesi pozitif bulundu. Gerçek zamanlı PZR ile tarama sonucunda 179 (%71) izolatın *bexA* gen bölgesine sahip olmadığı saptandı. Moleküler yöntemlerle serotipi tespit edilemeyen 133 izolatta *bexA* gen bölgesi pozitif bulunurken, serotipi a ve c tespit edilen 3'er örneğin, serotipi d bulunan 2 örneğin, serotipi e bulunan 27 örneğin ve serotipi f tespit edilen 8 örneğin *bexA* gen bölgesi negatif bulundu.

#### 4.6. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları

Çalışmaya dahil edilen 252 örnekten 251 tanesine disk difüzyon yöntemiyle antibiyotik duyarlılık testi uygulandı (Tablo 4.8), 1 izolat HTM besiyerinde 3 kere çalışılmasına rağmen üreme gözlenmedi. Çalışılan suşların direnç oranları sırasıyla; trimetoprim-sulfametoksazol %31,9, tetrasiklin %27,9, klaritromisin %14,8 ve ampisilin %10 şeklinde bulundu.

Tablo 4.8. *H. influenzae*'lerin çalışılan antibiyotiklere karşı in vitro duyarlılık sonuçları (n: 251).

Antibiyotik	Duyarlı	Orta Duyarlı	Dirençli	
	n	n	n	%
Ampisilin	202	24	25	10
Ampisilin-Sulbaktam*	245	-	6	2,4
Sefuroksim	237	8	6	2,4
Sefotaksim*	246	-	5	2
Klaritromisin	189	25	37	14,8
Kloramfenikol	239	4	8	3,2
Tetrasiklin	117	64	70	27,9
Trimetoprim-sulfametoksazol*	171	-	80	31,9
Siprofloksasin/Moksifloksasin*	238	-	13	5,2

\* Bu antibiyotikler için CLSI 2020 kılavuzunda orta duyarlı aralığı bulunmamaktadır.

Çalışılan suşlar içinde 27(%10,8) izolatta  $\beta$ -laktamaz aktivitesi pozitif bulunurken, 27 örneğin 14'ünde  $\beta$ -laktamaz pozitif ampisilin dirençli (BLPAR), 5 örneğin ise  $\beta$ -laktamaz pozitif ampisilin orta duyarlı (BLPAI) olduğu görüldü. Çalışılan 251 izolatın %89,6'sında, ampisilin dirençli 25 izolatın ise %44'ünde (n:11)  $\beta$ -laktamaz aktivitesi negatif tespit edildi. Bu 11 izolat BLNAR izolat olarak kabul edildi. Orta duyarlı 24 ampisilin izolatın ise %79,1 (n:19)  $\beta$ -laktamaz aktivitesi negatif bulundu, bu izolatlar BLNAI (beta lactamase negatif ampisilin intermediate) olarak yorumlandı. Ampisilin- sulbaktama dirençli 6 izolattan ise

3'ünde  $\beta$ -laktamaz aktivitesi pozitif (BLPASR), 3'ünde negatif (BLNASR) tespit edildi. Sonuçlar Tablo 4.9'da verilmektedir.

Tablo 4.9. Ampisilin ve ampisilin-sulbaktam direnci gösteren suşların  $\beta$ -laktamaz aktiviteleri.

	<b><math>\beta</math>-Laktamaz</b>					
	Pozitif			Negatif		
	n	%		n	%	
<b>Ampisilin dirençli (n: 25)</b>	14	56	<b>BLPAR</b>	11	44	<b>BLNAR</b>
<b>Ampisilin orta duyarlı (n: 24)</b>	5	20,8	<b>BLPAI</b>	19	79,2	<b>BLNAI</b>
<b>Ampisilin-sulbaktam dirençli (n: 6)</b>	3	50	<b>BLPASR</b>	3	50	<b>BLNASR</b>

\* BLPAR:  $\beta$ -laktamaz pozitif ampisilin dirençli

\* BLNAR:  $\beta$ -laktamaz negatif ampisilin dirençli

\* BLPAI:  $\beta$ -laktamaz pozitif ampisilin orta duyarlı

\* BLNAI:  $\beta$ -laktamaz negatif ampisilin orta duyarlı

\* BLNASR:  $\beta$ -laktamaz negatif ampisilin sulbaktam dirençli

\* BLPASR:  $\beta$ -laktamaz pozitif ampisilin sulbaktam dirençli

## 5. TARTIŞMA

*H.influenzae* dünya genelinde oluşturduğu enfeksiyon ve mortalite nedeni ile önemli bir insan patojenidir (54). *H. influenzae*'nin özellikle tip b serotipi beş yaş altı çocuklarda pnömoni, menenjit, bakteriyemi ve epiglotit gibi ölümcül olabilen invaziv enfeksiyonlara neden olmaktadır (8). Kapsülsüz suşlar ise erişkinlerde toplum kaynaklı pnömoni, akut orta kulak iltihabı, akut sinüzit ve kronik bronşitin akut alevlenmeleri şeklinde seyretmektedir (1). Tedaviye yön vermesi ve epidemiyolojik çalışmalar açısından *H. influenzae*'nin biyotiplendirmesi ve serotiplendirilmesi önemlidir.

Biyotiplendirmede indol üretimi, ornitin dekarboksilaz ve üreaz testlerine göre *H. influenzae* 8 biyotipe (49) ayrılmaktadır. Sharma ve arkadaşlarının 2002'de Hindistan'da 120 suş ile yaptıkları çalışmada *H.influenzae* biyotip oranlarını biyotip I %35, biyotip II %35,8, biyotip III %16,7, biyotip IV %7,5, biyotip V %4,2, biyotip VII %2,5 dağılımında bulmuşlardır (134). Shuel'in 2010'da Kanada'da 125 suş ile yaptığı çalışmanın sonucundan %54,4 biyotip II ve %25,6 ile biyotip III baskın çıkarken (135), Tsang ve arkadaşları 2016'da Kanada'da 71 suş ile çalışmış ve biyotip dağılımının %70,4 biyotip II ve %21,1 biyotip III olduğunu göstermişlerdir (136). Mojgani ve arkadaşları İran'da çalıştıkları 38 suşun %42,1'inin biyotip II, %18,7'sinin ise biyotip III olduğunu bildirmişlerdir (137). Puig ve arkadaşları 2013'te İspanya'dan yaptıkları yayında, biyotip II yi %39, biyotip III'ü %35,7 ve biyotip I'i ise %16,8 oranında saptamışlardır (138). Shenoy ve arkadaşları ise 2016 yılında 175 *H.influenzae* suşu ile çalıştıklarında ise en fazla biyotip II (%35,4)yi saptamışlar, bunu biyotip III (% 17,8) ve biyotip VII %10,3 takip etmiştir (139). Aynı yıl Collins ve arkadaşları 1377 *H.influenzae* ile çalıştıkları suşlarda en fazla %42,1 oranı ile biyotip II'yi bulurken, bunu %22,2 ile biyotip III'ün izlediğini göstermişlerdir (140). Leon ve arkadaşlarının 2020 yılında yayınlanan 1999-2017 arasında topladıkları 523 suş üzerinde yapılan çalışmasında biyotip dağılımını; biyotip I %29, biyotip II %12, biyotip III %24,

biyotip IV %13 şeklinde göstermişlerdir (141). Ülkemizdeki *H. influenzae*'lerin biyotiplendirilmesiyle ilgili çalışmalar için literatür tarandığında son 10 yıl içerisinde bu konuda çalışma yapılmadığı dikkat çekmiştir. Çalışmamızda izole ettiğimiz *H. influenzae*'larda en çok %29,8 ile biyotip III görülürken, bunu %20,3'le biyotip I ve %18,7'le biyotip II takip etmiştir. Biyotip III'ün daha yüksek oranla görülmesi çalışılan örneklerin çoğunun balgam örneği olması şeklinde yorumlanmıştır. Örneklerin türüne bakıldığı zaman sonuçlarımızın literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür. Ayrıca serotiplendirme sonucu NTHi gelen 169 izolatın %20,2'sinin biyotip III olduğu gözlemlenmiş fakat istatistiksel olarak bir anlam ifade etmediği hesaplanmıştır.

Yapılan çalışmalarda *H. influenzae* suşlarında serotiplendirmenin doğru ve hızlı bir şekilde yapılmasının ampirik antibiyotik seçiminde önemli olduğu bildirilmiştir (142). *H. influenzae* suşlarında serotiplendirme lam aglütinasyon yöntemi veya moleküler yöntemlerle yapılabilmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalar moleküler yöntemlerin lam aglütinasyona göre daha doğru sonuç verdiğini göstermiştir (143, 144). Satola ve arkadaşları *H. influenzae* serotip b (Hib) konjugat aşularının uygulanmasından önce ve sonra invaziv *H. influenzae* izolatları arasında kapsül genlerini analiz ederek serolojik kapsül tiplendirilmesini incelemişlerdir. Bu amaçla 360 *H. influenzae* suşunu lam aglütinasyon ve PZR ile kapsül genlerini analiz ederek serolojik kapsül tiplendirmesini yapmışlar ve araştırmanın sonucunda PZR yönteminin lam aglütinasyon serotiplendirilmesine oranla daha doğru sonuçlar verdiğini tespit etmişlerdir (80).

Silva ve arkadaşları Brezilya'da 93 örnek üzerinde yaptıkları PZR ve lam aglütinasyon karşılaştırma çalışmasında PZR referans yöntem alındığında yöntemler arası uyumu %75,2 bulmuşlardır (144). Benzer olarak LaClaire ve arkadaşlarının ABD'de yaptıkları PZR ve lam aglütinasyon çalışmasında serotiplendirilmeleri yapılan 141 suş için uyum %60 olarak gözlemlenmiştir. Yine aynı çalışmada lam aglütinasyon ve PZR arasında uyum en fazla NTHi, Hie ve Hif arasında izlenmiştir (143).

Shenoy ve arkadaşları ise aşı sonrası dönemde Hindistan'da tekrar yaptıkları bir prevelans çalışmasında 175 izolatın 50'sine PZR ve lam aglütinasyon ile serotiplendirme uygulamışlardır. Bu örneklerin PZR ile sonuçlarının hepsi NTHi bulunurken, lam aglütinasyon ile %92'i NTHi, %4'ü Hib %2'si Hie ve %2'si Hif olarak tiplendirilmiştir (139).

Maaroufi ve arkadaşları *H. influenzae*'nin a'dan f'ye serotiplerine ait gen lokasyonlarının tümünü hedefleyen iki aşamalı gerçek zamanlı bir multipleks PZR geliştirmişler ve 131 *H. influenzae* klinik izolatı kullanılarak, kalitatif PZR testi ile karşılaştırmış ve iki test arasında %98,5'lik bir uyum olduğunu ortaya koymuşlardır. *H. influenzae* serotip a ile c kapsüller tipe özgü referans suşlarının saptanmasının duyarlılığının, e, d ve f serotiplerine olan duyarlılıktan daha yüksek olduğunu bulmuşlardır. Her iki PZR testinin de lam aglütinasyon serotiplendirilmesinden daha güvenilir olduğunu ortaya koymuşlardır (86). Çalışmamızda serotiplendirilmesi PZR ve lam aglütinasyon ile yapılan 252 suştan 187 örnek (%74,5) birbiriyle uyumlu bulunurken, duyarlık %100 ile en fazla NTHi'de gözlenmiş, en az %0 ile Hic ve Hid'de uyum görülmüştür. Konvansiyonel yöntemin yorumlanmasının zorluğundan ve sübjektifliğinden dolayı *H. influenzae* suşlarının serotiplendirilmesi sırasında moleküler yöntemlerin daha doğru ve objektif sonuçlar vereceği düşünülmüştür.

*H. influenzae* serotip b, Kuzey Amerika ve Batı Avrupa'da, konjuge aşuların bir çok ülkede ulusal aşılama planına dahil edilmesinin sonucu olarak çok nadiren bulunmaktadır (145). Son yıllarda yapılan çalışmalarda NTHi serotiplerinin giderek arttığı belirlenmiştir. Hasçelik ve arkadaşlarının 2003-2012 yılları arasında lam aglütinasyonu ile yaptıkları serotiplendirme çalışmasında 125 örneğin %88'i Hib, %4,8'i Hie, %2,4'ü Hid ve %4'ü NTHi bulunmuştur (146). 2016 yılında Gür ve arkadaşları (147) tarafından yürütülen çalışmada serotiplendirilmesi lam aglütinasyon yöntemiyle yapılan 139 *H. influenzae* izolatının sonuçları; %75,5 NTHi, %13,7 Hib, %6,4 Hia, % 1,4 Hid ve Hif, %0,7 Hic ve Hie olarak tespit edilmiştir. 2017 yılında Türkiye Mikrobiyoloji Cemiyeti tarafından yayınlanan

*H.influenzae* çalıştay raporunda da Hib aşılmasının 1990 yılından bu yana dünyada, ülkemizde ise 1 Ocak 2007 tarihinden itibaren rutin olarak yapılmasıyla birlikte izole edilen suşların Hib'den yoğunluklu olarak NTHi'ye sonrasında ise Hia, Hie ve Hif gibi diğer kapsüllü serotiplere kaydığı bildirilmiştir (148).

Sharma ve arkadaşları 2002 senesinde Hindistan'da 120 örnek üzerinde serotiplendirme gerçekleştirmiş ve örneklerin %64'ünü Hib, %34'ünü ise NTHi olarak raporlamışlardır (134). Yamada ve arkadaşlarının 2019 yılında Japonya'da yürüttüğü bir çalışmada serotiplendirilmesi PZR ile yapılan 260 örneğin hepsi NTHi bulunmuşken (149), Adam ve arkadaşları tarafından 2010 yılında Kanada'da yapılan bir çalışmada 1455 izolat ile aşı öncesi ve sonrası dönem karşılaştırılmış, aşı öncesi dönemde Hib %64,9, NTHi ise %29,9 dağılıma sahipken, aşı sonrası dönemde NTHi prevalansı %62,3'e çıkmış, Hib ise %20,4'e düşmüştür. Aynı çalışmada Hib sonrasında en sık görülen serotipler Hif ve Hie olarak gösterilmiştir (150).

Deghmane ve arkadaşlarının 2019 yılında Fransa'da yaptıkları yayında 236 *H.influenzae* serotiplendirilmiş ve %85,2'si NTHi, %5,5'i Hif ve % 4,2'si Hib saptanmıştır (151). Giufre ve arkadaşlarının 2018'de İtalya'da yaptıkları 263 izolat ile yaptıkları çalışmanın sonucunda NTHi oranını %87,5 bulurken, bunu %9,1 ile Hib ve %4,6 ile Hif izlemiştir (152).

Vallejo ve arkadaşları 2019 yılında ABD'de çalıştıkları 61 *H.influenzae*'nin %39,3'ünü NTHi, %29,5'ini Hia, %19,7'sini Hif bulurken (153) Leon ve arkadaşları 2020 yılında Paraguay'da izole edilmiş 523 *H.influenzae*'nin serotiplendirmesi sonucu NTHi'lerin %51,8 oranında bulunduğunu, bunu %43 ile Hib, %1,5 ile Hia ve Hif'in izlediğini tespit etmişlerdir. Leon ve arkadaşları aynı çalışmada ülkelerindeki yüksek Hib oranını Hib aşısının devlet aşılama kapsamında olmamasına bağlamışlardır (141).

Bizim serotiplendirme çalışmamızda izole ettiğimiz 252 örneğin %66,9'u NTHi olarak bulunurken, bunu %15,1 ile Hie, %6,8 Hib ve %4,8 ile Hif izlemiştir. Örneklerimizin çoğunluğunun aşı sonrası döneme ait olması nedeniyle

tiplendirilemeyen suşlarımızdaki artışın literatür ile uyumlu olduğu gözlemlenmiştir. Yine literatüre bakıldığı zaman Avrupa ülkelerinde NTHi sonrası daha çok Hie ve Hif gözlemlenirken (151, 152), Amerika kıtası için daha çok Hia'ya kaydığı görülmüştür (150, 154). Elde ettiğimiz sonuçlar değerlendirildiğinde, NTHi dışında ülkemizde de prevelanstaki değişimin Hie ve Hif'e doğru olduğu saptanmıştır. Gomez de Leon ve arkadaşlarının (145) yaptığı çalışmada NTHi olarak serotiplendirilen izolatların ERIC (enterobacterial repetitive intergenic consensus) sekansları yapıldığında Hib ile aynı sinyalleri vermesi nedeniyle, bu izolatların mutant suşlar olabilecekleri ihtimali üzerinde durulmuştur.

Dünya genelinde yapılan Hib aşılması sonrası her ne kadar invaziv Hib enfeksiyonlarında ciddi bir düşüş yaşanmış olsa dahi, diğer serotipler ve tiplendirilemeyen *H. influenzae* kaynaklı enfeksiyonlarda artış görülmektedir. Çocuklarda, yaşlılarda ve immünsüpresif hastalarda mortalite ve morbidite oranı yüksek olan bu enfeksiyonlarda hızlı ve doğru tedavinin düzenlenmesi önem arz etmektedir. Ampirik tedavinin doğru şekilde düzenlenebilmesi adına *H. influenzae*'nin direnç profilinin değerlendirilmesi gerekmektedir (11, 149, 151-153, 155-159).

Antibiyoqram yaptığımız 251 suşta direnç oranı en yüksek trimetoprim-sulfametoksazol (TMP/SXT)'e karşı (%31,9) bulunmuştur. Literatürde yurtdışında yapılmış çalışmalarda ve SENTRY raporunda bu oran %16-72 arasında değişmektedir (159-164). Ülkemizde yapılmış çalışmalarda TMP/SXT direnci %14-50 arasında tespit edilmiştir (11, 155, 165-167). *H. influenzae* enfeksiyonlarında ampirik tedavi seçiminde yüksek direnç oranlarından dolayı TMP/SXT tercih edilmemektedir.

Trimetoprim-sulfametoksazol sonrası en yüksek direnç tetrasikline (%27,9) karşı gösterilmiştir. Türkiye genelinde yapılan çalışmalarda tetrasiklin direnci %0,8 ile %22 (11, 155) arasında değiştiği gözlemlenirken, yurtdışında

yapılan yayınlarda ve SENTRY raporunda bu oranın %0,8 ile %37,5 arasında olduğu tespit edilmiştir (138, 148, 159, 163, 164, 168).

Yamada ve arkadaşları (149) tarafından 2019 yılında toplam 260 erişkin ve çocuk üzerinde yapılan çalışmada klaritromisin direnci %30,8 bulunurken, Tanaka ve arkadaşlarının (156) aynı yılda yayınladığı 57 suş üzerinde yapılan çalışmada 2007 yılında klaritromisine karşı hiç direnç yok iken, bu oranın 2012 yılında %20,8'e, 2019 yılında ise %52,1'e yükseldiği dikkat çekmiştir. Yurdumuzda Tunçkanat ve arkadaşlarının (155) 2007 yılında yayınladıkları çalışmada 2004-2005 yılları arasında izole edilmiş 379 suşta bu direnç %1,6 olarak bulunurken, Gür ve arkadaşlarının (11) 2008 yılında yayınladıkları 2002-2007 arasında 861 çocuktan izole edilen *H.influenzae*'nin sonuçlarının incelendiği çalışmada direnç %8,3 olarak gösterilmiştir. Çalışmamız kapsamında klaritromisin direnci %14,8 bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda özellikle Uzakdoğu ülkelerinde klaritromisinin yaygın kullanımı nedeniyle yüksek klaritromisin direnci görülürken, ülkemizde yapılan çalışmalarda da klaritromisin direncinin arttığı görülmektedir (149, 156).

*H. influenzae*'larda ampirik tedavide ilk seçeneklerden biri olan ampisilin için direnç oranı çalışmamızda %10 olarak bulunurken, orta duyarlı suşların oranı %9,8 olarak bulunmuştur. Ülkemizde yapılan çalışmalarda ampisilin direnci %2,9 ile %20,9 arasında raporlanmış (11, 155, 165-167), yurtdışında yapılan araştırmalarda ve SENTRY raporunda bu oranlar (11, 149, 151-153, 155-159) %13 ile %91,2 arasında bildirilmiştir. Yine aynı çalışmalarda ampisilin direncinin giderek arttığı vurgulanmıştır. Çalışmamızda literatürle paralel olarak ampisilin direncinde artış gözlenmiştir (11, 155). Yurtdışında yapılan çalışmalarda ampisiline orta duyarlı suşların oranı %1,4 ile %18 arasında gösterilmiştir (149, 153). Hacıseyitoğlu ve Sümerkan'ın (169) 2019 yılında 100 *H.influenzae* izolatu ile yayınladıkları çalışmada ampisilin orta duyarlı suşların oranı %4,3 olarak belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda bu oran %9,6 olarak bulunmuştur. Ülkemizde

yapılan çalışmalarda oranlar arasındaki farklılığın örneklem sayısındaki farklılıktan, yaş ve farklı klinik örnekten kaynaklandığı düşünülmüştür.

$\beta$ -laktamaz negatif ampisilin dirençli (BLNAR) suşların oranı ülkemizde (11, 155, 165-167), %0 ile %7,9 arasındayken, yurtdışında (149-153, 156, 157, 159, 170, 171), %0 ile %60 oranında bulunmuş ve yıllar içerisinde artışa dikkat çekilmiştir. Çalışmamızda daha önceki yayınlarla aynı doğrultuda olacak şekilde BLNAR suş oranı %44 olarak tespit edilmiştir. BLPAR suşlar ülkemizde ve dünya genelinde %5 ile %60 arasında dağılım gösterirken, çalışmamızda da bu sonuçlarla uyumlu olarak BLPAR oranı %56 tespit edilmiştir (11, 149-153, 155-157, 165, 170). Ülkemizde ve dünya genelinde artış eğiliminde olan BLNAR suşlar için Yamada ve arkadaşları (149) yaptıkları çalışmada bu suşların çok ilaca direnç kazanma eğiliminde olduğunu belirtmişlerdir. Bu nedenle BLNAR suşları tespit edildiğinde çoklu antibiyotik direnci yönünden incelenmesinin faydalı olacağını vurgulamışlardır.

*H.influenzae*'larda kinolon direnci bakılan çalışmalarda ülkemizde direnç %1 ile %2,8 (165, 172) arasında saptanırken, bu oran yurtdışında 2010 yılında %0,5, 2017 yılında %11,8 olarak belirtilmiştir (170, 171, 173). Çalışmamızda kinolon grubuna karşı direnç (siprofloksasin/moksifloksasin) %5,2 bulunmuştur. Çalışmalardaki kinolon direncindeki değişkenliğin nedeni olarak; suşların farklı klinik örneklerden, yaş gruplarından ve yıllarda izole edilmiş olması düşünülmüştür.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Daha önceki araştırmalarda elde edilmiş ve bizim de çalışmamızda paralel sonuçlar bulduğumuz verilerin ışığında; *H.influenzae* enfeksiyonlarında Hib aşısı sonrasında dünya çapında serotiplerde değişiklik görülürken, aynı zamanda biyotip ve serotip dağılımında da coğrafyaya göre değişkenlik gösteren bir dağılım olduğu gözlemlenmiştir. Serotiplendirmenin yapılması sırasında ise lam aglütinasyon yerine PZR gibi moleküler kaynaklı yöntemlerin daha duyarlı olduğu saptanmıştır. Gomez de Leon ve arkadaşları (145) yaptıkları çalışmada NTHi olarak serotiplendirilen izolatların Hib ile aynı sinyalleri vermesi nedeniyle b- mutant suşlar olabilecekleri ihtimali üzerinde durulmuştur. Bu nedenle NTHi olarak serotiplenen suşların ileri analizinin yapılmasının, tam bir sonuç elde etmek için gerekli olabileceği düşünülmüştür. *H.influenzae* enfeksiyonlarında değişen serotip dağılımlarının daha iyi tespit edilmesi ve özellikle artış gösteren NTHi'lere karşı aşı çalışmalarının epidemiyolojik verilerle desteklenmesi önemlidir. Ampirik tedavi yaklaşımında daha önce çok sık kullanılan TMP/SXT ve şu an kullanılmakta olan AMP'ye karşı direncin ise yüksek olması nedeniyle, tedavi için uygun ilacın seçimi için bu verilerin göz önünde bulundurulması gerektiği dikkat çekmiştir. Ülkemizde ve dünya genelinde artış eğiliminde olan BLNAR suşlar için Yamada ve arkadaşları yaptıkları çalışmada (149) bu suşların çok ilaca direnç kazanma eğiliminde olduğunu belirtmişlerdir. Bu nedenle rutin laboratuvarlarda da *H.influenzae*'ların  $\beta$ -laktam profilinin incelenmesinin ve çoklu ilaç direnci ile ilişkisinin incelenmesinin faydalı olacağı düşünülmüştür.

## 7. KAYNAKLAR

1. Moxon ER. Haemophilus influenzae. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, ed. Mandell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases Volume 2. New York:: Churchill Livingstone; 1995. 2039-45 p.
2. Berkiten R. Türkiye'de Haemophilus influenzae: Beta-laktamaz pozitifliği ve antibiyotiklere direnç (1987-2002). Ankem Derg. 2004;18:53-60.
3. Kilian M. Genus III. Haemophilus Winslow, Bradhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith 1917, 561 AL. Bergey's manual of systematic bacteriology: Springer; 2005. p. 883-904.
4. Søndergaard 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. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2012;56(9):4958-60.
5. Koneman EW, Allen SD, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. Diagnostic microbiology. The nonfermentative gram-negative bacilli Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers. 1997:253-320.
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. Shively RG, Shigel JT, Peterson EM, Luis M. Typing of Haemophilus influenzae by coagglutination and conventional slide agglutination. Journal of clinical microbiology. 1981;14(6):706-8.
8. Murray P, Baron E, Jorgensen J, Pfaller M, Tenover FC, Tenover FC. (2003) Manual of Clinical Microbiology. ASM, Washington, DC. 2007.
9. Watt JP, Wolfson LJ, O'Brien KL, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, et al. Burden of disease caused by Haemophilus influenzae type b in children

- younger than 5 years: global estimates. *The Lancet*. 2009;374(9693):903-11.
10. Heilmann KP, Rice CL, Miller AL, Miller NJ, Beekmann SE, Pfaller MA, et al. Decreasing prevalence of  $\beta$ -lactamase production among respiratory tract isolates of *Haemophilus influenzae* in the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2005;49(6):2561-4.
  11. Altun B, Gür D. Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesi'nde Klinik Örneklerden İzole Edilen *Haemophilus Influenzae* Suslarının Antibiyotiklere Direnç Durumu (2002-2007)/Antimicrobial Resistance in *Haemophilus Influenzae* Strains Isolated From Various Clinical Samples in Hacettepe University Children's Hospital (2002-2007). *Cocuk Enfeksiyon Dergisi*. 2008;2(2):50.
  12. Inoue M, Farrell DJ, Kaneko K, Akizawa K, Fujita S, Kaku M, et al. Antimicrobial susceptibility of respiratory tract pathogens in Japan during PROTEKT years 1–5 (1999–2004). *Microbial Drug Resistance*. 2008;14(2):109-17.
  13. Torres A, Blasi F, Peetermans W, Viegi G, Welte T. The aetiology and antibiotic management of community-acquired pneumonia in adults in Europe: a literature review. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 2014;33(7):1065-79.
  14. García-Cobos S, Campos J, Cercenado E, Román F, Lázaro E, Pérez-Vázquez M, et al. Antibiotic resistance in *Haemophilus influenzae* decreased, except for  $\beta$ -lactamase-negative amoxicillin-resistant isolates, in parallel with community antibiotic consumption in Spain from 1997 to 2007. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(8):2760-6.
  15. 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.
16. Pfeiffer R. I.—Preliminary Communication on the Exciting causes of Influenza. *British medical journal*. 1892;1(1620):128.
  17. Carpenter RR, Petersdorf RG. The clinical spectrum of bacterial meningitis. *The American journal of medicine*. 1962;33(2):262-75.
  18. Cohen I. La méningite cérébro-spinale septicémique. Université libre de Bruxelles, Faculté de Médecine – Médecine, Bruxelles, 1909.
  19. Erwin A, Munford R. Comparison of lipopolysaccharides from Brazilian purpuric fever isolates and conjunctivitis isolates of *Haemophilus influenzae* biogroup aegyptius. Brazilian Purpuric Fever Study Group. *Journal of clinical microbiology*. 1989;27(4):762-7.
  20. Jin Z, Romero-Steiner S, Carlone GM, Robbins JB, Schneerson R. *Haemophilus influenzae* type a infection and its prevention. *Infection and immunity*. 2007;75(6):2650-4.
  21. Granoff, D. M., Rathore, M. H., Holmes, S. J., Granoff, P. D., & Lucas, A. H. Effect of immunity to the carrier protein on antibody responses to *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. *Vaccine*, 1993; 11, S46-S51.
  22. Brachman, Philip S., and Alfred S. Evans, eds. *Bacterial infections of humans*. Plenum Medical, 1998.
  23. Fothergill LD. Observations on the presence of complement in the cerebrospinal fluid in various pathologic conditions of the central nervous system. *The Journal of Pediatrics*. 1935;6(3):374-81.
  24. Lucas AH, Larrick JW, Reason DC. Variable region sequences of a protective human monoclonal antibody specific for the *Haemophilus*

- influenzae type b capsular polysaccharide. *Infection and immunity*. 1994;62(9):3873-80.
25. PRATHER GW, Smith MH. Chloramphenicol in the Treatment of Hemophilus influenzae Meningitis. *Journal of the American Medical Association*. 1950;143(16):1405-6.
  26. Tietz D. Computer-Assisted Analysis of 2-D Gel Patterns Derived from Agarose Electrophoresis of Conjugated Hib Meningitis Vaccines. 2007.
  27. Clements D, Rouse J, London W, Yancy W, Moggio M, Wilfert C. Antibody response of 18 month old children 1 month and 18 months following Haemophilus influenzae type b vaccine administered singly or with DTP vaccine. *Journal of paediatrics and child health*. 1990;26(1):46-9.
  28. King SD, Wynter H, Ramlal A, Moodie K, Castle D, Kuo J, et al. Safety and immunogenicity of a new Haemophilus influenzae type b vaccine in infants under one year of age. *The Lancet*. 1981;318(8249):705-9.
  29. Berkowitz CD, Ward JI, Meier K, Hendley JO, Brunell PA, Barkin RA, et al. Safety and immunogenicity of Haemophilus influenzae type b polysaccharide and polysaccharide diphtheria toxoid conjugate vaccines in children 15 to 24 months of age. *The Journal of pediatrics*. 1987;110(4):509-14.
  30. Brooks GF BJ, Ornston LN, Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. Haemophilus, Bordetella. *Medical Microbiology*. 20 ed. Norwalk, Connecticut: Appleton-Lange,; 1995.
  31. Hemofilus influenza tip b aşısı. 13.10.2020. Available from: <https://asi.saglik.gov.tr/liste/5-haemophilus-influenzae-tip-b-hibhastal%C4%B1%C4%9F%C4%B1-nedir.html>
  32. Fleischmann R, Adams M, White O. other authors (1995). Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae Rd *Science*.269:496-512.

33. 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.
34. Hasan NA, Young BA, Minard-Smith AT, Saeed K, Li H, Heizer EM, et al. Microbial community profiling of human saliva using shotgun metagenomic sequencing. *PLoS One*. 2014;9(5).
35. Pr M. rosenthal KS, Pfaller MA, editors. *Medical microbiology 6th ed* Canada: Elsevier. 2009:333.
36. Cherry J, Heininger U, Feigin R, Demmler G, Kaplan S. Pertussis and other *Bordetella* infections. *Textbook of pediatric infectious diseases*. Philadelphia, Pa.: The WB Saunders Co; 2004.
37. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases: 2-volume set*: Elsevier Health Sciences; 2014.
38. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Tıbbi Mikrobiyoloji*. 6. Baskı. Özinel MA (çeviren). 2010:357-63.
39. Nørskov-Lauritsen N. Classification, identification, and clinical significance of *haemophilus* and *aggregatibacter* species with host specificity for humans. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27:214–40.
40. Kilian M. A taxonomic study of the genus *Haemophilus*, with the proposal of a new species. *Microbiology*. 1976;93(1):9-62.
41. Nørskov-Lauritsen N, Bruun B, Kilian M. Multilocus sequence phylogenetic study of the genus *Haemophilus* with description of *Haemophilus pittmaniae* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2005;55(1):449-56.
42. Brenner D, Mayer L, Carlone G, Harrison L, Bibb W, Brandileone M, et al. Biochemical, genetic, and epidemiologic characterization of *Haemophilus*

- influenzae biogroup aegyptius (*Haemophilus aegyptius*) strains associated with Brazilian purpuric fever. *Journal of clinical microbiology*. 1988;26(8):1524-34.
43. Kilian M, Poulsen K, Lomholt H. Evolution of the paralogous hap and iga genes in *Haemophilus influenzae*: evidence for a conserved hap pseudogene associated with microcolony formation in the recently diverged *Haemophilus aegyptius* and *H. influenzae* biogroup aegyptius. *Molecular microbiology*. 2002;46(5):1367-80.
  44. Hasegawa K, Kobayashi R, Takada E, Ono A, Chiba N, Morozumi M, et al. High prevalence of type b  $\beta$ -lactamase-non-producing ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* in meningitis: the situation in Japan where Hib vaccine has not been introduced. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006;57(6):1077-82.
  45. Control CfD, Prevention. Impact of vaccines universally recommended for children--United States, 1990-1998. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 1999;48(12):243.
  46. Forbes BA SD, Weissfeld AS. *Diagnostic Microbiology*. 12 ed. Missouri: Mosby Elseiver; 2007.
  47. Bilgehan H, Bilgehan H. *Klinik mikrobiyolojik tanı: Fakülteler Kitapevi, Barış yayınları*; 2009.
  48. Aşık BL, Torun DMM. *Pseudomonas ve Acinetobacter Klinik İzolatlarında Metallo-beta-laktamaz Üretiminin Araştırılması*. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 2014; 44(1):23-27,
  49. Gilsdorf JR, Marrs CF, Foxman B. *Haemophilus influenzae*: genetic variability and natural selection to identify virulence factors. *Infection and immunity*. 2004;72(5):2457-61.
  50. Yenen OŞ ÖB. *Haemophilus influenzae* infeksiyonları. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri,; 2008.



60. Dworkin MS, Park L, Borchardt SM. The changing epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* disease, especially in persons  $\geq$  65 years old. *Clinical Infectious Diseases*. 2007;44(6):810-6.
61. Potts T, Zambon J, Genco R. Reassignment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to the Genus *Haemophilus* as *Haemophilus actinomycetemcomitans* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1985;35(3):337-41.
62. Faden H, Duffy L, Williams A, Pediatrics TW, Krystofik DA, Wolf J. Epidemiology of nasopharyngeal colonization with nontypeable *Haemophilus influenzae* in the first 2 years of life. *Journal of Infectious Diseases*. 1995;172(1):132-5.
63. Raymond J, Armand-Lefevre L, Moulin F, Dabernat H, Commeau A, Gendrel D, et al. Nasopharyngeal colonization by *Haemophilus influenzae* in children living in an orphanage. *The Pediatric infectious disease journal*. 2001;20(8):779-84.
64. Karlowsky JA, Critchley IA, Blosser-Middleton RS, Karginova EA, Jones ME, Thornsberry C, et al. Antimicrobial surveillance of *Haemophilus influenzae* in the United States during 2000-2001 leads to detection of clonal dissemination of a  $\beta$ -lactamase-negative and ampicillin-resistant strain. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(3):1063-6.
65. Takala AK, Eskola J, Leinonen M, Kayhty H, Nissinen A, Pekkanen E, et al. Reduction of Oropharyngeal Carriage of *Haemophilus influenzae* Type b (Rib) in Children Immunized with an Rib Conjugate Vaccine. *Journal of Infectious Diseases*. 1991;164(5):982-6.
66. Barbour ML. Conjugate vaccines and the carriage of *Haemophilus influenzae* type b. *Emerging infectious diseases*. 1996;2(3):176.
67. Farley MM, Stephens DS, Brachman PS, Harvey RC, Smith JD, Wenger JD. Invasive *Haemophilus influenzae* disease in adults: a prospective,

- population-based surveillance. *Annals of internal medicine*. 1992;116(10):806-12.
68. Kostman JR, Sherry BL, Fligner CL, Egaas S, Sheeran P, Baken L, et al. Invasive *Haemophilus influenzae* infections in older children and adults in Seattle. *Clinical infectious diseases*. 1993;17(3):389-96.
69. Topçu AW SG, Doğanay M. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; 2002.
70. Leibovitz E, Jacobs MR, Dagan R. *Haemophilus influenzae*: a significant pathogen in acute otitis media. *The Pediatric infectious disease journal*. 2004;23(12):1142-52.
71. Rosenfeld RM, Culpepper L, Doyle KJ, Grundfast KM, Hoberman A, Kenna MA, et al. Clinical practice guideline: otitis media with effusion. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2004;130(5):S95-S118.
72. Hacımustafaoğlu MK. Çocuklarda İnvaziv *H. influenzae* Tip b Enfeksiyonları. *Güncel Pediatri*.4(1):114-7.
73. Shinjoh M, Iwata S, Yagihashi T, Sato Y, Akita H, Takahashi T, et al. Recent trends in pediatric bacterial meningitis in Japan—a country where *Haemophilus influenzae* type b and *Streptococcus pneumoniae* conjugated vaccines have just been introduced. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2014;20(8):477-83.
74. Levine OS, Schwartz B, Pierce N, Kane M. Development, evaluation and implementation of *Haemophilus influenzae* type b vaccines for young children in developing countries: current status and priority actions. *The Pediatric infectious disease journal*. 1998;17(9):S95-S113.
75. Bostancı I, Aral YZ, Atlı Ö, Türkoğlu Ö, Dallar Y, sb ae. Ülkemizde Rutin Aşılama Programına *H. influenzae* tip b aşısı eklenmeli mi? Menenjit ve Epiglottitli İki Olgu Sunumu. *Gülhane Tıp Dergisi*, 2004; 46 (1) : 47 - 49.

76. Millar EV, O'Brien KL, Watt JP, Lingappa J, Pallipamu R, Rosenstein N, et al. Epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* type A disease among Navajo and White Mountain Apache children, 1988–2003. *Clinical infectious diseases*. 2005;40(6):823-30.
77. Akbulut H. Konya il merkezinde bulunan sağlık kurumlarında üst solunum yolu teşhisi ile düzenlenen reğetelerin akılcı ilaç kullanımı yönünden değerlendirilmesi: Selęuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 2008.
78. Budak, F, Gür, D. Klinik örneklerden izole edilen *Haemophilus influenzae* suşlarının çeşitli antimikrobik ilaçlara in-vitro duyarlılığı. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 2003; 37.1: 19-25.
79. Goldenberg DL. Septic arthritis. *The Lancet*. 1998;351(9097):197-202.
80. Bottone EJ, Zhang DY. *Haemophilus parainfluenzae* biliary tract infection: rationale for an ascending route of infection from the gastrointestinal tract. *Journal of clinical microbiology*. 1995;33(11):3042-3.
81. Bayraktar M, Onal C, Durmaz B, Yakinci C, Sonmezgoz E. *Haemophilus aphrophilus* brain abscess in the first decade. *Indian journal of medical microbiology*. 2005;23(4):259.
82. Bangsberg JM, Tvede M, Skinhøj P. *Haemophilus segnis* endocarditis. *Journal of Infection*. 1988;16(1):81-5.
83. Wallace Jr R, Musher D, Septimus E, McGowan Jr J, Quinones F, Wiss K, et al. *Haemophilus influenzae* infections in adults: characterization of strains by serotypes, biotypes, and  $\beta$ -lactamase production. *Journal of Infectious Diseases*. 1981;144(2):101-6.
84. Catlin B, BENDLER III J, Goodgal S. The type b capsulation locus of *Haemophilus influenzae*: map location and size. *Microbiology*. 1972;70(3):411-22.

85. Lâm T-T, Claus H, Frosch M, Vogel U. Analysis of non-typeable *Haemophilus influenzae* in invasive disease reveals lack of the capsule locus. *Clinical Microbiology and Infection*. 2016;22(1):63. e7-. e8.
86. Gonin P, Lorange M, Delage G. Performance of a multiplex PCR for the determination of *Haemophilus influenzae* capsular types in the clinical microbiology laboratory. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2000;37(1):1-4.
87. Rennie R, Gordon T, Yaschuk Y, Tomlin P, Kibsey P, Albritton W. Laboratory and clinical evaluations of media for the primary isolation of *Haemophilus* species. *Journal of clinical microbiology*. 1992;30(8):1917-21.
88. Barry AL, Fuchs P, Pfaller M. Susceptibilities of beta-lactamase-producing and-nonproducing ampicillin-resistant strains of *Haemophilus influenzae* to ceftibuten, cefaclor, cefuroxime, cefixime, cefotaxime, and amoxicillin-clavulanic acid. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1993;37(1):14-8.
89. Tristram S, Jacobs MR, Appelbaum PC. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clinical microbiology reviews*. 2007;20(2):368-89.
90. Inoue S, Watanuki Y, Miyazawa N, Kudo M, Sato T, Kobayashi N, et al. High frequency of  $\beta$ -lactamase-negative, ampicillin-resistant strains of *Haemophilus influenzae* in patients with chronic bronchitis in Japan. *Journal of infection and chemotherapy*. 2010;16(1):72-5.
91. Tristram SG. Novel bla TEM-positive ampicillin-susceptible strains of *Haemophilus influenzae*. *Journal of infection and chemotherapy*. 2009;15(5):340.
92. Farrell D, Morrissey I, Bakker S, Buckridge S, Felmingham D. Global distribution of TEM-1 and ROB-1  $\beta$ -lactamases in *Haemophilus influenzae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005;56(4):773-6.
93. Nakamura S, Yanagihara K, Morinaga Y, Izumikawa K, Seki M, Takeya H, et al. Multiplex real-time polymerase chain reaction for rapid detection of  $\beta$ -

- lactamase–negative, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2009;64(1):64-9.
94. Bae S, Lee J, Lee J, Kim E, Lee S, Yu J, et al. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae* respiratory tract isolates in Korea: results of a nationwide acute respiratory infections surveillance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(1):65-71.
  95. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*. 1940;146(3713):837-.
  96. Del Bene VE, Farrar WE. Cephalosporinase activity in *Bacteroides fragilis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1973;3(3):369-72.
  97. Montgomery K, Raymundo Jr L, Drew W. Chromogenic cephalosporin spot test to detect beta-lactamase in clinically significant bacteria. *Journal of clinical microbiology*. 1979;9(2):205.
  98. Isenberg HD. *Clinical microbiology procedures handbook: American Society of Microbiology*; 1992.
  99. Baron E, Peterson L, Finegold S. *Baily and Scots Diagnostic Microbiology*, 9th edn Mosby-year Book. USA; 1994.
  100. O'Callaghan CH, Morris A, Kirby SM, Shingler A. Novel method for detection of  $\beta$ -lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1972;1(4):283-8.
  101. Lee DT, Rosenblatt JE. A comparison of four methods for detecting  $\beta$ -lactamase in anaerobic bacteria. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 1983;1(2):173-5.
  102. Standards NCfCL, Barry AL. *Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: approved guideline: National Committee for Clinical Laboratory Standards Wayne, PA*; 1999.

103. Clinical, Institute LS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria: informational supplement: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI); 2009.
104. Sağlığı Ç, Hacımustafaoğlu M. İnvaziv H. influenzae tip b enfeksiyonları; klinik ve tedavi. 2004.
105. Alpert G, Campos JM, Smith DR, Barenkamp SJ, Fleisher GR. Incidence and persistence of Haemophilus influenzae type b upper airway colonization in patients with meningitis. The Journal of pediatrics. 1985;107(4):555-7.
106. Çocuk Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (Krup sendromları ve Akut epiglottit); Üst solunum yolu enfeksiyonları çalışma grubu raporu. . İstanbul; 2002.
107. Li KI, Wald ER. Use of rifampin in Haemophilus influenzae type b infections. American Journal of Diseases of Children. 1986;140(4):381-5.
108. Slack MPE, Borriello SP, MPvFG. Haemophilus. Microbiology & Microbial Infection 2005; 65:1393-5.
109. Brooks G. Mycoplasmas & cell wall-defective bacteria. U: Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morsa SA, Mietzner TA, ur. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. New York: McGraw-Hill Companies, Inc; 2010.
110. Goldwater PN. Effect of cefotaxime or ceftriaxone treatment on nasopharyngeal Haemophilus influenzae type b colonization in children. Antimicrobial agents and chemotherapy. 1995;39(9):2150-2.
111. Daum RS. Haemophilus influenzae. Nelson Textbook of Pediatrics 18th ed Philadelphia: WB Saunders Company. 2007:1173-7.
112. Şaşmaz T, Tanır F, Demirhindi H, Aytaç N, Akbaba M. Adana Doğankent Beldesi'nde 0-3 Yaş Arasındaki Çocukların Anne Sütü Alma Durumunun Araştırılması. Beslenme ve Diyet Dergisi. 2001;30(3):29-34.

113. Granoff DM, Munson RS. Prospects for prevention of Haemophilus influenzae type b disease by immunization. *Journal of Infectious Diseases*. 1986;153(3):448-61.
114. Holmes SJ, Granoff DM. The biology of Haemophilus influenzae type b vaccination failure. *Journal of Infectious Diseases*. 1992;165(Supplement\_1):S121-S8.
115. Black SB, Shinefield HR, Fireman B, Hiatt R. Safety, immunogenicity, and efficacy in infancy of oligosaccharide conjugate Haemophilus influenzae type b vaccine in a United States population: possible implications for optimal use. *Journal of Infectious Diseases*. 1992;165(Supplement\_1):S139-S43.
116. Poyrazoğlu Ő GGR, 1999; Mart:6-9. Haemophilus influenzae tip B aşıları.: Rapel; 1999.
117. F. K. Orak hücre anemilerinde H. influenzae tip b ve S. pneumonia kapsül polisakkarit antijenlerine karşı aşı ile uyarılan immün cevabın araştırılması. Adana: Çukurova Üniversitesi 1996.
118. Siber GR, Thompson C, Reid GR, Almeida-Hill J, Zacher B, Wolff M, et al. Evaluation of bacterial polysaccharide immune globulin for the treatment or prevention of Haemophilus influenzae type b and pneumococcal disease. *Journal of Infectious Diseases*. 1992;165(Supplement\_1):S129-S33.
119. Silfverdal S-A, Bodin L, Olcén P. Protective effect of breastfeeding: an ecologic study of Haemophilus influenzae meningitis and breastfeeding in a Swedish population. *International journal of epidemiology*. 1999;28(1):152-6.
120. Glezen WP, Englund JA, Siber GR, Six HR, Turner C, Shriver D, et al. Maternal immunization with the capsular polysaccharide vaccine for Haemophilus influenzae type b. *Journal of Infectious Diseases*. 1992;165(Supplement\_1):S134-S6.

121. Mulholland K, Suara RO, Siber G, Robertson D, Jaffar S, N'Jie J, et al. Maternal immunization with Haemophilus influenzae type b polysaccharide—tetanus protein conjugate vaccine in The Gambia. *Jama*. 1996;275(15):1182-8.
122. M. B. Haemophilus Influenzae Tip B: İmmünoloji Ve Epidemiyolojisi. *ANKEM Derg*. 2003;17:28-288.
123. Akcakaya N, Torun M, Söylemez Y, Sevme R, Çokuğraş H, Ergin S, et al. Incidence of H. influenzae in a day-care center. *The Turkish journal of pediatrics*. 1996;38(3):289-93.
124. “Aşıyla Hastalıkları Aşıyoruz” 20.04.2020 Available from: <https://www.millipediatri.org.tr/Custom/Upload/files/asilama.pdf>.
125. Messing M, Sottnek FO, Biddle JW, Schlater LK, Kramer MA, Kraus SJ. Isolation of Haemophilus species from the genital tract. *Sexually transmitted diseases*. 1983;10(2):56-61.
126. PCR for Detection and Characterization of Bacterial Meningitis Pathogens: Neisseria meningitidis, Haemophilus influenzae, and Streptococcus pneumoniae. Retrieved from <https://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt10-pcr.pdf>;
127. Maaroufi Y, De Bruyne J-M, Heymans C, Crokaert F. Real-time PCR for determining capsular serotypes of Haemophilus influenzae. *Journal of clinical microbiology*. 2007;45(7):2305-8.
128. Kroll J, Loynds B, Brophy L, Moxon E. The bex locus in encapsulated Haemophilus influenzae: a chromosomal region involved in capsule polysaccharide export. *Molecular microbiology*. 1990;4(11):1853-62.
129. Law DK, Tsang RS. Real-time polymerase chain reaction for detection of encapsulated Haemophilus influenzae using degenerate primers to target the capsule transport gene bexA. *Canadian journal of microbiology*. 2013;59(5):359-61.

130. Sam I-C, 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.
131. Kapogiannis BG, Satola S, Keyserling HL, Farley MM. Invasive infections with *Haemophilus influenzae* serotype a containing an IS 1016-*bexA* partial deletion: possible association with virulence. *Clinical Infectious Diseases*. 2005;41(11):e97-e103.
132. CLSI Microbiology: 2018 AST Packages.: <https://clsi.org/global-training-old/2018-ast-packages/>; 2019 [
133. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data *biometrics*. 1977:159-74.
134. Sharma A, Kaur R, Ganguly N, Singh P, Chakraborti A. Subtype distribution of *Haemophilus influenzae* isolates from north India. *Journal of medical microbiology*. 2002;51(5):399-404.
135. Shuel M, Law D, Skinner S, Wylie J, Karlowsky J, Tsang RS. Characterization of nontypeable *Haemophilus influenzae* collected from respiratory infections and invasive disease cases in Manitoba, Canada. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. 2010;58(2):277-84.
136. Tsang RS, Li YA, Mullen A, Baikie M, Whyte K, Shuel M, et al. Laboratory characterization of invasive *Haemophilus influenzae* isolates from Nunavut, Canada, 2000–2012. *International journal of circumpolar health*. 2016;75(1):29798.
137. Mojgani N, Rahbar M, Taqizadeh M, Ashtiani MP, Mohammadzadeh M. Biotyping, capsular typing, and antibiotic resistance pattern of *Haemophilus influenzae* strains in Iran. *Japanese journal of infectious diseases*. 2011;64(1):66-8.

138. Puig C, Calatayud L, Martí S, Tubau F, Garcia-Vidal C, Carratalà J, et al. Molecular epidemiology of nontypeable *Haemophilus influenzae* causing community-acquired pneumonia in adults. *PloS one*. 2013;8(12):e82515.
139. Shenoy PA, Chawla K, Vishwanath S, Shaw D. Microbiological Characterization of *Haemophilus influenzae* Isolated from Patients with Lower Respiratory Tract Infections in a Tertiary Care Hospital, South India. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*. 2016;10(5):DC31.
140. Collins S, Vickers A, Ladhani SN, Flynn S, Platt S, Ramsay ME, et al. Clinical and molecular epidemiology of childhood invasive nontypeable *Haemophilus influenzae* disease in England and Wales. *The pediatric infectious disease journal*. 2016;35(3):e76-e84.
141. León ME, Kawabata A, Nagai M, Rojas L, Chamorro G, Zárata N, et al. Epidemiologic study of *Haemophilus influenzae* causing invasive and non-invasive disease in Paraguay (1999–2017). *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica (English ed)*. 2020.
142. Best Practices for Use of Polymerase Chain Reaction (PCR) for Diagnosing *Haemophilus influenzae* and *Neisseria meningitidis* Disease and Public Health Importance of Identifying Serotype/Serogroup [Internet]. 2020.
143. 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.
144. Silva ME, Silva Pd, Medeiros MI, Neme SN, Macedo C, Marin JM. Comparison of two slide agglutination serotyping methods and PCR-based capsule typing for the characterization of *Haemophilus influenzae* serotypes. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2006;37(1):39-41.
145. Gomez-De-Leon P, Santos JI, Caballero J, Gomez D, Espinosa LE, Moreno I, et al. Genomic variability of *Haemophilus influenzae* isolated from Mexican

- children determined by using enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences and PCR. *Journal of clinical microbiology*. 2000;38(7):2504-11.
146. Hasçelik G, Kittana FA. Investigation of serotype distribution and antibiotic susceptibility in  $\beta$ -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* strains from adult patients. *International Journal of Infectious Diseases*. 2018;73:130.
147. Budak F, Ocak Z, Gür D. Prevalence and Genotypic Characteristics of  $\beta$ -lactamase Negative-Ampicillin-Resistant (BLNAR) *Haemophilus Influenzae* in a Children's Hospital in Turkey. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2016;36(2).
148. Torun MM. *H. influenzae* Çalıştay Raporu 2017 [Available from: [https://www.tmc-online.org/userfiles/file/H\\_influenzae\\_CALISTAY\\_RAPORU\\_2017.pdf](https://www.tmc-online.org/userfiles/file/H_influenzae_CALISTAY_RAPORU_2017.pdf)].
149. Yamada S, Seyama S, Wajima T, Yuzawa Y, Saito M, Tanaka E, et al.  $\beta$ -Lactamase-non-producing ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* is acquiring multidrug resistance. *Journal of infection and public health*. 2020;13(4):497-501.
150. Adam H, Richardson S, Jamieson F, Rawte P, Low D, Fisman D. Changing epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* in Ontario, Canada: evidence for herd effects and strain replacement due to Hib vaccination. *Vaccine*. 2010;28(24):4073-8.
151. 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.
152. Giufrè M, Fabiani M, Cardines R, Riccardo F, Caporali MG, D'Ancona F, et al. Increasing trend in invasive non-typeable *Haemophilus influenzae* disease and molecular characterization of the isolates, Italy, 2012–2016. *Vaccine*. 2018;36(45):6615-22.

153. Vallejo JG, McNeil JC, Hultén KG, Sommer LM, Dunn JJ, Kaplan SL. Invasive *Haemophilus influenzae* disease at Texas Children's Hospital, 2011 to 2018. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. 2019;38(9):900-5.
154. Ulanova M, Tsang RS. *Haemophilus influenzae* serotype a as a cause of serious invasive infections. *The Lancet Infectious Diseases*. 2014;14(1):70-82.
155. 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.
156. Tanaka E, Hara N, Wajima T, Ochiai S, Seyama S, Shirai A, et al. Emergence of *Haemophilus influenzae* with low susceptibility to quinolones and persistence in tosufloxacin treatment. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2019;18:104-8.
157. 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.
158. Hoban D, Felmingham D. The PROTEKT surveillance study: antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* from community-acquired respiratory tract infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2002;50(suppl\_2):49-59.
159. Johnson D, Sader H, Fritsche T, Biedenbach D, Jones RN. Susceptibility trends of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* against orally administered antimicrobial agents: five-year report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2003;47(1):373-6.

160. Wang S, Tafalla M, Hanssens L, Dolhain J. A review of *Haemophilus influenzae* disease in Europe from 2000–2014: challenges, successes and the contribution of hexavalent combination vaccines. *Expert Review of Vaccines*. 2017;16(11):1095-105.
161. Tsang RS, Proulx J-F, Hayden K, Shuel M, Lefebvre B, Boisvert A-A, et al. Characteristics of invasive *Haemophilus influenzae* serotype a (Hia) from Nunavik, Canada and comparison with Hia strains in other North American Arctic regions. *International Journal of Infectious Diseases*. 2017;57:104-7.
162. Harrison CJ, Woods C, Stout G, Martin B, Selvarangan R. Susceptibilities of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, including serotype 19A, and *Moraxella catarrhalis* paediatric isolates from 2005 to 2007 to commonly used antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009;63(3):511-9.
163. Ginsburg AS, Tinkham L, Riley K, Kay NA, Klugman KP, Gill CJ. Antibiotic non-susceptibility among *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* isolates identified in African cohorts: a meta-analysis of three decades of published studies. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2013;42(6):482-91.
164. Senok A, Al-Zarouni M, Al-Najjar J, Nublusi A, Panigrahi D. Antimicrobial resistance among *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* isolates in the United Arab Emirates: 2004-2006. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2007;1(03):296-302.
165. Hazırolan G, Gür H. "Haemophilus Influenzae Suşlarının Antibiyotik Direnç Profilleri ve Beta Laktamaz Aktivitesi," 1. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, 2019
166. Nevzat Ü, GÜNEY AK, YANIK K, EROĞLU C, GÜNAYDIN M. Comparison of in vitro susceptibility of *Haemophilus influenzae* strains to various



- antimicrobial drugs. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*. 2013;30(2):165-9.
167. Ilki A, Sağıroğlu P, Elgörmüş N, Söyletir G. Trends in antibiotic susceptibility patterns of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* isolates: four years follow up. *Mikrobiyoloji Bulteni*. 2010;44(2):169-75.
168. 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.
169. HACİSEYİTOğLU D, Sümerkan B. Klinik örneklerden izole edilen *Haemophilus influenzae* suşlarının serotiplendirilmesi ve bazı antimikrobiyallere duyarlılık durumlarının araştırılması. *Ortadoğu Tıp Dergisi*. 2019;11(4):497-503.
170. Aguirre-Quiñonero A, Canut A. Ciprofloxacin resistance in nontypable *Haemophilus influenzae* clinical isolates. *Enferm infecc microbiol clín*(Ed impr). 2019:139-40.
171. Nagatomo Y, Shirakura T, Fukuchi K, Takuma T, Tokimatsu I, Niki Y. Monitoring quinolone resistance due to *Haemophilus influenzae* mutations (2012–17). *bioRxiv*. 2019:632869.
172. Shooraj F, Mirzaei B, Mousavi SF, Hosseini F. Clonal diversity of *Haemophilus influenzae* carriage isolated from under the age of 6 years children. *BMC research notes*. 2019;12(1):1-7.
173. Yanagihara K, Watanabe A, Aoki N, Matsumoto T, Yoshida M, Sato J, et al. Nationwide surveillance of bacterial respiratory pathogens conducted by the surveillance committee of Japanese Society of Chemotherapy, the Japanese Association for Infectious Diseases, and the Japanese Society for

Clinical Microbiology in 2012: general view of the pathogens' antibacterial susceptibility. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2017;23(9):587-97.



## 8. EKLER

## EK-1: Orjinallik Raporu

	<b>T.C. HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLIK RAPORU</b>		FORM: 
	Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne		Tarih: 15/2/2021
<b>Adı Soyadı:</b>	Gökçe Kırca		
<b>Öğrenci No:</b>	N17132467		
<b>Anabilim Dalı:</b>	Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı		
<b>Programı:</b>	Tıbbi Mikrobiyoloji		
<b>Statüsü:</b>	<input checked="" type="checkbox"/> Y.Lisans <input type="checkbox"/> Doktora <input type="checkbox"/> Bütünleşik Dr.		
<b>Tez Başlığı / Konusu:</b>	Haemophilus influenzae'larda Tiplendirme Yöntemleri ve Önemi		
<p>Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler ve d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 58 sayfalık kısmına ilişkin, 15/2/2021 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından <i>Turnitin</i> adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 7 'olarak tespit edilmiştir.</p> <p>Uygulanan filtrelemeler:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1- Kaynakça hariç</li> <li>2- Alıntılar hariç / dahil</li> <li>3- 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç</li> </ol> <p>Hacettepe Üniversitesi "Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları" nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.</p> <p>Gereğini saygılarımla arz ederim.</p> <p style="text-align: right;">Ad Soyad, İmza Gökçe Kırca</p>			
<p><small>Ek: 1 Adet, tezin tam başlığını öğrencinin ad soyad bilgisini ve dosyanın toplam sayfa sayısını gösterecek şekilde Raporlama işlemi tamamlandıktan sonra alınacak ekran görüntüsü Örnek: Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları Madde 5 (4) Ek 1</small></p>			
<b>DANIŞMAN ONAYI</b>		UYGUNDUR.	
		15/2/2021 (Ünvan, Ad Soyad, Tarih İmza) Prof. Dr. Ayşe Gülşen Hasçelik	
<p><small>Detaylı Bilgi: <a href="http://www.saglikbilimleri.hacettepe.edu.tr">http://www.saglikbilimleri.hacettepe.edu.tr</a> Telefon: (312) 305 10 90 – 91 Fax: (312) 309 31 90 E-Posta: <a href="mailto:sbc@hacettepe.edu.tr">sbc@hacettepe.edu.tr</a></small></p>			

## EK-2: Turnitin Dijital Makbuz



### Dijital Makbuz

Bu makbuz ödevinizin Turnitin'e ulaştığını bildirmektedir. Gönderiminize dair bilgiler şöyledir:

Gönderinizin ilk sayfası aşağıda gönderilmektedir.

Gönderen:	Gökçe Kırca
Ödev başlığı:	Haemophilus influenzae'LARDA TİP...
Gönderi Başlığı:	Haemophilus influenzae'LARDA TİP...
Dosya adı:	turnitin.pdf
Dosya boyutu:	1.38M
Sayfa sayısı:	57
Kelime sayısı:	11,438
Karakter sayısı:	75,191
Gönderim Tarihi:	15-Şub-2021 12:09PM (UTC+0300)
Gönderim Numarası:	1509926599

#### 1. GİRİŞ

*Haemophilus influenzae* insanların mukozal yüzeylerinde kolonize olabilen, kokobasil şeklinde, sporusuz, hareketsiz, gram negatif bakteridir. Bu bakteri Pfeiffer tarafından 1892 yılında influenza epidemisi etkeni olarak tespit edilmiş ve bu nedenle "influenza basili" olarak tanımlanmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalar her ne kadar *H. influenzae*'nin, influenza epidemilerinin benimsi etkeni olmadığına ortaya koymuş olsa da tanımlanmasında değişiklikler görülmüştür (1, 2).

*H. influenzae* kapsülü ve kapsüllü olmak üzere iki gruba ayrılmakta, kapsülü olanlar kapsüllerinde bulunan polisakaritlerine göre a, b, c, d, e ve f şeklinde isimlendirilen 6 serotip (3, 4), ayrıca indol üretimi, üreaz ve ornitin dekarboksilaz testlerine göre ise sekiz farklı biyotip (I-VIII) olarak sınıflandırılmaktadır (5-7).

*Haemophilus* türü bakteriler insan ve hayvanlarda zorunlu parazit olmakla birlikte, *H. influenzae* sadece insanlarda enfeksiyon oluşturmaktadır. *H. influenzae* özellikle boğaz ve nazofarenks bölgesinde kolonize olurken, nadiren konjunktiva, burun ve genetal sistemde de kolonize olabilmektedir. *H. influenzae*'nin kapsüllü suşları ve kapsüllü olanlardan *H. influenzae* tip b (Hib) her yaşta insanın üst solunum yollarında kolonize olmaktadır (2), özellikle *H. influenzae* tip b serotipi (Hib), beyin yaygınlığı postulerde prömon, menenji, bakteriyemi ve epiglottit gibi ölümcül olabilen invaziv enfeksiyonlara neden olmaktadır (8). Kapsüllü suşlar ise enfeksiyonlarda toplum kaynaklı prömon, akut orta kulak iltihabı, akut sinüzit ve kronik bronşit akut alevlenmeler şeklinde seyretmektedir (1).

*H. influenzae*'nin serotiplenmesi konvansiyonel olarak kapsül spesifik antijenlerle yapılabildiği gibi kapsül genlerini kodlayan csp lokusundaki hemKCEEF genlerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile taranmasıyla da yapılabilmektedir. Yapılan çalışmalar konvansiyonel olarak serotiplenmede moleküler yöntemlere göre daha fazla yanlış sınıflandırma ve tanımlanmayan kapsüllü *H. influenzae*'nin (NTH) tanımlanmadığını ortaya koymuştur. Ayrıca konvansiyonel yöntemlerle b tip suşlarını kapsüllü mutanları (b<sup>+</sup>) da tanımlanmaktadır. 2007 yılından beri akut orta kulak iltihabı epidemisi alevlenmiş ve daha çok NTH'nin neden olduğu invaziv enfeksiyonlar görülmeye

**EK-3: Tez Orijinallik Raporu****Haemophilus influenzae'LARDA TIPLENDİRME YÖNTEMLERİ VE ÖNEMİ****ORIJINALLIK RAPORU**

<b>%7</b> BENZERLİK ENDEKSİ	<b>%7</b> İNTERNET KAYNAKLARI	<b>%2</b> YAYINLAR	<b>%1</b> ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ
--------------------------------	----------------------------------	-----------------------	-------------------------------

**BİRİNCİL KAYNAKLAR**

<b>1</b>	<b>www.odevsel.com</b> İnternet Kaynağı	<b>%1</b>
<b>2</b>	<b>www.guncelpediatri.com</b> İnternet Kaynağı	<b>%1</b>
<b>3</b>	<b>www.bd.com</b> İnternet Kaynağı	<b>%1</b>
<b>4</b>	<b>docplayer.biz.tr</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>5</b>	<b>www.mikrobiyolbul.org</b> İnternet Kaynağı	<b>&lt;%1</b>
<b>6</b>	<b>Danielle Wroblewski, Tanya A. Halse, Jill Hayes, Donna Kohlerschmidt, Kimberlee A. Musser. "Utilization of a real-time PCR approach for Haemophilus influenzae serotype determination as an alternative to the slide agglutination test", Molecular and Cellular Probes, 2013</b> Yayın	<b>&lt;%1</b>

