

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı

HAEMOPHILUS INFLUENZAE SUŞLARINDA ANTİBİYOTİK DİRENCİ
VE DİRENCİN MOLEKÜLER ANALİZİ

Dr. Nuray Kuvat

DANIŞMAN

Prof. Dr. Betigül Öngen

İstanbul – 2011

T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji
Anabilim Dalı

HAEMOPHILUS INFLUENZAE SUŞLARINDA ANTİBİYOTİK DİRENCİ
VE DİRENCİN MOLEKÜLER ANALİZİ

Dr. Nuray Kuvat

DANIŞMAN

Prof. Dr. Betigül Öngen

İstanbul – 2011

Bu proje İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje no: 4457)

TEŞEKKÜR

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Bülent Gürler'e

Gerek tez konumun seçilmesi ve yürütülmesinde, gerekse tıpta uzmanlık eğitimim süresince desteğini ve teşviklerini esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli hocam Sayın Prof. Dr. Betigül Öngen'e

Tez konusu belirleme sürecimde yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Rahmiye Berkiten'e

Tıpta Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Selim Badur, Dr. Emel Bozkaya, Sayın Prof. Dr. Şengül Derbentli, Sayın Prof. Dr. Mine Anğ Küçüker, Sayın Prof. Dr. Nezahat Gürler, Sayın Prof. Dr. O. Şadi Yenen, Sayın Prof. Dr. Yıldız Yeğenoğlu, Sayın Prof. Dr. Ali Ağaçfidan, Sayın Prof. Dr. Çiğdem Kayacan, Sayın Prof. Dr. M. Derya Aydın, Sayın Prof. Dr. Ali Öner, Sayın Prof. Dr. Meltem Uzun, Sayın Prof. Dr. Zayre Erturan, Sayın Doç. Dr. Özden Büyükbaba Boral, Doç. Dr. Zerrin Aktaş,

Tezimin her türlü aşamasında her türlü maddi ve manevi desteklerinden dolayı Uzm. Dr. Hasan Nazik'e

İlgi ve yardımlarını esirgemeyen Uzm. Dr. Yaşar Nakipoğlu, Msc. Bio Mehmet İlkaç, Bio. H. Ayşegül Şahin Aydın ve Lab. Zehra Bekiroğlu'na ve birlikte çalıştığım tüm asistan ve mesai arkadaşlarıma,

TEŞEKKÜRLERİMİ sunarım.

I. İÇİNDEKİLER	2-6
II. TABLOLAR LİSTESİ	7-8
III. RESİMLER LİSTESİ.....	9
IV. SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ.....	10-11
ÖZET.....	12-13
ABSTRACT.....	14
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	15-16
2. GENEL BİLGİLER.....	17
2. 1. <i>Haemophilus</i>	17
2. 2. Sınıflandırma.....	17-18
2.3. <i>HAEMOPHILUS INFLUENZAE</i>	18
2.3.1. TARİHÇE.....	18-19
2.3.2. EPİDEMİYOLOJİ.....	19-20
2.3.3. MİKROBİYOLOJİK ÖZELLİKLER.....	20
2.3.3.1. HÜCRE MORFOLOJİSİ.....	20-21
2.3.3.2. KÜLTÜR ÖZELLİKLERİ.....	21
2.3.3.2.1. Üreme faktörlerine olan gereksinim.....	21
2.3.3.2.2. X FAKTÖRÜ.....	9
2.3.3.2.3. V FAKTÖRÜ.....	21
2.3.3.2.4. Üreme için gerekli fiziksel koşullar.....	22
2.3.3.2.5. Koloni Morfolojisi.....	22
2.3.4. ANTİJENİK YAPI.....	22
2.3.4.1. Kapsül.....	22
2.3.4.2. Pili.....	23

2.3.4.3. Lipo-oligosakkarit.....	23
2.3.4.4. Dış-Membran proteinleri.....	23
2.3.4.5. IgAProteaz.....	23
2.3.5. PATOGENEZ VE VİRÜLANS FAKTÖRLERİ.....	24
2.3.5.1. PATOGENEZ.....	24
2.3.5.1.1. Kapsüllü <i>H. influenzae</i>	24
2.3.5.1.2. Kapsülsüz <i>H. influenzae</i>	24
2.3.5.2. VİRÜLANS.....	24
2.3.5.2.1. Kapsüllü <i>H. influenzae</i>	24-25
2.3.5.2.2. Kapsülsüz <i>H. influenzae</i>	25
2.3.6. KLİNİK ÖNEMİ.....	26
2.3.6.1. Kapsüllü <i>H. influenzae</i>	26
2.3.6.1.1. Menenjit.....	26
2.3.6.1.2. Epiglottit.....	26
2.3.6.1.3. Pnömoni ve Ampiyem.....	27
2.3.6.1.4. Selülit.....	27
2.3.6.1.5. Bakteriyemi.....	27
2.3.6.1.6. Septik Artrit.....	27-28
2.3.6.2. Kapsülsüz <i>H. influenzae</i>	28
2.3.6.2.1. Otitis Media.....	28
2.3.6.2.2. KOAH Akut Alevlenmeleri.....	28
2.3.6.2.3. Toplum Kökenli Pnömoni.....	28-29

2.3.6.2.4. Sinüzit.....	29
2.3.6.2.5. Neonatal Sepsis.....	29
2.3.6.2.6. Bakteriyemi.....	29
2.3.6.2.7. Konjunktivit.....	29
2.3.7. LABORATUVAR TANISI.....	30
2.3.7.1 Örnek toplanması ve transportu.....	30
2.3.7.2 İzolasyon.....	30-31
2.3.7.3 İdentifikasyon.....	31-32
2.3.7.4 Muhafaza ve Saklama.....	32-33
2.3.8. TEDAVİ VE KEMOPROFİLAKSİ.....	33
2.3.8.1. TEDAVİ.....	33-34
2.3.8.2. KEMOPROFLAKSİ.....	34
2.3.9. AKTİF BAĞIŞIKLAMA.....	34-35
2.3.10. ANTİMİKROBİYAL AJANLARA DUYARLILIK.....	35
2.3.10.1. Duyarlılık Testleri.....	35
2.3.10.2. ANTİBİYOTİK DİRENÇ MEKANİZMALARI.....	36
2.3.10.2.1. BETA-LAKTAM GRUBU ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇ	36-40
2.3.10.2.2. TRİMETOPRİM-SULFAMETOKSAZOL DİRENCİ.....	40
2.3.10.2.3. MAKROLİD, AZALİD VE KETOLİD DİRENCİ.....	40
2.3.10.2.4. KLORAMFENİKOL DİRENCİ.....	41
2.3.10.2.5. KİNOLON DİRENCİ.....	41
2.3.10.2.6. TETRASİKLİN DİRENCİ.....	41-42

2.3.10.3. ÇOĞUL DİRENÇ.....	42
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	43
3.1. Bakteriyolojik Tanı İçin Kullanılan Besiyerleri.....	43
3.1.1. Çikolatamsı Agar.....	43
3.1.2. <i>Haemophilus</i> Test Besiyeri (HTM).....	43-44
3.1.3. At Kanlı Agar.....	44
3.1.4. Triptik soy agar (TSA).....	44
3.2. Bakteri identifikasyonu.....	44-46
3.3. Antibiyotik duyarlılığının saptanması.....	46-47
3.4. Beta-laktamaz varlığının araştırılması.....	47
3.5. Ampisilin dirençli suşlarda TEM tipi beta-laktamaz varlığının PCR yöntemi ile araştırılması:.....	47
3.5.1. Kullanılan çözeltiler	47
3.5.1.1. 10X Tris-Borik asit-EDTA (TBE) tampon çözeltisi	47
3.5.1.2. EtidyumBromür	48
3.5.1.3. % 1'lik Agaroz Jel	48
3.5.1.4. dNTP Karışımı.....	48
3.5.1.5. Primerler.....	48
3.5.2. DNA Ekstraksiyonu.....	49
3.5.3. DNA Amplifikasyonu.....	49-50
3.5.4. Amplifikasyon Programı.....	50
3.5.5. Elektroforez.....	50
4. BULGULAR.....	51-60
5. TARTIŞMA.....	59-76

6. KAYNAKLAR.....77-87

7. ETİK KURUL ONAYI.....88-89

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: <i>Haemophilus</i> türlerinin ayırıcı özellikleri.....	18
Tablo 2: Kapsülsüz <i>H. influenzae</i> ve <i>H. influenzae</i> tip b'nin çeşitli özelliklerinin karşılaştırılması.....	25
Tablo 3: <i>Haemophilus</i> türlerinin çeşitli biyokimyasal özellikleri	32
Tablo 4: Lisans alan konjuge Hib aşılıarı.....	35
Tablo 5: <i>H. influenzae</i> 'da direnç genleri ve gen ürünleri.....	36
Tablo 6: Çalışmada kullanılan primerler.....	48
Tablo 7: Örneklerin alındığı hastaların cinsiyete göre dağılımı (%).....	51
Tablo 8: Örneklerin alındığı hastaların yaşa göre dağılımı (%).....	51
Tablo 9: Yatan hasta ve poliklinik hasta oranı (%).....	52
Tablo 10: <i>H. influenzae</i> suşlarının izole edildiği örneklerin sayısal dağılımı (n).....	52
Tablo 11: <i>H. influenzae</i> suşlarının çeşitli antibiyotiklere direnç oranları (%).....	53
Tablo 12: İzole edilen <i>H. influenzae</i> suşlarının 19 farklı antibiyotiğe direnç oranları (%).....	54
Tablo 13: <i>H. influenzae</i> suşlarında çoğul direnç (%).....	55
Tablo 14: <i>H. influenzae</i> suşlarının beta-laktamaz üretimine göre dağılımı (%)	56
Tablo 15: 235 <i>H. influenzae</i> suşunun beta-laktamaz üretimi ve ampisilin/amoksisilin-klavulanik asit duyarlılığına göre gruplandırılması	57
Tablo 16: Ampisiline dirençli <i>H. influenzae</i> suşlarının ampisilin için MİK değerleri ve TEM-1/ ROB-1 enzimlerinin varlığı.....	58
Tablo 17: Türkiye'de <i>H. influenzae</i> izolatlarında ampisilin direnci, beta-laktamaz üretimi, ve BLNAR oranları (%).....	64
Tablo 18: Türkiye'de <i>H. influenzae</i> izolatlarında BLNAR oranları (%).....	65
Tablo 19: Farklı ülkelerden izole edilen <i>H. influenzae</i> suşlarında sefalosporin direnci (%).....	69

Tablo 20: Türkiyede *H. influenzae* suşlarının sefalosporinlere direnç oranları (%).....70

Tablo 21: Türkiyede *H. influenzae* suşlarının Tetrasiklin, Makrolid, Kloramfenikol, Trimetoprim-sulfametoksazol ve Kinolonlara direnç oranları (%).....71

RESİMLER LİSTESİ

- Resim 1: Bir *H. influenzae* suşunun TSA ve Çikolatamsı besiyerlerindeki kültürleri.....45
- Resim 2: *Haemophilus* cinsi suşların X ve/veya V faktör gereksinimlerinin araştırılması...46
- Resim 3: Ampisiline dirençli olan bir suşa yapılmış E-test.....47
- Resim 4: 1, 2, 3, 5: TEM-1 pozitif, 4,9: TEM-1 negatif suşlar. NK: Negatif kontrol PK: Pozitif kontrol, MM: Marker56
- Resim 5: 1, 2, 3, 5, 4, 9: ROB-1 negatif suşlar. NK: Negatif kontrol, PK: Pozitif kontrol
MM: Marker.....57

SEMBOLLER VE KISALTMALAR

ATCC	American Type Culture Collection
BLNAR	Beta-laktamaz negatif ampisilin dirençli
BLNAS	Beta-laktamaz negatif ampisilin duyarlı suşlar
BLPACR	Beta-laktamaz pozitif amoksisilin-klavulanat dirençli
BLPAR	Beta-laktamaz pozitif ampisilin dirençli
BOS	Beyin Omurilik Sıvısı
C	Sitozin
CAT	Koramfenikol Asetil Transferaz
CLSI	Clinical and Laboratory Standarts Institute
dATP	Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	Deoksisitozin trifosfat
dGTP	Deoksiguonozin trifosfat
DHFR	Dihidrofolat Redüktaz
DNA	Deoksiribonükleik Asit
dNTP	Deoksiribonükleotit trifosfat
dTTP	Deoksitrozin trifosfat
E-test	Epsilometer test
FDA	Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi
G	Guanin
GSBL	Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz
HIV	Human Immundeficiency Virus
Hib	<i>Haemophilus Influenzae</i> Tip b
HTM	Haemophilus Test Medium
IgA	İmmunglobulin A
kb	Kilo Baz
KOAH	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
LOS	Lipooligosakkarit
LPS	Lipopolisakkarit
MİK	Minimal İnhibitör Konsantrasyon
NAD	Nikotinamid Adenin Dinükleotid
NADP	Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat

NAG	N-asetil glukozamin
OMP	Dış membran proteini
PBS	Tamponlanmış Fosfat Solüsyonu
PFGE	Pulsed-Field Jel Elektroforez
PROTEKT	Prospective Resistant Organism Tracking and Epidemiology for the Ketolide Telithromycin
PRP	Poliribizol Ribitol Fosfat
RNA	Ribonükleik Asit
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
tRNA	Taşıyıcı RNA
TSA	Triptik Soy Agar
UV	Ultra Viyole

ÖZET

Kuvat N. *Haemophilus influenzae* suşlarında antibiyotik direnci ve bu direncin moleküler analizi. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD. Tıpta Uzmanlık Tezi. 2011.

Bu çalışma klinik örneklerden izole edilen *H. influenzae* suşlarının antibiyotik direncinin saptanması ve ampisiline dirençli *H. influenzae* suşlarında saptanan direncin beta-laktamaz üretimi başta olmak üzere moleküler analizinin araştırılması amacıyla ülkemizde yapılan ilk çalışmadır.

235 *H. influenzae* suşunun ampisilin dahil 19 farklı antibiyotiğe karşı direnci disk difüzyon yöntemi ile araştırılmış, ampisilin, sefuroksim, kloramfenikol ve meropeneme dirençli bulunan suşların MİK'leri ise E-test yöntemi ile saptanmıştır. İzole edilen tüm suşlarda beta-laktamaz pozitifliğinin belirlenmesi amacıyla nitrosefin deneyi, ampisiline dirençli suşlarda ise dirence neden olan mekanizmanın (TEM-1 ve ROB-1) belirlenmesi için PCR yöntemi kullanılmıştır.

Test edilen suşların antibiyotiklere direnç durumları incelendiğinde amoksisilin-klavulanik asit, seftriakson, sefotaksim, aztreonam, azitromisin, telitromisin, siprofloksasin, levofloksasine dirençli suş saptanmamıştır. Trimetoprim-sulfametoksazole 57 (% 24,2), tetrasikline 36 (% 15,2), ampisiline 26 (% 11), sefaklora 10 (% 4,2), klaritromisine 8 (% 3,4), sefuroksime 4 (% 1,7), meropeneme 2 (% 0,8), kloramfenikole 2 (% 0,8) ampisilin-sulbaktama 1 (% 0,4), nalidiksik aside 1 (% 0,4), fosfomisine 1 (% 0,4), dirençli suş saptanmıştır. Sefuroksime disk difüzyon yöntemi ile dirençli bulunan üç suşun E-test yöntemi ile yapılan MİK değerleri dirençlilik sınırları içerisinde ve sırası ile 24 µg/ml, 48 µg/ml, >256 µg/ml olarak bulunmuştur. Meropeneme dirençli bulunan iki suşun ise MİK değeri >256 µg/ml (dirençli) olarak belirlenmiştir. Disk difüzyon yöntemi ile kloramfenikole orta duyarlı saptanan her iki suşun da MİK değeri 6 µg/ml (orta duyarlı) olarak saptanmıştır. Orta duyarlı olan suşlar dirençli olarak kabul edilmiştir. İzole edilen suşların 36 (% 15,3)'ünde çoğul direnç saptanmıştır. Bu suşlardan 20 (% 8,5)'inde iki, dokuzunda (% 3,8) üç, beşinde (% 2,1) dört, birer suşta da (% 0,4) beş ve altı antibiyotik direnci saptanmıştır.

Çalışmamızda ampisilin dirençli ve beta-laktamaz pozitif suşların tamamamında TEM-1 tipi enzim bulunup ROB-1 tipi enzim saptanmamıştır. Ayrıca ampisilin direncinde BLNAR fenotipinin ayırt edilmesi ile ampisiline dirençli suş saptanan hastaların yaklaşık %3'ünün ampirik tedavisinde inhibitörlü beta-laktamların, ikinci kuşak sefalosporinlerin kullanılmasının uygun olmayacağı görülmüştür.

Anahtar kelimeler: *Haemophilus influenzae*, ampisilin direnci, E-test, PCR.

ABSTRACT

This study is the first study carried out in our country for detecting the antibiotics resistance of *H. influenzae* strains isolated from clinical samples and for studying the molecular analysis of resistance especially that of beta lactamase production in ampicillin resistant *H. influenzae* strains.

The resistance of 235 *H. influenzae* strains to 19 different antibiotics including ampicillin was determined by disc diffusion method and MICs of strains which were resistant to ampicillin, cefuroxim, cloramphenicol were detected by E-test method. Nitrocefin method was used for determining the beta lactamase positivity of all isolates and PCR method was used for determining the mechanism (TEM-1 and ROB-1) causing resistance of ampicillin resistant strains.

According to the antibiotic resistance results, no resistance to amoxicillin-clavulanat, seftriaxone, sefotaxim, aztreonam, azithromycin, telithromycin, ciprofloxacin and levofloxacin was detected. 57 cotrimoxazole resistant, 36 tetracycline resistant, 26 ampicillin resistant, 10 sefaklor resistant, 8 clarithromycin resistant, 4 cefuroxim resistant, 2 meropenem resistant, 2 cloramphenicol resistant, 1 ampicillin-sulbactam resistant, 1 nalidixic acid resistant and 1 fosfomicin resistant strains were detected. MIC points of 3 cefuroxime resistant isolates were found to be in resistant range respectively with 24 µg/ml, 48 µg/ml and 256 µg/ml. MIC points of 2 strains that were found to be intermediate susceptible to cloramphenicol by disc diffusion method were both found to be 6 µg/ml (intermediate susceptible). Intermediate susceptible strains were accepted as resistant. Multiple resistance was detected in 36 isolates. Of these isolates, 20 (8.5%) was found to be resistant to 2, 9 (3.8%) to 3, 5 (2.1%) to 4, 1 (0.4%) to 5 and 6 antibiotics.

In our study, TEM-1 enzyme was detected in all ampicillin resistant and beta-lactamase positive isolates where as ROB-1 enzyme was not detected any one. Moreover, it was found that beta-lactame+inhibitors and 2nd generation sefalosporins were not appropriate for ampicillin therapy of approximately 3 % of patients in whom ampicillin resistant strains were detected by discriminating BLNAR phenotype.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Gram negatif, hareketsiz kokobasil şeklinde bir bakteri olan *Haemophilus influenzae* menenjit, pnömoni, epiglottit gibi invaziv, KOAH'ın alevlenmesi, sinüzit, otitis media, konjunktivit gibi invaziv olmayan infeksiyonlara yol açar (1, 2, 3).

H. influenzae'nin kapsül antijenine göre a, b, c, d, e ve f olmak üzere altı tipi bulunmaktadır. Özellikle tip b suşları sıklıkla çocuklarda pnömoni, menenjit ve bakteriyemi gibi invaziv infeksiyonlara neden olur. Antimikrobiyal tedavi kapsül polisakkarit aşısına ve [*H. influenzae* tip b (Hib)] rağmen *H. influenzae* bronkopulmoner infeksiyonlar ve kazanılmış hastane infeksiyonlarında major bir patojendir (2).

Hib birçok Asya ülkesinde ve gelişmekte olan ülkelerde aşılammış çocuklar arasında menenjitin önde gelen nedenidir. Dünya çapında her yıl üç ay-üç yaş arası çocuklarda en az üç milyon ciddi Hib infeksiyonu geliştiği ve buna bağlı olarak 400,000-700,000 kadar ölüm meydana geldiği tahmin edilmektedir (2, 3).

H. influenzae infeksiyonlarında tedavide en sık kullanılan antibiyotikler beta-laktam grubu (ampisilin, sefalosporinler) antibiyotiklerdir. Ancak, ilk kez 1974 yılında ABD'de ampisiline dirençli suşlar bildirilmiştir (2, 4). Daha sonra bu tip direncin, plazmid kaynaklı beta-laktamaz üretimine (başlıca TEM-1, ROB-1) bağlı olduğu gösterilmiştir. Ayrıca 1980'lerde ilk olarak beta-laktamaz üretmeyen ampisiline dirençli suşlar (BLNAR) izole edilmiştir. Bu direncin beta-laktamaz enzimin çok az salgılanmasına veya kromozomal mutasyon sonucu penisilin bağlayıcı proteinlerde meydana gelen değişime bağlı olabileceği ileri sürülmektedir. Nadiren hücre duvarı geçirgenliğinin azalmasına bağlı direnç de ortaya çıkabilmektedir (5).

Ampisilin direnci en sık beta-laktamaz üretimi yoluyla gerçekleşir ve coğrafik bölgelere göre değişkenlik gösterir. Bu direnç oranı kimi ülkelerde % 3 iken kimi ülkelerde % 65'lere çıkmaktadır. BLNAR suşlarının oranının ise daha düşük olduğu (% 0,01) bildirilmektedir. Yapılan geniş çaplı çalışmalarda genel olarak beta-laktamaz üretimine bağlı direncin % 90'ından fazlasının TEM-1, % 5 kadarının ise ROB-1'e bağlı olduğu gösterilmiştir (2, 6, 7, 8).

Ülkemizde ise farklı klinik örneklerden izole edilen *H. influenzae* suşlarında ampisilin direnci, çoğunluğu beta-laktamaz üretimine bağlı olmak üzere % 0-37,5 gibi farklı oranlarda

saptanmakla birlikte solunum yolundan izole edilen suşlarda bu oranın % 6-8 kadar olduğu bildirilmektedir (7, 9, 10). Ancak bu direncin moleküler analizi ile ilgili veriler kısıtlıdır. Sık görülen beta-laktamaz tiplerinin (TEM-1, ROB-1) saptanması amacıyla Türkiye’de yapılan bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmada, ülkemizde klinik örneklerden izole edilen *H. influenzae* suşlarının antibiyotik direncinin ve beta-laktamaz oluşturma sıklığının saptanması ayrıca ampisiline dirençli ve beta-laktamaz oluşturan *H. influenzae* suşlarının moleküler analizi ile beta-laktamaz enzim tiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. *Haemophilus*

Haemophilus cinsi bakteriler *Pasteurellaceae* ailesinde yer almakta olup insan müköz membranlarına adepte olmuş zorunlu mikroorganizmalardır. İnsan için patojen olarak tanımlanmış *Haemophilus* türleri *H. influenzae*, *H. ducreyi*, *H. parainfluenzae*, *H. parahaemolyticus*, *H. aphrophilus*, *H. paraaphrophilus*, *H. haemolyticus*, *H. aegypticus* ve *H. pittmaniae*'dir (3). *Haemophilus* türleri genel olarak küçük (0,3-0,5 µm x 0,5-1,0), Gram negatif, hareketsiz, aside dirençli olmayan, sporsuz, kokobasillerden filamantöz formlara kadar değişebilen çomak şeklinde bakterilerdir. Fakültatif anaerop özellik gösteren bu bakteriler üreme için bir ya da iki büyüme faktörüne; X faktörü (hemin ya da diğer porfirinler) ve V faktörüne [koenzim I, nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) ya da nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP)] ihtiyaç duyarlar. X faktörü ısıya dirençlidir. V faktörü ise ısıya duyarlıdır ve 120 derecede birkaç dakika sonra etkisiz hale gelir. Her iki faktör de kanda bulunmaktadır. Ancak konvansiyonel kanlı agarda X faktörü bulunurken V faktörü bulunmaz. V faktörünün kandan salınması için kan hücrelerinin kısa bir ısıtmaya maruz bırakılıp parçalanması gerekir. Bu işlem besiyeri otoklavlanıp 80 dereceye kadar soğutulduktan sonra içerisine % 5 koyun, at veya sığır kanı eklenerek yapılabilmektedir. *H. influenzae* ve *H. parainfluenzae*'nin en iyi izole edilebildiği besiyerleri bu şekilde hazırlanan besiyerleridir (3, 11, 12, 13).

Haemophilus cinsi bakteriler solunum ya da fermentatif tip metabolizma ile kemoorganotropiktirler. Şekerleri fermente ederler; glukozun fermentasyonu sonucu oluşan son ürünler laktik asit, süksinik asit ve asetik asitlerdir. *Haemophilus* suşlarının çoğunda oksidaz ve katalaz reaksiyonları pozitifdir. Nitratı nitrite indirgerler. DNA'larında guanin ve sitozin (G+C) oranları % 37-44'dür (3, 11).

2. 2. Sınıflandırma

Haemophilus cinsi bakteriler X ve V faktörlerine olan gereksinim, biyokimyasal aktivite ve artmış karbondioksit gereksinimine göre sınıflandırılmaktadır (Tablo 1).

Tablo 1. *Haemophilus* türlerinin ayırıcı özellikleri (3).

Türler	Üreme faktörü gereksinimi		Hemoliz	CO2 gereksinimi
	X	V		
<i>H. influenzae</i>	+	+	-	-
<i>H. parainfluenzae</i>	-	+	-	-
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+/-	-
<i>H. ducreyi</i>	+	-	-	-
<i>H. parahaemolyticus</i>	-	+	+	-
<i>H. segnis</i>	-	+	-	-
<i>H. pittmaniae</i>	-	+	+	-
<i>H. aphrophilus</i>	-	-	-	+
<i>H. aegyptius</i>	+	+	-	-
<i>H. paraphrophilus</i>	-	+	-	-

Karbonhidrat kullanımı ve gaz üretimi de *Haemophilus* cinsi bakterilerin sınıflandırılmasında kullanılır. *H. ducreyi* haricinde tüm *Haemophilus* türleri glukozu fermente eder. *H. parainfluenzae*, *H. haemolyticus*, *H. aphrophilus* ve *H. paraphrophilus* suşlarının çoğu glukozdan gaz oluşturur.

Haemophilus türlerinin ayırımında katalaz ve oksidaz reaksiyonları önemlidir. *H. influenzae* oksidaz pozitif iken *H. aphrophilus* ve *H. ducreyi* ise oksidaz negatif türlerdir. *Haemophilus* türlerinin ayırımında kullanılan diğer biyokimyasal reaksiyonlar Tablo 2’de gösterilmiştir (3). Üçlü biokimyasal test olarak tanımlanan indol, üreaz, ornitin dekarboksilaz testleri ise *H. influenzae* ve *H. parainfluenzae* biyotiplemesinde kullanılan testlerdir (11, 14).

H. influenzae, *H. influenzae* biogrup *aegyptius* ve *H. aegyptius*’un standart yöntemlerle ayrılması mümkün değildir. *H. aegyptius*’un *H. influenzae*’dan ayrılmasında ksiloz fermentasyonu, troleandomisin duyarlılığı ve insan kırmızı kan hücreleri aglütinasyonu kullanılabilir. Birlikte bu testlerin iki tür arasında kesin ayırım sağlamadığı bildirilmektedir (15). *H. haemolyticus* at kanlı agarda hemoliz yaparken *H. influenzae* yapmaz (16).

2.3. HAEMOPHILUS INFLUENZAE

2.3.1. TARİHÇE

R. Koch 1883 yılında Mısır’da, konjunktivite neden olan ve bugün *H. aegyptius* olarak bilinen bakterileri tanımlamıştır (11). R. Pfeiffer (17) 1892 yılında epidemik influenza

olgularının tükürük ve balgamlarında küçük Gram negatif hemofilik kokobasilleri saptamıştır. Bu kokobasiller Pfeiffer basili olarak da adlandırılmıştır (18). IW. Pritchett ve E.G. Stillman ise 1919 yılında X ve V faktörlerine ihtiyaç duyan ve hemoliz yapan Gram negatif çomakları gözlemlemişler, 1920 yılında *H. influenzae* olarak (Yunancada *Haemophilus*, kan seven manasında) adlandırmışlardır. 1930 yılında M. Pittman *H. influenzae*'yi kapsüllü ve kapsülsüz olarak iki büyük gruba ayırmış, kapsüllü *H. influenzae*'yi da kapsül polisakkaritlerindeki antijen farklılıklarına göre altı serotipe (a-f) ayırmıştır. Daha sonra 1953 yılında hemoliz yapmayan *H. influenzae* ve *H. parainfluenzae* türlerinden farklı olarak *H. haemolyticus* ve *H. parahaemolyticus*'u ayırt etmiştir (19). 1976'da M. Kilian tarafından *Haemophilus* türleri biyokimyasal özelliklerine göre (indol üretimi, üreaz aktivitesi ve ornitin dekarboksilaz aktivitesi) dört biyotip (I-IV)'e ayrılmış, sonrasında bunlara biyotip V-VIII eklenmiştir (16).

2.3.2. EPİDEMİYOLOJİ

Yenidoğanlarda üst solunum yolu steril olmakla birlikte, çeşitli bakterilerin kolonizasyonu ile hızla normal flora oluşur (11). Kolonizasyon bir yaşında % 34, iki yaşında % 44 ve 5-6 yaş sonunda % 50 oranında tamamlanır. *Haemophilus* cinsi bakteriler sağlıklı üst solunum yolu normal florasının % 10'unu oluşturur. *H. influenzae* için insan bilinen tek doğal konaktır ve genellikle oral kavite ve farinks normal florasında bulunmaktadır. *H. parainfluenzae* ise ağızdaki baskın olan *Haemophilus* türüdür. *H. influenzae* farinksdeki *Haemophilus* türlerinin yaklaşık % 10'unu oluşturur. *H. influenzae* genellikle solunum yolunda, nadiren de genital yollarda enfeksiyona neden olmaktadır. Genellikle insandan insana damlacık yoluyla ya da salgın durumlarında doğrudan temas yoluyla bulaşmaktadır (3, 11, 12, 20).

En sık invaziv enfeksiyonlara neden olan serotip *H. influenzae* tip b (Hib)'dir. Hib ile orofaringeal taşıyıcılık yaşamın ilk 6 ayında % 1'in altında iken, 3-5 yaşta ortalama % 3-4 oranına ulaşır; ilerleyen yaşlarda ise kolonizasyon giderek azalmaya başlar (3, 11). Ancak taşıyıcılıkla ilgili olarak yapılan çalışmalarda, bu oranların etnik köken, mevsim, antibiyotik tedavisi, örnekleme ve kültür teknikleri gibi faktörlere bağlı olarak değişebildiği bildirilmektedir. Refakatçi bakımı ve kalabalık ortamlar *H. influenzae* tip b taşıyıcılığı için önemli risk faktörleridir. Birçok toplumda çocukların aşılınması ile *H. influenzae* tip b'nin faringeal taşıyıcılığı önemli bir oranda azalmıştır. Bununla birlikte aşılama *H. influenzae* tip b taşıyıcılığını tamamen ortadan kaldıramamıştır (3, 11, 20).

Aşılama programından önce *H. influenzae* tüm dünyada 3 ay-3 yaş arası çocuklarda bakteriyel menenjitin en önemli üç etkeni arasında yer almakta iken bugün görülme sıklığı oldukça azalmıştır (3) ve bu infeksiyonların ortaya çıktığı hastaların çoğunluğunu aşılanmamış, eksik aşılanmış çocuklar ya da immün sistemi zayıflamış olan yaşlı hastalar oluşturmaktadır (13). *H. influenzae*'nin neden olduğu menenjit olgularının tamamı serotip b ile oluşmakta ve bunların da büyük bir çoğunluğunun biyotip I'e ait olduğu bildirilmektedir. Yine aynı özelliklere sahip olan kökenler akut epiglottitin de en önemli etiyolojik etkenidir. *H. influenzae* tip b halen dünyada çocuklarda önemli oranda hastalık etkeni olmaya devam etmektedir. Dünya genelinde her yıl küçük çocuklarda üç milyon ciddi hastalık olgusu bildirilmekte ve bu olguların menenjit ve pnömoni nedeniyle yılda 400.000–700.000 kadarının ölümle sonuçlandığı tahmin edilmektedir. Yine yapılan araştırmalarda ölümle sonuçlanan olguların büyük bir çoğunluğunun 5 yaş altındaki çocuklardan oluştuğu ve infeksiyon görülme sıklığının 6–7 aylık bebeklerde pik yaptığı görülmektedir. Olguların % 95'i ve ölümlerin % 98'i birçok Asya ülkesinde olduğu gibi gelişmekte olan ülkelere bildirilmektedir. Gelişmekte olan ülkelere mortalite oranları gelişmiş ülkelerin birkaç katıdır ve hayatta kalanların % 15 ile % 30'unda zekâ geriliği veya sağırılık gibi kalıcı sekeller meydana gelmektedir.

Birçok gelişmiş ülkede Hib hastalıklarının sıklığı sistematik aşılama ile bariz bir şekilde azalmıştır (20). 1999 yılı sonunda 38 ülkede yeni doğanlar Hib aşısı ile bağışıklanırken 2004 yılı sonuna kadar aşılanmanın uygulandığı ülke sayısı 78'e yükselmiştir. Gelişmiş ülkelere toplumun % 92'si aşılanmışken bu oran gelişmekte olan ülkelere % 42 ve az gelişmiş ülkelere % 8'de kalmıştır. Bununla birlikte Hib aşısının Japonya başta olmak üzere bazı ülkelere uygulanmadığı bilinmektedir (2, 3, 21, 22, 23).

2.3.3. MİKROBİYOLOJİK ÖZELLİKLER

2.3.3.1 HÜCRE MORFOLOJİSİ

H. influenzae 0,3-0,5 µm x 0,5-1,0 µm boyutlarında ince, kısa çomak ya da kokobasil şeklinde Gram negatif bir bakteridir. Gram yöntemi ile göreceli olarak zayıf boyanırlar. Gram boyamada zıt boya olarak sulandırılmış karbol fuksinin 5-15 dakika uygulanması iyi sonuç verir (11). Genellikle pleomorfik, uzun filamentoz formlarda, bazı kültürlerden yapılan preparasyonlarda ise kokobasil tarzında görülebilmektedir. *H. influenzae*'nin etken olduğu tedavi edilmemiş menenjitli olguların % 80' inden fazlasının beyin omurilik sıvılarından

(BOS) hazırlanan preparasyonlarda suşların tüm formları (kokoid, kokobasil, kısa çomak, uzun çomak, filamantöz) görülebilmektedir (3, 11, 13).

2.3.3.2. KÜLTÜR ÖZELLİKLERİ

2.3.3.2.1 Üreme faktörlerine olan gereksinim

Haemophilus türleri kanda bulunan ve üremesi için gerekli olan faktörlerin yokluğunda üreyemediği için *Haemophilus* (kan seven) olarak adlandırılmışlardır. *Haemophilus* cinsinin tanımlanmasında üreme faktörlerine olan gereksinimi önemlidir. *H. influenzae* üreyebilmek için eritrositlerde bulunan ısıya dayanıklı X faktörü (Hemin) ile ısıya dayanıksız V faktörüne (NAD) ihtiyaç duymaktadır (3, 11).

2.3.3.2.2 X FAKTÖRÜ

1924 yılında Fildes X-faktörünü hemin olarak adlandırmış ve respirasyonda rol oynadığını öne sürmüştür. *H. influenzae* hemolizine sahip olmadığı için eritrositlerden demir elde edememektedir. Demir ihtiyacını ve esansiyel porfirini sağladığı için heme ihtiyaç duyar. D.A. Herrington ve F.P. Sparling *H. parainfluenzae*'nin aksine *H. influenzae*'nin demir kaynağı olarak insan transferrinini kullanabildiğini göstermiştir. Bunun yanında hemoglobin-haptoglobulin kompleksleri, hem-hemopeksin ve hem-albumin *H. influenzae* için demir kaynağı olabilmektedir (3, 11, 24).

2.3.3.2.3 V FAKTÖRÜ

V faktörü bakteriyel hücre büyümesinde oksidasyon-redüksiyon basamağında rol almaktadır. V faktörü gereksinimi NAD ya da bu koenzimin prekürsörleri kullanılarak sağlanır. Kanda bulunmasına rağmen büyük hücre içi yapısından dolayı V-faktörü *Haemophilus* tarafından kullanılamamaktadır. V faktörünün kandan dışarıya salınması için Levintal veya çikolatalı agar besiyerlerinin hazırlık aşamasında olduğu gibi kanın kısa bir süre ısı ile muamele edilmesi gerekmektedir. Kanın 75 °C'ye ısıtılması ile eritrositlerden V-faktörü salınmasının yanında V faktörü tahribine yol açan NADaz enziminin inaktivasyonu da sağlanmış olur (3, 11).

2.3.3.2.4 Üreme için gerekli fiziksel koşullar

H. influenzae'nin üremesi için gereken optimum sıcaklık 35-37 °C'dir. Olması gereken minimum sıcaklık ise 20-25 °C'dir. *Haemophilus* türlerinin çoğu 55 °C'de 30 dakika içinde ölürlür. *H. influenzae* aerobik ortamda, anaerobik ortamdaki daha iyi üremektedir. *Haemophilus* türlerinin ilk izolasyonunda ortamda karbondioksit bulunması gereklidir. Karbondioksit üremeyi artırıcı özellik gösterir (3, 11).

2.3.3.2.5 Koloni Morfolojisi

H. influenzae kanlı agarda şeffaf, konveks ya da yassı, iğne ucu tarzında koloniler oluşturur. Kapsüllü suşlar bitişik üremeye meyilli olup kapsülsüz suşlar ayrı koloniler şeklinde üreme eğilimindedir. *H. influenzae*'nin kapsüllü suşları büyük, oldukça opak, düz, mukoid 3-4 µm çapında koloniler oluşturabilir. İlk kültürlerde kısmen M tipi (mukoid) koloni görünümünde üreyebilmekle birlikte S ve R tipi koloniler de oluşturabilir. *Staphylococcus* gibi V faktörü salgılayan komşu bakteri kolonilerinin varlığında *H. influenzae* kolonileri daha büyür (satellizm). Menenjit ve epiglottit olgularından izole edilen suşlar çoğunlukla indol üretir ve karakteristik olarak keskin kokuludur (3, 11, 25).

2.3.4. ANTİJENİK YAPI

2.3.4.1 Kapsül

H. influenzae'nin farklı yüzey yapıları bakterinin patojenitesinde önemli rol oynamaktadır. *H. influenzae*'nin neden olduğu sistemik hastalıkların büyük bir kısmı kapsüllü suşlar tarafından oluşturulmaktadır. Kapsül polisakkaritinin antijenik yapısına göre altı antijenik serotip (a, b, c, d, e, f) tanımlanmıştır. Kapsül oldukça karakterize olup, poliribitol ribitol fosfat (PRP) olarak da bilinen ribitol, riboz ve fosfat içeren antifagositik polisakkarit yapıdadır. İnvaziv hastalıkların büyük kısmının *H. influenzae* tip b (Hib) kaynaklı olduğu bilinmektedir. Hib'in majör virülans faktörü kapsülüdür. Kapsüle karşı gelişen antikorlar, bakteriyel fagositozu ve kompleman aracılı bakterisidal aktiviteyi stimüle eder (11, 13, 20, 26).

Hib'in neden olduğu hastalıkların anti-PRP antikorlarının olmayışı ile ilişkili olduğu bilinmektedir. İki yaşından küçük çocuklarda bu antikorlar ya yoktur ya da az miktarda anneden geçen antikorlar bulunabilir. Bu nedenle özellikle bu yaş grubunda Hib infeksiyonlarına duyarlılık artmaktadır (11, 27).

2.3.4.2 Pili

H. influenza'nın kapsüllü ve kapsülsüz suşlarında pili varlığı gösterilmiştir. Genellikle nazofarinksten izole edilen *H. influenza* suşları piliye sahipken kan ve BOS'tan izole edilenlerde pili bulunmamaktadır. Tekrarlayan seri kültürlerden elde edilen izolatların çoğunda da pili bulunmamaktadır (11, 28).

2.3.4.3 Lipo-oligosakkarit

Dış membranın asıl içeriği lipooligosakkarit (LOS)'tir. *Enterobacteriaceae*'de olduğu gibi, lipid A'nın yapısı iki fosfat grubu ile yer değiştirmiş bir glukozamin disakkaritten oluşmaktadır. Kapsülsüz ve kapsüllü suşlar lipid A komponentleri ile birbirinden ayrılmaktadır. Dış zarf oligosakkaritleri daha çok glukoz ve galaktoz içermektedir (11, 29). Hib LOS'ları *Enterobacteriaceae* LOS'ları ile kimyasal olarak farklı olmalarına rağmen biyolojik aktiviteleri benzerlik göstermektedir. Hib LOS'ları ile inkübe edilen insan lökositlerinin güçlü prokoagulan aktivite göstermesinin ciddi seyirli Hib infeksiyonlarındaki intravasküler koagülasyonu açıkladığı belirtilmektedir (20).

2.3.4.4 Dış-Membran proteinleri

H. influenza'nın dış membranı birkaç major polipeptidli 10-20 farklı protein içerir. Dış membranın % 80'i proteinden oluşmaktadır (Dış membran proteini-OMP). *H. influenza*'nın dış membranı lipooligosakkarit ve fosfolipid içermektedir. Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalar, kapsüllü ve kapsülsüz suşlardaki dış membran yapısının diğer Gram negatif bakterilere benzediğini göstermektedir. Patojenite ve mikroorganizmaya karşı gelişen immünitede dış membran proteinlerinin rolü tam olarak açıklanamamıştır. Bu proteinler transport, adezyon ya da diğer fonksiyonlarda görev almaktadır (11, 20). Major OMP'ler P1, P2, P4, P5 ve P6'dır. P3 ise P1 ve P5'den oluşur. Bütün suşlarda P1, P2, P6 bulunur. P2, en fazla bulunan OMP'dir ve virülansda rol oynadığı düşünülmektedir (30).

2.3.4.5 IgA Proteaz

IgA mukozal savunmada önemli rol oynar. *H. influenzae*'nin kapsüllü ve kapsülsüz suşları tarafından üç farklı tipte IgA1 proteaz salgılanmakta ve bakterilerin mukozal yüzeylerine kolonizasyonunu kolaylaştırmaktadır (13, 20).

2.3.5. PATOGENEZ VE VİRÜLANS FAKTÖRLERİ

2.3.5.1 PATOGENEZ

2.3.5.1.1 Kapsüllü *H. influenzae*

H. influenzae *Haemophilus* cinsi içinde insanda en sık infeksiyon yapan türdür. *H. influenzae* infeksiyonlarının çoğu bakterinin kan ya da solunum yolu sisteminden yayılmasıyla ortaya çıkar. Kapsüllü *H. influenzae* tiplerinden en sık infeksiyona yol açan tip b (Hib) ise 5 yaşından küçük çocuklarda başta menenjit olmak üzere epiglottit, pnömoni, selülit, osteomyelit ve septik artrit gibi invaziv infeksiyonlara neden olur. Hib menenjiti sonrası yaşayan olguların yaklaşık % 20'sinde nörolojik sekel kalabilmektedir. Hib infeksiyonu için sosyoekonomik koşullar, kalabalık ortamlar, gündüz bakımevleri, kronik hastalıklar ve sağlık koşullarının bozukluğu başlıca risk faktörleri arasında yer almaktadır. Diğer kapsüllü tiplerden, özellikle tip a, daha çok gelişmekte olan ülkelerde infeksiyonlara neden olmaktadır. Aşılama ile invaziv Hib infeksiyonları büyük oranda azalmış olmakla birlikte konjuge Hib aşılama sonrası tip a infeksiyonlarında artış bildirilmiştir (11, 12, 13, 20).

2.3.5.1.2 Kapsülsüz *H. influenzae*

Kapsülsüz *H. influenzae* kronik bronşit, bronşiektazi, kistik fibrozis gibi altta yatan solunum yolu hastalığı olan olgularda daha sık görülmektedir. Kapsülsüz suşlar akut otitis media ve akut-kronik sinüzit olgularının yaklaşık üçte birinde infeksiyon nedeni olabilmekte ve genellikle altta yatan sigara kullanımı, yabancı cisimler, çeşitli irritan faktörler ve anatomik bozukluklar infeksiyonu kolaylaştırıcı sebepler arasında yer almaktadır. Bu tür suşların son yıllarda yetişkin ve çocuklarda invaziv hastalıklarda da rol alabildiği bildirilmiştir. Kapsülsüz *H. influenzae* menenjitlerinin çoğunda baş bölgesinde yaralanma, BOS sızıntısı, otitis media ve sinüzit gibi predispozan hastalık ya da faktörler ile immun sistem zayıflığı bulunmaktadır (11, 12, 13, 20).

2.3.5.2 VİRÜLANS

2.3.5.2.1 Kapsüllü *H. influenzae*

H. influenzae tip b'de kapsül major virülans faktörüdür. Yapılan çalışmalar kapsül tipleri içinde virulansı en fazla olanın tip b olduğunu ve bunu tip a'nın izlediğini göstermektedir (11). Bakteri kapsülü kolonizasyona yardımcı olmakta ve olasılıkla fagositoz ile komplemana bağımlı lizise karşı koruyucu rol oynamaktadır. Aderans ve kolonizasyonda etkili olan diğer virülans faktörü ise bakterinin lipopolisakkarit (LPS)'leridir. LPS genellikle nazofaringeal kolonizasyonda rol oynamakta ancak invazyonda etkin olmadığı bilinmektedir. Pili ve diğer yapıların aderans ve invazyonda etkili olduğu gözlenmiştir. OMP P2 Hib virülansında etkili olmakta ve purifiye peptidoglikanların sıçan ve tavşan modellerinde beyin ödemi ve inflamasyona neden olduğu bilinmektedir. IgA proteazları tüm Hib'ler tarafından üretilmektedir. *H. influenzae* in-vivo ortamda demire gereksinim duymakta, transferrin bağlama kabiliyetinin Hib'in invaziv infeksiyonları ile sıkı ilişkili olduğu bilinmektedir (11). *H. influenzae* tip b suşlarının çoğu bakteriosin (hemozin) üretmektedir (11, 12).

2.3.5.2.2 Kapsülsüz *H. influenzae*

Pili ve OMP P2 kapsülsüz *H. influenzae* için en önemli virülans faktörleridir. IgA1 proteaz ve siliotoksin salınımı pnömoni patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. Kapsülsüz *H. influenzae* ve *H. influenzae* tip b'nin çeşitli özellikleri tablo 2'de karşılaştırılmıştır.

Tablo 2. Kapsülsüz *H. influenzae* ve *H. influenzae* tip b'nin çeşitli özelliklerinin karşılaştırılması (12).

Özellik	Kapsülsüz <i>H. influenzae</i>	<i>H. influenzae</i> tip b
Üst solunum yolunda kolonizasyon oranı	% 30-% 80	aşılı popülasyonda < % 1; aşısız popülasyon % 2-% 4
Kapsül	Kapsülsüz	PRP kapsül
Patogenez	Mukozal infeksiyonlar	İnvaziv infeksiyonlar
Klinik manifestasyonlar	Otitis media, KOAH alevlenmeleri, sinuzit	İnfant ve çocuklarda; menenjit, epiglottit, diğer invaziv infeksiyonlar
Evrimsel gelişim	Genetik olarak değişken	Klonal
Aşı	Uygulaması yok, gelişim sürecinde	PRP konjuge aşıları oldukça etkili

2.3.6. KLİNİK ÖNEMİ

2.3.6.1. Kapsüllü *H. influenzae*

2.3.6.1.1. Menenjit

Menenjit, *H. influenzae* tip b'nin yol açtığı en ciddi klinik tablolardan biridir ve Hib menenjiti pediatrik menenjitin en yaygın nedenleri arasında yer alır; ancak bu durum konjuge aşuların kullanılmaya başlanmasından sonra değişmiştir. Genellikle bağışık olmayan hastalarda nazofarenksdeki mikroorganizmaların kana yayılımı sonucunda ortaya çıkar. 1–3 günlük bir üst solunum yolu infeksiyonu sonrasında tipik menenjit belirti ve bulguları görülmeye başlar ancak klinik bulgular diğer akut bakteriyel menenjitlerden ayırt edici özelliklere sahip değildir. En sık görüldüğü yaş aşı uygulamasına bağlı olarak değişmektedir ve genellikle iki yaş altında daha çok rastlanmaktadır. Erişkinlerde sık görülmemekte ancak geçirilmiş kafa travması, beyin-cerrahi operasyonu, paranazal sinüzit veya otitlerden sonra ortaya çıkmaktadır. Ateş ve santral sinir sistemi fonksiyonlarında değişme en sık görülen belirtilerdir. Hastalık ilerledikçe konvülsiyon ya da koma gelişebilir; bazen hızla ölüme neden olabilmektedir. Küçük çocuklarda belirti ve bulgular her zaman belirgin değildir, ancak anterior fontanelde gerginlik, fokal nöbetler, hemiparalizi ya da nörolojik bozukluklar bulunduğu menenjitten şüphelenilmelidir. Uygun tedaviyle mortalite % 5'in altında kalır, nadiren kalıcı sekeller oluşabilir (12, 13, 20).

2.3.6.1.2. Epiglottit:

H. influenzae tip b'nin subraglotik bölgede neden olduğu sellülit sonucu ortaya çıkmaktadır. Neden olduğu akut solunum yolu tıkanıklığı sonucu hızlı gelişen (4–6) ve ölümlü sonuçlanabilen bir hastalıktır. Genellikle 2–7 yaş arasında görülmesine karşın *H. influenzae* menenjitinden farklı olarak erişkinlerde de rastlanmaktadır. Boğaz ağrısı, dispne, oral sekresyonlarda artış, ateş, disfaji ve halsizlik önemli bulgulardan bazılarıdır. Uygun şekilde (trakeostomi, antibiyotik tedavisi) tedavi edilmediği takdirde ani ölümler görülebilir. Ölümler sadece solunum yolu tıkanıklıklarına bağlı olmayıp akut sepsis sonucu da ortaya çıkabilir. Aşının uygulanmaya başlanmasıyla birlikte epiglottit görülme sıklığı belirgin bir şekilde azalmıştır (12, 13, 20).

2.3.6.1.3. Pnömoni ve Ampiyem

Özellikle çocuklarda *H. influenzae* tip b'nin neden olduğu primer akciğer hastalıklarının görülme oranı tam olarak bilinmemekle birlikte genellikle 4 ay ile 4 yaş arasında ve kışın veya ilkbaharda daha sık görülmektedir. Kliniği diğer bakteriyel pnömonilere benzer. Yoğun pnömoniye sıklıkla plevra tutulumu da eşlik etmekte ve bu durum çoğu zaman hastaneye yatışı gerektirmektedir. Hib pnömonisi genellikle yavaş seyirlidir. Lober pnömoni yapma eğiliminde olmakla birlikte segmental, interstisyel, diffüz ve bazı olgularda plevral ve perikardiyal tutulum da görülmektedir. Perikard tutulumunda ciddi taşikardi, dispne, kardiyovasküler yetmezlik semptomları ortaya çıkar (12, 20).

2.3.6.1.4. Selülit

Aşı programının uygulanması ile birlikte *H. influenzae* selülitinin de epiglottit ve menenjit gibi görülme sıklığı azalmıştır. Selülit genellikle küçük çocuklarda görülür. Ateş, yanak ya da periorbital alanda şişlik, kızarıklık, kırmızı-mavi lekeler, selülit ve hassasiyet mevcuttur. Yumuşak doku tutulumu hızlı bir biçimde gerçekleşir. Çocukların bir bölümünde bakteriyemi nedeniyle diğer septik odak belirtileri (menenjit, vb.) gelişebilir (12, 13, 20).

2.3.6.1.5. Bakteriyemi

Özellikle 6–36 aylık çocuklarda herhangi bir lokal infeksiyon olmaksızın görülen bakteriyemilerde *H. influenzae* önemli bir etkidir. Yüksek ateş (>39 °C), halsizlik, iştahsızlık ve periferik nötrofil sayısında artış görülür. Orak hücre anemisi hastalığı ve splenektomi yapılan çocuklarda bakteriyemi görülme oranı oldukça fazladır. Gizli Hib bakteriyemisi olan çocukların yaklaşık % 30–50 'sinde menenjit, selülit ve pnömoni gibi fokal infeksiyonlar gelişmektedir. Genel durumun hızla bozulması ve septik şok gelişebilmesi nedeniyle *H. influenzae* 'nın neden olduğu bakteriyemilerde erken tanı ve tedavi önem taşımaktadır (12, 20).

2.3.6.1.6. Septik Artrit

Hib, konjuge aşuların uygulanmaya başlanmasından önce özellikle iki yaş altı çocuklarda septik artrit en sık görülen etkenlerinden biri olarak bilinmekteydi. Genellikle kan yoluyla yayılma sonucu daha çok alt ekstermitelerde tek ve büyük bir eklemden görülen septik artrit olgularında (osteomyelit olmaksızın) hareket kısıtlanması, hareketle birlikte ağrı, şişlik mevcuttur. Uzamış ateş ve irritabilite septik artrit önemli belirtileridir. Hastalık

antibiyotik tedavisine iyi yanıt verir ve genellikle başarılı sonuçlar alınır ancak çocukların önemli bir yüzdesinde kalıcı eklem disfonksiyonu geliştiği için uzun dönem takip yapılması önemlidir.

Hib, erişkinlerde de sıklıkla septik artrite neden olmaktadır. Alkol bağımlılığı, travma ayrıca romatoid artrit, sistemik lupus eritematozis, diabetes mellitus, splenektomi , multiple myeloma, lenfoma ve değişik hipogamaglobulinemili hastalar gibi immünkompromize grupta ve daha önceden hasar görmüş eklemleri olan hastalarda görülme sıklığı artmaktadır (12, 13, 20).

2.3.6.2 Kapsülsüz *H. influenzae*

2.3.6.2.1 Otitis Media

Tiplendirilemeyen *H. Influenzae*, akut otitis media olgularının yaklaşık olarak % 25 - 35'inden sorumludur. Orta kulaktan izole edilen suşların % 90'ından fazlası kapsülsüz *H. influenzae*'dir. Kapsülsüz *H. influenzae* ile oluşan akut otitis media her yaşta görülmekle birlikte özellikle 6 ay ile 5 yaş arasındaki çocuklarda diğer yaşlara göre daha sık görülür. Küçük çocuklarda ateş ve irritabilite sık gözlenirken, daha ileri yaştaki olgularda kulak ağrısı yaygındır. Otitis media genellikle bir viral üst solunum yolu infeksiyonunu takiben görülmekte ve tanı otoskopla muayene sonucu konulabilmektedir. Ayrıca timpanosentez de tanıya yardımcı olmakta, ancak rutin olarak uygulanmamaktadır (12, 13).

2.3.6.2.2 KOAH Akut Alevlenmeleri

Tiplendirilemeyen *H. influenzae* KOAH akut alevlenmelerinin en sık görülen etkenlerindedir. Klinik olarak diğer bakteriyel pnömonilerden ayırımı güçtür. Tiplendirilemeyen *H. influenzae*'nin neden olduğu KOAH alevlenmelerinde öksürük, pürülan balgam, dispne ve düşük düzeyde ateşle karakterize bir klinik tablo mevcuttur. Akciğer grafisi genellikle tanı koydurucu değildir. Gramla boyanmış balgam preparatlarında Gram negatif küçük, pleomorfik kokobasillerin görülmesi tanıya yardımcıdır (3, 12).

2.3.6.2.3 Toplum Kökenli Pnömoni

Tiplendirilemeyen *H. influenzae* genellikle KOAH'ı olanlarda, yaşlılarda, edinsel bağışıklılık yetmezliği olanlarda önemli bir pnömoni nedenidir. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde kapsülsüz *H. influenzae* çocuklarda sebep olduğu pnömoni nedeniyle önemli

morbitite ve mortaliteye sahiptir. Klinik tablo diğer bakterilerin oluşturduklarından farklı değildir; öksürük, ateş, pürülan karakterde balgam sıklıkla mevcuttur. Akciğer grafisi ve balgam preparatlarının Gram boyamasında Gram negatif kokobasillerin görülmesi tanıda yardımcıdır (12,20).

2.3.6.2.4. Sinüzit

Akut maksillar sinüzitlerin önemli bir bölümünden kapsülsüz *H. influenzae* sorumludur. Genellikle burun tıkanıklığı, baş ağrısı, pürülan burun akıntısı en sık görülen belirtilerdir. Etiyolojik tanıda sinüs aspirasyonu tanıya yardımcı olmaktadır (3, 12).

2.3.6.2.5. Neonatal Sepsis

Özellikle 1980'li yıllardan bu yana tiplendirilemeyen *H. influenzae*'nin neden olduğu neonatal sepsis olgularında artış gözlenmektedir. Bu sepsis olgularının mortalitesi oldukça yüksektir ve biyotip-IV suşları olguların önemli bir bölümünden sorumlu tutulmaktadır. Endometrite bağlı postpartum-sepsis, kronik salpenjit, tubaovarial apse olgularında da biyotip-IV'e sıklıkla rastlanmaktadır. Tanı laparoskopi sırasında alınan tubal ve periton sıvısı kültürlerinden *H. influenzae*'nin izole edilmesiyle konmaktadır (3, 12).

2.3.6.2.6. Bakteriyemi

Tiplendirilemeyen *H. influenzae* nadiren bakteriyemiye de neden olmaktadır. Bakteriyemi riski alkolizm, HIV, kardiyopulmoner hastalığı olan bireyler ve kanserli olgularda daha yüksektir. Bakteriyemi kaynağı genellikle solunum yoludur ve mortalite oldukça yüksektir (12, 25).

2.3.6.2.7. Konjunktivit

Kapsülsüz *H.influenzae* özellikle çocuklarda önemli bir bakteriyel konjunktivit etkeni olup özellikle kreş ve yuvalarda salgınlara yol açmaktadır. En sık rastlanan klinik bulgular konjunktival hiperemi ve pürülan akıntıdır (12).

Tiplendirilemeyen *H. influenzae* ayrıca erişkinlerde epiglottit, septik artrit, osteomyelit, ampiyem, perikardit, kolesistit, intraabdominal infeksiyonlar, selülit ve vasküler graft infeksiyonlarına neden olmaktadır.

2.3.7. LABORATUVAR TANISI

2.3.7.1 Örnek toplanması ve transportu

Aşılanmış kişilerde *Haemophilus* infeksiyonlarının büyük bir bölümü orofarinksten kaynaklanmaktadır. Bu kişilerde infeksiyon üst ve alt solunum yollarında sınırlı kalmaktadır. Bu nedenle alınan örneklerin oral sekresyonlarla kontaminasyonundan mümkün olduğunca kaçınılmalıdır. Boğaz sürüntü örnekleri damak kemerinin ön kısmı ve farinks yüzeylerinden alınmamalıdır (3, 12).

Otit veya sinüzitin tanısı amacıyla doğrudan iğne aspirasyonu, pnömoni tanısı için ise balgam örnekleri kullanılmalıdır. Pnömonili hastalarda kan kültürleri de tanı amaçlı kullanılabilir ancak üst solunum yolu infeksiyonlu hastalarda kan kültürlerinin negatif sonuç vereceği unutulmamalıdır. Kan kültürleri artrit, sellülit ve epiglottit tanısı için de alınmalıdır. Epiglottit şüpheli olgulardan öksürüğü stimüle edip solunum yolu tıkanıklığına yol açmamak için boğaz sürüntü örneği alınmamalıdır (13).

Menenjit şüpheli olgularda beyin omurilik sıvısı (BOS) ve kan kültürleri yapılır. Tedavi edilmemiş olguların BOS örneklerinin mililitresinde yaklaşık olarak 10^7 bakteri bulunur. Mikroskopi, kültür ve antijen tespiti için genellikle 1–2 ml BOS örneği yeterlidir. Ancak bazı durumlarda örnekte daha az sayıda bakteri bulunacağından en az santrifüj edilebilecek bir miktarda örnek alınması uygundur (3, 13).

İnfeksiyon odağına bağlı olarak *Haemophilus* izolasyonunun yapılabileceği diğer örnekler, aspire edilmiş perikard, plevra, bronş ve sinoviyal sıvılar, cerahat, idrar ve bazen vajinal sürüntü örnekleridir.

Alınan örnekler laboratuvara ulaştırılırken bakteriyolojik besiyerleri içerisinde gönderilmelidir. Mümkünse hasta başında ekim yapılmalıdır. Alınan örneklerin hepsi oda ısısında tutulmalı ve bekletilmeden kısa süre içerisinde işleme alınmalıdır (3, 13).

2.3.7.2 İzolasyon

Haemophilus türlerinin izolasyonu yapılırken bu bakterilerin özel üreme koşulları göz önünde bulundurulmalıdır. *Haemophilus* türleri üreyebilmek için hemin (X faktörü) ve NAD (V faktörü)'a ihtiyaç duyarlar. Her iki faktör de kanda bulunmaktadır. Ancak konvansiyonel kanlı agarda X faktörü bulunurken V faktörünün de kandan salınması için kan hücrelerinin

kısa bir ısıtmaya maruz bırakılıp parçalanması gerekir. Bu parçalanma, kanlı besiyeri hazırlanması sırasında kanın, besiyeri yaklaşık olarak 80 °C sıcaklıkta iken ilave edilmesiyle sağlanır (3, 11).

Normal kanlı agar düşük düzeyde V faktörü bulundurduğundan dolayı bu besiyeri *Haemophilus* cinsi bakterilerin üremesi için uygun değildir. *Haemophilus* türlerinin çoğu çikolata agarda çok iyi ürer.

Solunum sisteminden *Haemophilus* türlerinin primer izolasyonları için diğer solunum sistemi florasının inhibisyonu amacı ile besiyerine basitrasin (ya da vankomisin ve klindamisin) eklenebilir (11). Basitrasinli çikolatalı agar kullanıldığında *H. influenzae* izolasyonunda önemli bir oranda artış olduğu da bildirilmiştir (3).

Kistik fibrozlu hastalardan alınan balgam kültürlerinde *H. influenzae* izolasyonu esnasında karşılaşılan en önemli sorun yine bu hastaların balgam kültürlerinde sıklıkla izole edilen *P. aeruginosa*'nın *H. influenzae* 'nın üremesini baskılayacak kadar yoğun üremesidir. Bu sorun çikolatamsı agara yapılan kültürlerin anaerob ortamda inkübasyonu ile kısmen de olsa giderilmiştir. NAG besiyeri (N-asetil glukozamin, hemin ve NAD ile desteklenen kanlı agar) kistik fibrozlu olgularda *H. influenzae* izolasyonunda kullanılan bir diğer besiyeridir (31).

Kapsüllü *H. influenzae* suşlarının transparan ve renksiz yakın bir besiyeri olan Levinthal agardaki renk değiştirme özellikleri bu suşların tanımlanmasında kullanılabilir (3, 32).

Güç üreyen *Haemophilus aegyptius* türleri için besiyerine % 1 oranında üreme faktörü supplementlerinin (İzoVitalax, Vitox ya da kofaktör-vitamin-amino grup asitleri) çikolata agara eklenmesi üremeyi artırabilir.

2.3.7.3 İdentifikasyon

Haemophilus türlerinin ayırımında öncelikle suşların X ve V faktörüne olan ihtiyaçları belirlenir. Bakterinin faktör ihtiyacını belirlemek için içerisinde X ve V faktör bulunmayan besiyerleri kullanılır. Ancak, temel sıvı ve katı besiyerlerinin bile çoğunluğu eser miktarda X faktörü içermektedir. Bu nedenle, X faktörü gereksiniminin saptanmasında Triptik soy agar, Mueller-Hinton agar ve beyin kalp infüzyon agara göre daha uygun bulunmaktadır (11).

X faktörü ihtiyacının belirlenmesi amacı ile porfirin testi de kullanılır. Üremek için X faktörüne ihtiyaç duymayan türlerde test pozitif iken X faktörüne bağımlı türlerde negatif olarak saptanır.

H. haemolyticus'dan *H. influenzae*'yı, *H. parahaemolyticus*'dan *H. parainfluenzae*'yı ayırt edebilmek amacı ile bakterinin at kanlı agarda hemoliz yapma özellikleri kullanılır.

Haemophilus türlerinin ayrımında ayrıca üçlü biyokimyasal testler (glukoz, laktoz, sükröz fermentasyonu), üreaz ve ornitin dekarboksilaz aktivitesi ve indol üretimi gibi çeşitli testler kullanılmaktadır. Tablo 3'de *Haemophilus* türlerinin çeşitli biyokimyasal özellikleri gösterilmiştir.

Tablo 3. *Haemophilus* türlerinin çeşitli biyokimyasal özellikleri.

Tür	Kat	Oks	Ind	Ure	Glu	Fru	Gal	Lak	Man	Suk	Tre	Ksyl
<i>H. influenzae</i>	+	+	F	F	+	-	+	-	-	-	-	+
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	D	+	+	Z	+	-	-	-	-	D
<i>H. haemoglobinophilus</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+
<i>H. ducreyi</i>	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>H. aphrophilus</i>	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-
<i>H. parainfluenzae</i>	D	+	F	F	+	+	+	-	-	+	-	-
<i>H. parahaemolyticus</i>	D	+	-	+	+	+	D	-	-	+	-	-
<i>H. paraphrohaemolyticus</i>	+	+	-	+	+	+	D	-	-	+	-	-
<i>H. paraprophilus</i>	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-
<i>H. segnis</i>	D,Z	-	-	-	Z	Z	D,Z	-	-	Z	-	-
<i>H. parasuis</i>	+	-	-	-	+	+	+	D	-	+	-	-

Kat: Katalaz; Oks: Oksidaz; Ind: Indol; Ure: Üreaz; Glu: Glukoz; Fru: Fruktoz; Gal: Galaktoz; Lak: Laktoz; Man: Mannitol; Suk: Sukroz; Tre: Trehaloz; Ksyl: Ksiloz; F: Farklı reaksiyon veren; Z: Zayıf reaksiyon; D: Değişken.

2.3.7.4 Muhafaza ve Saklama

Haemophilus türlerinin kültürleri kapaklı tüplere dökülmüş eğri çikolata agara yoğun inoküle ederek kısa süreli saklanabilir. Bu besiyerinde 37 derecede bir gecelik inkübasyon sonrası hava almayan kaplarda ve oda sıcaklığında izolatlar 4–6 hafta süre ile saklanabilir.

Uzun dönem için % 15–20 gliserol ilave edilmiş triptik soy buyyonda -70° C’de saklama yapılmalıdır.

2.3.8. TEDAVİ VE KEMOPROFİLAKSİ

2.3.8.1 TEDAVİ

Özellikle Hib’in neden olduğu menenjit ve epiglottit gibi invaziv infeksiyonlarda kısa bir süre içerisinde tedaviye başlanılmaz ise ölüm oranları yüksektir (20). Yaşamı tehdit eden bu tip infeksiyonlarda ilk seçenek beta-laktamaz üretmeyen suşlar için ampisilin, beta-laktamaz üreten suşlar için ise parenteral yolla uygulanan üçüncü kuşak sefalosporinler ve kloramfenikoldür. Üçüncü kuşak sefalosporinlere direnç söz konusu olduğunda tedaviye karbapenem eklenebilir. Sadece yetişkin hastalarda alternatif ilaç olarak florokinolon eklenebilir. Endoftalmit, endokardit, perikardit ya da osteomyelit gibi komplikasyonlar geliştiğinde tedavi süresi 3 - 6 hafta sürdürülmelidir (2, 3, 13, 20).

İki yaş üzeri çocuklarda Hib’in neden olduğu menenjitte kortikosteroidlerin (deksametazon gibi) antibiyotiklerle birlikte kullanılması nörolojik sekelleri önemli ölçüde azaltmaktadır ve yaygın olarak uygulanmaktadır (12).

Çocukluk çağı pnömonilerinde ayaktan hastalar için ampirik tedavide yüksek doz amoksisilin ya da amoksisilin-klavulanat ilk tercih edilen antimikrobiyallerdir. Yatan hastalarda ise beta-laktamaz üreten suşları da kapsamaları amacıyla seftriakson veya sefotaksim gibi geniş spektrumlu üçüncü kuşak sefalosporinler tercih edilmektedir (2, 20, 33).

Sefuroksim *H. influenzae* infeksiyonlarında oldukça etkin olması nedeniyle menenjit dışı infeksiyonların ampirik tedavisinde kullanılmaktadır (20).

Toplum kökenli pnömonide hiçbir komorbiditesi olmayan ayaktan hastalar için son üç ayda antibiyotik tedavisi uygulanmamışsa azitromisin, klaritromisin ve doksisisiklin; son üç ayda antibiyotik tedavisi uygulanmışsa levofloksasin, gatifloksasin, gemifloksasin veya moksifloksasin ya da makrolid / beta-laktam kombinasyonu [azitromisin veya klaritromisin ile amoksisilin (3 g/gün) veya amoksisilin-klavulanat (4g/250 mg/gün)] önerilmektedir. Komorbiditeleri olan ayaktan hastalar için son üç ayda antibiyotik tedavisi uygulanmamışsa azitromisin, klaritromisin, levofloksasin, gatifloksasin, gemifloksasin veya moksifloksasin; son üç ayda antibiyotik tedavisi uygulanmışsa levofloksasin, gatifloksasin, gemifloksasin veya moksifloksasin ya da da makrolid- beta-laktam kombinasyonu (azitromisin veya

klaritromisin ile amoksisilin-klavulanat [4g/250mg/gün]) önerilmektedir. Aspirasyon pnömonisinden şüpheleniliyorsa amoksisilin-klavulanat veya klindamisin önerilmektedir (2).

Penisilin alerjisi olanlar için ise trimetoprim-sulfametoksazol, doksisiklin, azitromisin, klaritromisin, eritromisin ve telitromisin önerilmektedir (2).

KOAH alevlenmelerinin tedavisinde altta yatan risk faktörü olmayan hastalar için önerilen antibiyotikler arasında azitromisin, klaritromisin telitromisin, doksisiklin, sefuroksim aksetil, sefpodoksım ve sefdinir yer alırken risk faktörlerine sahip hastalar için amoksisilin-klavulanik asit, levofloksasin, gatifloksasin, gemifloksasin ve moksifloksasin önerilir (12).

2.3.8.2 KEMOPROFLAKSİ

Önceden aşı uygulanmayan dört yaş altı çocuklarda hastalık riski yüksek olduğundan bu kişilerin Hib infeksiyonlu kişilerle temasından sonra kemoproflaksi gerekmektedir. Bu amaçla günde bir kez 20 mg/kg (maksimum 600mg/gün) rifampisin dört gün süreyle verilir (Yenidoğanlara 10mg/kg/gün verilir, gebelere verilmez). Rifampin kemoproflaksisi uygulanması taşıyıcılığı % 95 oranında ortadan kaldırmakta ve özellikle aile bireyleri arasında sekonder olguların gelişimini önemli ölçüde azaltmaktadır (12).

2.3.9. AKTİF BAĞIŞIKLAMA

H. influenzae tip b infeksiyonlarının (menenjitte olduğu gibi) yüksek oranda ölümcül seyretmesi ve nörolojik sekellere yol açması nedeniyle aktif bağışıklama gerekmektedir. Küçük çocuklardaki invaziv *H. influenzae* tip b infeksiyonlarının önlenmesinde konjuge aşılarda oldukça etkilidir. Aşılarda PRP kapsülüne karşı serum antikorlarını indükler ve bu antikorlar bakterisidaldir. PRP'ye karşı serum antikorlarının koruyucu seviyesi yaklaşık 0,15 µg/ml'dir. (12).

İlk Hib aşısı pürifiye Hib kapsül polisakkaritlerini içeren PRP polisakkarit aşısıdır. PRP aşısının immünolojik özellikleri diğer polisakkarit aşılarda benzerlik göstermekte olup T hücrelerinden bağımsız immün yanıt oluştururlar (20). PRP polisakkarit aşıları 1985 yılında 18 aylıktan büyük çocuklar üzerinde lisans almıştır. Ancak Hib için geliştirilen bu birinci kuşak polisakkarit aşılarda 18 aylıktan küçük olan çocuklar için yeterince koruyucu bulunmamıştır ve bu aşılarda terk edilmiş, yerini saflaştırılmış PRP antijenlerini içeren ve 2. aydan itibaren uygulanabilen konjuge aşılara bırakmıştır. Konjuge aşılarda uygulanmaya başlaması ile

birlikte hem daha iyi immünite sağlanmış hem de Hib infeksiyonları açısından en büyük risk altında bulunan erken yaşlarda bağışıklık sağlanabilmiştir (13, 20).

Nazofarengeal kolonizasyon üzerine aşının etkinliğini gösteren çalışmalarda aşının Hib kolonizasyonunu oldukça azalttığı bildirilmiştir. Konjuge aşıların yaygın kullanıldığı bölgelerde beş yaşından küçük çocuklarda görülen invaziv infeksiyonlarda büyük oranda düşüş bildirilmiştir (12).

İlk konjuge lisanslı aşı PRP-D'dir. Bu aşı konjuge aşılar içerisinde en az immünojenik olanıdır. Diğer konjuge aşılar; PRP-T, HbOC ve PRP-OMPC'dir. Tablo 4'te lisans almış olan konjuge Hib aşıları gösterilmiştir.

Tablo 4. Lisans alan konjuge Hib aşıları (12, 20).

Aşı	Ticari isim	Taşıyıcı protein
PRP-T	ActHIB (Sanofi Pasteur)	Tetanoz toksoidi
PRP-OMPC	PedvaxHIB (Merck)	<i>N. meningitidis</i> dış membran proteini
HbOC	HibTTTER (Lederle, Praxis)	Mutant difteri toksin proteini
PRP-D	ProHIBIT (Connaught Lab.)	Difteri toksoidi

Konjuge aşılar difteri, tetanoz boğmaca, polio aşılarıyla aynı zamanda uygulanabilir. Hib aşılarının yoğun olarak uygulamaya geçmesi ile birlikte dünyada özellikle de gelişmekte olan ülkelerde çocuklarda Hib'e bağlı menenjit ve pnömonide önemli ölçüde azalma meydana gelmiştir. Kapsülsüz *H.influenzae* ile oluşan infeksiyonlardan korunmak için henüz bir aşı mevcut değildir (12, 13, 20).

2.3.10 ANTİMİKROBİYAL AJANLARA DUYARLILIK

2.3.10.1 Duyarlılık Testleri

H. influenzae'da antibiotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleri ile yapılmaktadır (34). Bu amaçla her ml'si için içerisine 15 µg hematin, 15 µg NAD ve 5 µg maya özeti katılarak hazırlanmış olan Haemophilus Test Medium (HTM) besiyeri kullanılmaktadır. Ayrıca *H. influenzae*'da antibiyotik duyarlılığını saptamak için FDA onaylı "Sensitre" mikrodilüsyon ve "E -test" yöntemleri ticari test yöntemleri olarak kullanılabilir (3, 34).

2.3.10.2 ANTİBİYOTİK DİRENÇ MEKANİZMALARI

H. influenzae invitro olarak ampisilin, sefalosporinler, kloramfenikol, tetrasiklin, aminoglikozidler, rifampisin, meropenem, siprofloksasin ve oral sulfonamidlere genellikle duyarlıdır. *H. influenzae*'da çeşitli antibiyotiklere dirence neden olan direnç genleri ve gen ürünleri tablo 5'de gösterilmiştir.

Tablo 5. *H. influenzae*'da direnç genleri ve gen ürünleri (2).

Genler	Gen Ürünleri
<i>bla_{TEM}</i>	TEM tip beta-laktamaz
<i>bla_{RO1}</i>	ROB-1 beta-laktamaz
<i>FtsI</i>	PBP38
<i>DacA</i>	PBP5
<i>DacB</i>	PBP4
<i>acrA/acrB</i>	AcrAB atık pompa
<i>AcrR</i>	AcrA (AcrAB için represor)
<i>tet(B)</i>	Tet(B) tetrasiklin atık protein
<i>tet(M), tet(K)</i>	Tet(M) ve Tet(K) ribosomal koruma proteinleri (sadece <i>H. influenzae</i> dışı <i>Haemophilus</i> türlerinde bulunur.)
<i>Cat</i>	Kloramfenikol asetiltransferaz

2.3.10.2.1 BETA-LAKTAM GRUBU ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇ

Beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç, bakteri hücre duvarının antibiyotiğe geçirgenliğinin azalması, beta-laktamaz üretimi, oluşturulan enzimin etki spektrumu ve üretim miktarı, efluks mekanizmalarının (aktif pompalama) varlığı ve antibiyotiğin hedefi olan penisilin bağlayıcı proteinler (PBP)'de meydana gelen değişiklikler sonucu oluşmaktadır. Diğer Gram negatif çomakların özellikle *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinin aksine *H. influenzae*'nin dışı membranı beta-laktam antibiyotiklerin hücre içine girişine çok az direnç göstermektedir, dolayısıyla hem duyarlı hem de dirençli suşlarda MİK değerleri diğer Gram negatif çomaklara göre daha düşüktür.

H. influenzae suşları ampisilin, amoksisilin-klavulanat duyarlılığı ve beta-laktamaz üretimine bağlı olarak dört grupta toplanır:

- Beta-laktamaz negatif ampisilin duyarlı (BLNAS),
- Beta-laktamaz pozitif ampisilin dirençli (BLPAR),
- Beta-laktamaz negatif ampisilin dirençli (BLNAR),
- Beta-laktamaz pozitif amoksisilin-klavulanat dirençli (BLPACR).

H. influenzae suşlarında ampisilin ve diğer beta-laktam antibiotiklere direnç genellikle plazmid kontrolündeki beta-laktamaz üretimi ile oluşmaktadır (BLPAR). Beta-laktamaz negatif ampisilin dirençli (BLNAR) suşlardaki direnç mekanizması ise PBP'lerdeki değişimlere (azalmış antibiyotik afinitesi) bağlıdır (35). Çok az suş ise her iki direnç mekanizmasına sahip olup bunlar beta-laktamaz pozitif amoksisilin-klavulanata dirençli (BLPACR) suşlar olarak adlandırılır. *H. influenzae*'da bir olgu haricinde hücre duvarı geçirgenliğinin azalmasına ve pompa atım sisteminin etkinliğinin artmasına bağlı direnç bildirilmemiştir (2, 36).

H. influenzae suşlarının beta-laktam antibiyotiklere duyarlılığı CLSI sınır değerleri (≤ 1 $\mu\text{g/ml}$ duyarlı, 2 $\mu\text{g/ml}$ orta duyarlı ve ≥ 4 $\mu\text{g/ml}$ dirençli) ile tanımlanan ampisilin duyarlılığı ile belirlenebilmektedir (34).

H. influenzae suşlarında beta-laktamaza bağlı ampisilin direnci ilk kez 1974'de bildirilmiştir. 1975 yılında ise enzimin TEM tipi olduğu tanımlanmıştır. 1981'de *H. influenzae*'da yeni bir beta-laktamaz enzimi tanımlamış ve daha sonra bu enzim ROB-1 olarak adlandırılmıştır (37). TEM-1 ve ROB-1 enzimleri plazmid aracılı A sınıfında yer alan serin beta-laktamazlardır; benzer substrat profillerine sahip olan her iki enzim de ampisilin direncine yol açar ve klavulanat gibi beta-laktamaz inhibitörleriyle inhibe edilirler (6, 8). İki beta-laktamaz tipinden birine sahip suşlarda ampisilin MİK değerleri çoğunlukla direnç sınır değerinin çok üstünde (MİK₉₀ ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$) bulunduğundan ve her iki enzimde de nitrosefin hidrolizi pozitif olduğundan klinik örneklerden izole edilen suşlarda beta-laktamaz aracılı ampisilin direnci genellikle kolay saptanır (2).

Plazmid aracılı TEM-1 ve TEM-2 beta-laktamazları Gram negatif bakteriler arasında özellikle de *Enterobacteriaceae* ailesinde yaygındır ve bu enzimler *bla*_{TEM} genlerinde kodlanırlar. *H. influenzae*'daki TEM beta-laktamazlarının çoğunluğunu TEM-1 tipinde beta-laktamazlar oluşturur (38, 39).

H. influenzae'da *bla*_{TEM} genlerini taşıyan birbirinden farklı iki plazmid grubu vardır. Küçük (< 10 kb) konjugatif olmayan plazmidler tek direnç geni olarak *bla*_{TEM} taşırlarken daha büyük

(yaklaşık 40 kb) konjugatif plazmidler *bla*_{TEM} geni yanında sıklıkla kloramfenikol, tetrasiklin veya kanamisin direnci gibi başka direnç genlerini de taşırlar (2). Büyük olan plazmidler daha yaygındır ve bu plazmitlerin *H. influenzae*'da *bla*_{TEM} genlerinin yayılmasında daha önemli oldukları düşünülmektedir (40). *H. influenzae* suşlarıyla yapılan ilk çalışmalarda ampisiline dirençli suşlardan plazmid DNA'sı izole edilememiştir. Ancak, ampisilin direnci konjugasyon yoluyla duyarlı olan alıcı suşlara aktarılabilmiş ve transkonjugatlardan plazmid DNA'sı kolayca elde edilebilmiştir (2, 41). *H. parainfluenzae*'da bulunan antibiyotik direnç genleri plazmidler aracılığıyla *H. influenzae*'ya aktarılabilmektedir (2, 42).

Yapılan bir çalışmada Güney Afrika'da izole edilen iki *H. parainfluenzae* suşunun TEM-15 tipi GSBL ürettiği ve sefotaksim MİK değerlerinin > 16 µg/ml olduğu bildirilmiş ve PFGE ile iki suşun aynı olduğunun belirlenmesi sonucunda GSBL geninin bir suştan diğerine aktarıldığı gösterilmiştir (2). Bu durum, *H. parainfluenzae*'dan ve *H. influenzae*'ya beta laktamaz genleri içeren plazmidlerin geçiş olasılığı açısından ve sonuçta *H. influenzae*'da GSBL oluşturan suşların etken olduğu infeksiyonların tedavisinde sefalosporinlerin kullanımı üzerinde önemli etkileri olacağından çok önemlidir.

H. influenzae suşlarında ROB-1 tipi beta-laktamaz ilk kez 1981 yılında Hib menenjitli bir hastadan izole edilmiştir. TEM-1 ve ROB-1 enzimlerini birlikte sentezleyen *H. influenzae* suşları çok nadir olarak bildirilmektedir (2). Bununla birlikte Tayland'dan iki enzimi birden sentezleyen 50 kadar *H. ducreyi* suşları bildirilmiştir (43). ROB-1 ilk tanımlandığında beta-laktamaz enziminin varlığı standart koşullarda uygulanan nitrosefin hidroliz testi ile gösterilememiştir. Çok yoğun inokülüm kullanılarak tekrarlanan nitrosefin deneyinde ise nitrosefin testinin pozitif olduğu saptanmıştır (44). TEM-1 üreten suşların aksine ROB-1 pozitif *H. influenzae* suşlarında nitrosefin deneyi yaklaşık % 13'ü oranında pozitif sonuç verir (2).

H. influenzae'da ROB-1 varlığı ile yüksek sefaklor MİK değerleri arasında belirgin bir ilişki bulunmaktadır. Kanada'da 324 beta-laktamaz pozitif suş ile yapılan bir çalışmada ROB-1 üreten suşların % 80'inin CLSI kriterlerine göre sefaklorlara dirençli olduğu, geri kalanının ise orta duyarlı olduğu ve sefaklorlara dirençli 39 suşun % 67'sinin ROB-1 pozitif olduğu belirtilmiştir (8).

H. influenzae suşlarının % 1'inde ise nitrosefin hidrolizi pozitifken bu suşlarda PCR ile TEM-1 ve ROB-1 geni saptanamamıştır (6).

H. influenzae'da ampisiline direnç mekanizmalarının bir diğeri de daha az rastlanan ve beta-laktamaz üretiminden bağımsız olarak kromozomdaki PBP3'ün kodlandığı *ftsI* genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkar. *ftsI* geninde meydana gelen mutasyonlar sonucunda PBP3'ün afinitesinde azalma meydana gelmektedir (2, 12).

İlk kez 1980 yılında bir endokardit ve menenjit olgusundan ampisiline dirençli ancak beta-laktamaz varlığı gösterilemeyen bir Hib suşu izole edilmiştir. Ampisilin direnç mekanizması olarak hedef bölgenin değişmiş olabileceği düşünülmüştür ve bu suşlar BLNAR (Beta-laktamaz negatif ampisilin dirençli) olarak tanımlanmıştır (45).

1984 yılında klinik örneklerden izole edilen ampisiline duyarlı bir *H. influenzae* suşu BLNAR fenotipine dönüştürülmüş (bir BLNAR Hib suşunun genomik DNA'sı kullanılarak) ve sonrasında hem donörde hem de transforme edilen alıcıda duyarlı *H. influenzae* suşuna kıyasla PBP3A ve PBP3B'de bağlama afinitesinin azaldığı gösterilmiştir. Böylece BLNAR fenotipinin ortaya çıkmasındaki mekanizmanın PBP3A ve PBP3B'deki meydana gelen değişimlerin olduğu gösterilmiştir (46).

BLNAR suşlarının tanımlanmasında zorluklar yaşanmaktadır. Beta-laktamaz negatif olan ve amoksisilin ve amoksisilin-klavulanat MİK değeri $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ (mikrodilüsyon yöntemi ile) olan suşlar BLNAR olarak tanımlanmaktadır (34). BLNAR suşlarının sefalosporinler başta olmak üzere diğer beta-laktam antibiyotiklere karşı da duyarlılıklarında azalma saptanmaktadır. Bazı araştırmacılar ampisilin direncinden daha çok sefaklor direncinin BLNAR suşları için daha iyi bir belirteç olduğunu öne sürmektedirler (47). Ayrıca BLNAR suşlarını taramak amacı ile sefuroksim direnci de (MİK $>4,0 \mu\text{g/ml}$) kullanılmaktadır (48).

CLSI, BLNAR suşlarının amoksisilin-klavulanik aside, ampisilin-sulbaktama, sefaklora, sefatemed, sefamandol, sefonisid, sefprozil, sefuroksim, piperasilin-tazobaktam ve lorakarbefe in vitro ortamda duyarlı bulunmasına rağmen, bu antibiyotiklere karşı da dirençli olarak kabul edilmelerini önermektedir (34).

İlk kez 1977 yılında hem beta-laktamaz enzim aktivitesi pozitif hem de PBP3 afinitesinde azalma mekanizması üzerinden direnç geliştiren suşlar bildirilmiştir. Bu direnç şekli çok az görülmektedir ve bu suşlar beta-laktamaz pozitif, amoksisilin- klavulanat dirençli (BLPACR) olarak adlandırılır. BLPACR suşları tanımlanırken beta-laktamaz enziminin pozitif ve amoksisilin-klavulanat MİK değerinin ise $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ olması gereklidir. Bu suşların klinik önemi henüz tam olarak bilinmemektedir (2, 49, 50).

H. influenzae suşlarında sefopodoksim, sefiksim gibi geniş spektrumlu oral sefalosporinlere ve sefotaksim gibi geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı direnç gelişimine nadir rastlanmaktadır. Daha dar spektrumlu olan 2. kuşak sefalosporinler (sefuroksim, lorakarbef, sefprozil, sefaklor, vb.) *H. influenzae* izolatlarına karşı daha az etkindir (2, 3).

2.3.10.2.2 TRİMETOPRİM-SULFAMETOKSAZOL DİRENCİ

Trimetoprim-sulfametoksazol [ko-trimoksazol (TMP-SMX)] tetrahidrofolat üretimini bloke edip, hücrel metabolizmayı ve replikasyonu engelleyerek antimikrobiyal etki gösterir. İnsanlarda gerekli folik asid, besinlerden alınmaktadır. Sulfametoksazol ve trimetoprime her ikisi de insanlarda folik asid sentezi olmadığından düşük miktarda toksisite ile bakteriyel metabolizmayı seçici bir şekilde inhibe eder. *H. influenzae*'da TMP-SMX'e karşı direnç gelişimine oldukça sık rastlanılmaktadır. Direnç gelişimi trimetoprime karşı oluşan afinite değişimi ve dihidrofolat redüktaz (DHFR) enziminin fazla miktarda sentez edilmesiyle sağlanır. Afinitede azalma sıklıkla plazmidler veya transpozonlarla taşınan DHFR'yi kodlayan genlerdeki değişim sonucu oluşur (2).

Ko-trimoksazole karşı *H. influenzae*'da görülen direnç bölgeden bölgeye farklılık göstermektedir. Beta-laktamlar, makrolidler ve ko-trimoksazole direnç solunum sistemi izolatlarında kan izolatlarından daha fazladır. Kapsülsüz suşlardaki direnç kapsüllü *H. influenzae*'dan daha fazladır. Rifampisin ve trimetoprim kombinasyonu (1:1) sinerjistik ve bakterisidal olup rifampisine dirençli suşlara karşı kullanılabilir (51, 52).

2.3.10.2.3 MAKROLİD, AZALİD VE KETOLİD DİRENCİ

Bu grupta yer alan antibiyotikler duyarlı olan bakterilerin 50 S alt ünitelerindeki peptidil-tRNA'nın bağlanma bölgesine geri dönüşümlü olarak bağlanarak yeni protein sentezini inhibe ederler. Direnç mekanizmaları arasında dışa-atım pompaları (intrinsik veya edinilmiş), ribozomal metilaz ve ribozomal proteinlerde ve RNA'daki değişimler yer almaktadır. Bu mekanizmalardan en önemlisi ribozomal metilasyondur. Ribozomal metilasyon *erm* ("eritromisin ribozomal metilaz") genleri tarafından kodlanır. Diğer önemli bir mekanizma olan atım pompaları ise *mef* genlerince kodlanır. Eritromisin çok etkili bir tedavi seçeneği olmamakla birlikte bazı yeni makrolidler eritromisinden daha aktiftir ve tedavide daha etkili olabilmektedir. *H. influenzae* ayrıca linkozamid, streptogramin B ve ketolidlere karşı intrinsek dirence sahiptir (2, 35).

2.3.10.2.4 KLORAMFENİKOL DİRENCİ

H. influenzae'da kloramfenikole karşı direnç ilk defa 1976'da bildirilmiştir. Kloramfenikole karşı oluşan direnç genellikle plasmid aracılı kloramfenikol asetil transferaz (CAT) tip II'nin üretimi ile bağlantılıdır. *cat* geni moleküler ağırlıkları 34×10^6 - 46×10^6 arasında değişen konjugatif plazmidler üzerinde taşınmaktadır ve bu plazmidler sıklıkla tetrasiklin ve ampisilin direncini kodlayan genleri de taşırlar. Bu konjugatif plazmidler ayrıca kromozoma integre olabilmektedirler (2, 3). *H. influenzae* tarafından üretilen CAT enzimi *Enterobacteriaceae* ailesi tarafından üretilen tip II CAT enzimlerine benzerdir. *H. influenzae*'da kloramfenikole karşı bir diğer direnç mekanizması da dış membran protein kaybına bağlı geçirgenliğin değişmesi sonucu oluşmaktadır (11, 54, 55).

2.3.10.2.5 KİNOLON DİRENCİ

Kinolonlar geniş spektrumlu aktiviteye sahip antimikrobiyal ajanlardır. DNA sentezini engelleyip bakteri üremesini inhibe ederek etki gösterirler. Replikasyon sürecinde önemli iki enzim olan DNA giraz (topoizomeraz II) ve topoizomeraz IV kinolonların hedefini oluşturur. Bu iki enzim iki alt birimden (DNA giraz *gyrA*, *gyrB*, topoizomeraz IV ise *parC*, *parB*) oluşmaktadır. *H. influenzae* suşları arasında kinolonlara direnç nadir olarak görülür. *H. influenzae*'da kinolonlara karşı gelişen yüksek düzeyde direnç oluşumundaki en önemli mekanizma *gyrA* ve *parC* genlerinin bir ya da ikisinde meydana gelen bir veya daha fazla nokta mutasyonlardır. Tek bir gende meydana gelen tek bir mutasyon azalmış duyarlılıkla sonuçlanırken, birden fazla nokta mutasyon bulunan suşlarda MİK değerinin arttığı bildirilmektedir (56, 57, 58, 59). *H. influenzae*'da kinolonların öncelikli hedefi *gyrA* subünitidir. Yeni kinolonlar *H. influenzae*'ye karşı daha güçlü etki gösterirler ve klinik suşlar arasında direnç prevalansı düşüktür (2).

2.3.10.2.6 TETRASİKLİN DİRENCİ

Tetrasiklinler mikroorganizmalarda protein sentezini inhibe ederek etki gösterirler. Bakteriyel ribozomların 30S alt ünitelerine geri dönüşümlü olarak bağlanarak RNA-ribozom kompleksindeki ribozomal akseptör A bölgesine aminoasit-tRNA'nın bağlanmasını önleyip antimikrobiyal etki gösterirler. *H. influenzae*'da ilk tetrasiklin direnci 1975 yılında bildirilmiştir. *H. influenzae*'da (ve *H. parainfluenzae*'da) tetrasiklin direnci genellikle konjugatif plazmidlerde bulunan *tet* geni tarafından kodlanan atım pompası mekanizması ile oluşmaktadır. Ayrıca bu konjugatif plazmidler ampisilin-kloramfenikol-tetrasiklin-kanamisin

direnç genlerini birlikte taşıyabilirler. Bazı *H. influenzae* tip b suşlarının bu şekilde çoğul direnç genleri taşıdığı bildirilmiştir (60, 61, 62). *H. ducreyi* plazmid aracılı *tet* geni taşır ve bu geni *H. influenzae*'ya in vitro ortamda konjugasyon ile aktarılabilir; bu da *tet* ve muhtemelen diğer tetrasiklin direnç determinatlarının *H. influenzae*'ya aktarılabilirliğini göstermektedir (2, 62).

2.3.10.3 ÇOĞUL DİRENÇ

H. influenzae'da ampisilin ve kloramfenikole karşı direnci ilk olarak Bangkok'da 1979 yılında, bunu takiben de ABD ve İngiltere'de bildirilmiştir (63). 1980 yılında ise bir Hib suşunda ampisilin ve kloramfenikol direnci saptanmıştır. 1983-1987 yıllarını kapsayan prevalans çalışmasında ampisilin ve kloramfenikol dirençli suşların oranı % 5 olarak bildirilmiştir (61). Halen ampisilin ve kloramfenikol dirençli suşlar nadir olup tüm dünyada yaklaşık % 1-2 oranında görülmektedir (11).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya Mayıs 2009–Haziran 2011 tarihleri arasında İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi kliniklerinden, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden (kan, balgam, bronkoalveolar lavaj, boğaz vb.) izole edilen 235 *Haemophilus influenzae* suşu dahil edilmiştir.

3.1. Bakteriyolojik Tanı İçin Kullanılan Besiyerleri

3.1.1. Çikolatamsı Agar

Triptik kazein özütü	15 gr.
Soya pepton	5 gr.
Sodyum klorür	5 gr.
Agar	20 gr.
Distile su	1000 ml

Hazır dehidrate haldeki besiyerinden (Oxoid- İngiltere) 40 gr tartılıp 1000 ml distile suya ilave edilmiştir. 15 dakika 121 °C’de otoklavlandıktan sonra yaklaşık 70 °C’ye kadar soğutulup içerisine 50–100 ml defibrine koyun kanı ilave edilip steril petri kutularına dökülmüştür.

3.1.2. *Haemophilus* Test Besiyeri (HTM)

Mueller-Hinton agar	1000 ml
Maya ekstresi	5 gr
Hematin stok çözeltisi	30 ml
NAD stok çözeltisi	3 ml

Hematin stok çözeltisi: 50 mg hematin, 100 ml 0.01 mol/L NaOH içerisinde ısıtılıp toz içeriğin iyice erimesi sağlanmıştır.

NAD stok çözeltisi: 50 mg NAD 10 ml distile suda eritilip filtrasyon ile steril edildi.

Hazır dehidrate haldeki besiyerinden (Oxoid- İngiltere) 43 gr tartılıp 970 ml distile su içerisinde eritildikten sonra 30 ml hematin ilave edilip 121°C 'de 15 dakika steril edildi. 50 °C'ye soğutulup 3 ml nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) stok çözeltisi ilave edilip steril petri kutularına dökülmüştür.

3.1.3. At Kanlı Agar

Beyin kalp infüzyon agar (Difco)	50 gr
Distile su	1000 ml
At kanı	50 ml

Hazır dehidrate haldeki beyin kalp infüzyon agar besiyerinden (Oxoid-İngiltere) 50 gr tartılıp 1000 ml distile suya ilave edilmiştir. Otoklavda 121 °C'de 1 atm.'de 15 dakika steril edilmiştir. Besiyeri 50 °C'ye soğutulduktan sonra % 5 oranında at kanı ilave edilip petri kutularına dağıtılmıştır.

3.1.4. Triptik soy agar (TSA)

Triptik kazein özütü	15 gr
Soya pepton	5 gr
Sodyum klorür	5 gr
Agar	20 gr
Distile su	1000 mL

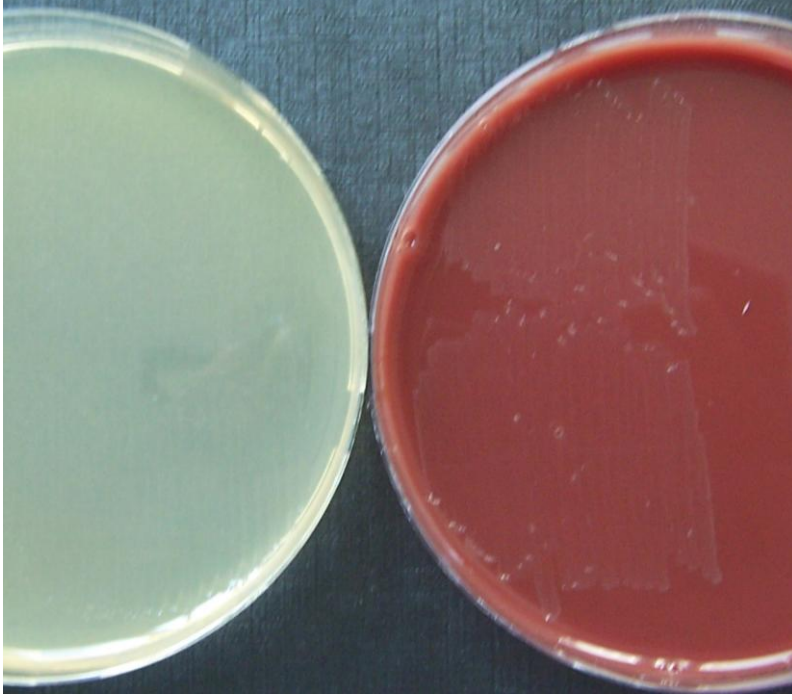
Hazır dehidrate haldeki besiyerinden (Oxoid- İngiltere) 40 gr tartılmış, 1000 ml distile suya ilave edilmiştir. 121 °C de 1 atm.'de 15 dakika steril edilmiştir. Hazırlanan besiyeri 50°C'ye soğumaya bırakılmış ve derinliği en az 5 mm olacak şekilde petri kutularına dağıtılmıştır.

3.2. Bakteri identifikasyonu

Suşlar Gram morfolojisi, X ve V faktörlerine olan gereksinimleri, katalaz ve oksidaz reaksiyonları kullanılarak idendifiye edilmiştir.

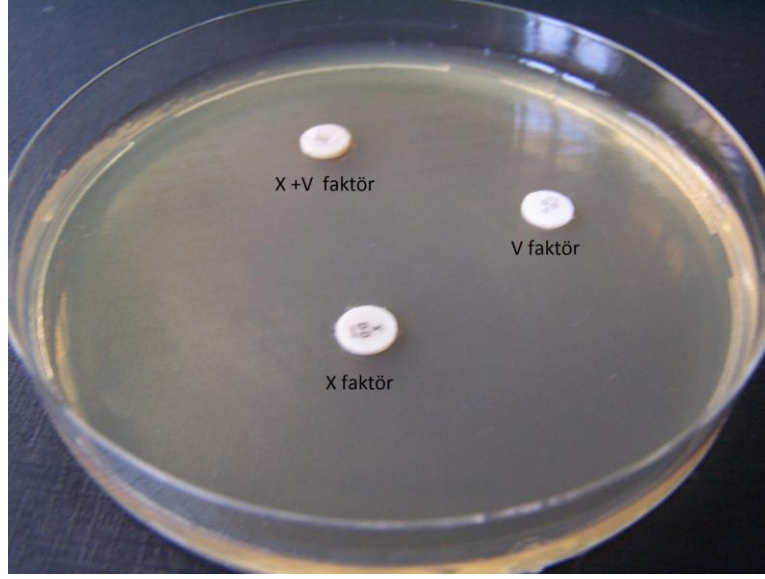
Laboratuvarımıza gönderilen çeşitli klinik örnekler çikolatamsı agara ekim yapılmış aerop koşullarda 35–37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Bu besiyerinde üreyen küçük ve su

damlasına benzeyen sperma kokulu kolonilerden *Haemophilus* kuşkusıyla preparasyon hazırlanmış ve Gram yöntemi ile boyanmıştır. Gram negatif kokobasiller halinde görülen kolonilerden saf kültür alınmış ve daha sonra TSA ve çikolatamsı agar besiyerlerine ekim yapılmıştır (Resim 1).



Resim 1. Bir *H. influenzae* suşunun TSA ve Çikolatamsı besiyerlerindeki kültürleri.

24 saat inkübasyondan sonra oksidazı ve katalazı pozitif olan ve sadece çikolatamsı agarda üreyen kolonilerden TSA besiyerine ekim yapıp ticari olarak sağlanan X, V ve XV faktörü içeren diskler (Oxoid- İngiltere) kullanılarak bakterinin bu faktörlere olan gereksinimi araştırılmıştır (Resim 2). Kontrol suşu olarak *H. influenzae* ATCC 49247 ve ATCC 49766 kullanılmıştır.



Resim 2. *Haemophilus* cinsi suşların X ve/veya V faktör gereksinimlerinin araştırılması.

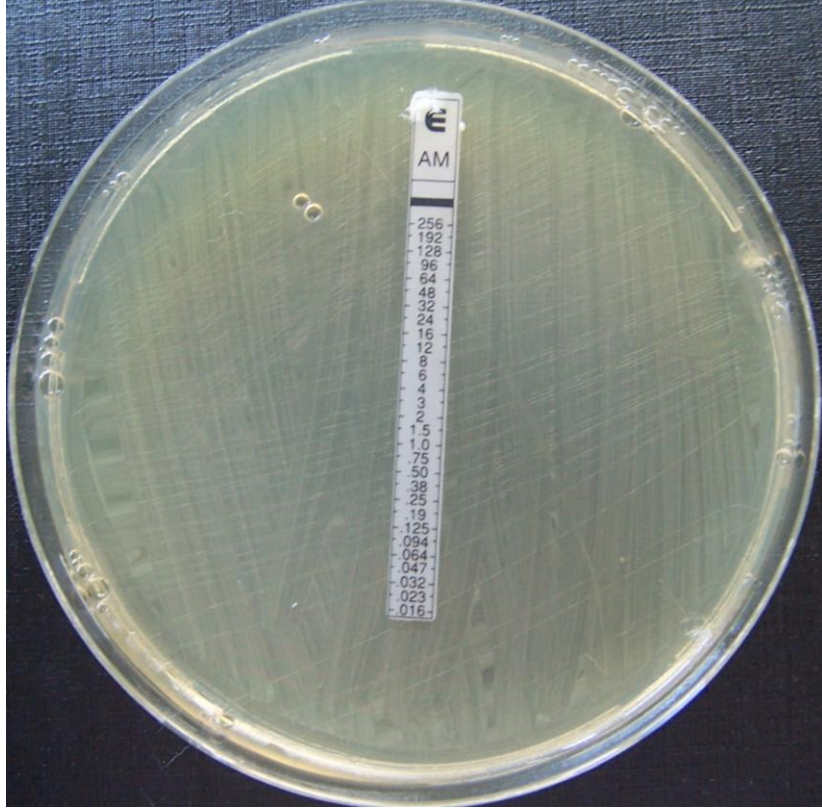
37°C’de aerop koşullarda 24 saat inkübe edildikten sonra üreme değerlendirilmiştir. Ayrıca bu suşların hemoliz oluşumunu değerlendirmek amacıyla at kanlı agara da ekim yapılmıştır.

Üremek için hem X hem de V faktörüne gereksinim duyan ve at kanlı agarda hemoliz oluşturmayan suşlar *H.influenzae* olarak değerlendirilmiştir.

3.3. Antibiyotik duyarlılığının saptanması

H.influenzae olarak tanımlanmış suşların antibiyotik duyarlılıkları CLSI’nın önerileri doğrultusunda *Haemophilus* test besiyeri’nde disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır (34). Duyarlılık deneyinde ampisilin (10 µg), amoksisilin-klavulanik asit (20/10 µg), ampisilin-sulbaktam (20/10 µg), seftriakson (30 µg), sefuroksim (30 µg), sefaklor (30 µg), meropenem (10 µg), aztreonam (15 µg), azitromisin (15 µg), klaritromisin (15 µg), telitromisin (15 µg), tetrasiklin (30 µg), siprofloksasin (5 µg), trimetoprim-sulfametoksazol (1.25/23.75 µg), kloramfenikol (30 µg), nalidiksik asit (30 µg), levofloksasin (5 µg), fosfomisin (30 µg) diskleri (Oxoid, İngiltere) kullanılmıştır.

Ayrıca ampisiline dirençli olan suşların MİK değerleri E-test yöntemiyle araştırılmıştır (AB Biodisk, İsveç) (Resim 3) (34, 35).



Resim 3: Ampisiline dirençli olan bir suşta yapılmış E-test.

3.4. Beta-laktamaz varlığının araştırılması

Suşlarda beta-laktamaz üretimi nitrosefin (Oxoid, İngiltere) diski ile araştırılmıştır. Kromojenik bir substrat olan nitrosefinin renginin bir dakika içinde sarıdan kırmızıya dönüşmesi beta-laktamaz aktivitesinin varlığını göstermiştir.

3.5. Ampisilin dirençli suşlarda TEM tipi beta-laktamaz varlığının PCR yöntemi ile araştırılması:

3.5.1. Kullanılan çözeltiler

3.5.1.1. 10X Tris-Borik asit-EDTA (TBE) tampon çözeltisi

Tris base (Sigma)	108 gr
Borik asit	55 gr
0,5 M EDTA (pH: 8,0)	40 ml

3.5.1.2. Etidyum Bromür

Etidyum bromür (Sigma, Almanya) 10 mg/ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Manyetik karıştırıcı yardımıyla distile su içerisinde çözülmüş ve oda ısısında ışıktan korunarak saklanmıştır.

3.5.1.3. % 1'lik Agaroz Jel

Kullanılacak jel kasetinin büyüklüğüne göre tartılan agaroz 1xTBE tampon içerisinde kaynatılarak çözüldürülmüştür. 200 ml olarak hazırlanan jel, sıcaklığı 50-55 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 10-15 dakika bekletildikten sonra içerisine 10 mg/ml konsantrasyondaki etidyum bromürden 20 µl ilave edilmiştir. Jel, kenarları kapatılmış kaset üzerine dökülmüş ve cepleri oluşturacak tarak yerleştirilerek donması beklenmiştir. Jel donduktan sonra tarak dikkatlice çıkarılmış ve jel kaseti elektroforez tankına yerleştirilmiştir.

3.5.1.4. dNTP Karışımı

Her biri 100 mM konsantrasyonunda olan dATP, dCTP, dTTP ve dGTP (Fermentas, İngiltere) hazır nükleotid çözeltileri kullanılmıştır. Her bir nükleotidden 25 µl alınarak üzerine 900 µl distile su ilave edilerek son konsantrasyonun 10 mM olması sağlanmıştır.

3.5.1.5. Primerler

Ticari olarak satın alınan ve liyofilize halde bulunan primerler (tablo 6) protokolüne uygun olarak sulandırılıp 50 pmol/µl konsantrasyon elde edilmiş ve uygun miktarlarda kullanılmıştır (61).

Tablo 6. Çalışmada kullanılan primerler (64).

Hedef Gen	Kullanılan primerler	Hedef ürün
TEM-1	5'ACCAGTCACAGAAAAGCATC3' 5'TTATCCGCCTCCATCCAGTC3'	327 bp
ROB-1	5'GCGCCTGTGCAACAATCA3' 5'CAAATTCGCCAAAGTCTGTTGA3'	338 bp

3.5.2. DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu ticari bir DNA izolasyon kiti [High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche, Almanya)] ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapılmıştır.

- 1) Bir gecelik saf kültürde üreyen bakteriler 200 µl PBS içeren 1,5 ml mikrosantrifüj tüpünde 4 Mc Farland bulanıklığında süspanse edilmiştir.
- 2) 3000 devirde 5 dakika santrifüj edildikten sonra üst sıvı atılarak çökeltiye 5 µl lizozim eklenmiş, 37°C'de 15 dakika inkübe edilmiştir.
- 3) İnkübasyon sonunda 200 µl bağlama tamponu (binding buffer) ve 40 µl proteinaz K eklenip 10 dakika 70°C'de inkübe edilmiştir.
- 4) İnkübasyondan sonra 100 µl izopropanol eklenerek karıştırılmıştır.
- 5) Boş bir toplayıcı tüpünün üstüne filtreli tüp konularak karışımın tümü filtreli tüpe aktarılmış, 1 dakika 8000 devirde santrifüjde çevrilmiştir.
- 6) Santrifüjden sonra alttaki toplama tüpü atılıp yenisi konularak üstteki filtreli kısma 500 µl inhibitör uzaklaştırıcı solüsyon (inhibitör removal buffer) konmuş ve 8000 devirde 1 dakika santrifüjde çevrilmiştir.
- 7) Santrifüjden sonra toplama tüpü tekrar yenilenmiş, filtreli tüpe 500 µl yıkama tamponu (washing buffer) konarak 8000 devirde 1 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem iki defa tekrarlanmıştır.
- 8) Toplama tüpü tekrar yenilenerek üstteki filtreli tüpe 200 µl 70°C'de önceden ısıtılmış elüsyon solüsyonu (elution buffer) konularak son kez 8000 devirde 1 dakika santrifüjde çevrilmiştir.
- 9) Santrifüjden sonra ependorf tüplerde biriken sıvı DNA amplifikasyonunda hedef DNA olarak kullanılmak üzere – 20 °C'de saklanmıştır.

3.5.3. DNA Amplifikasyonu

Toplam karışımı 48 µl olan PCR karışımına 2 µl daha önceden ekstrakte edilmiş DNA örneği eklenmiştir. Reaksiyon karışımı aşağıda belirtilen şekilde oluşturulmuştur.

Distile su	32,6 µl
Tampon 10x	5 µl
dNTP mix 10 mM	3 µl

MgSO ₄ 20 mM	4 µl
Primer 50 µM	3 µl
Taq DNA polimeraz (5U/µl)	0,4 µl
DNA ekstraktı	2 µl

3.5.4. Amplifikasyon Programı

98 °C'de 2 dakika, 95 °C'de 30 saniye - 30 döngü (denatürasyon)

55 °C'de 30 saniye - 1 döngü (bağlanma)

72 °C'de 3 dakika - 1 döngü (ayrışma)

olarak ayarlanmıştır (61).

3.5.5. Elektroforez

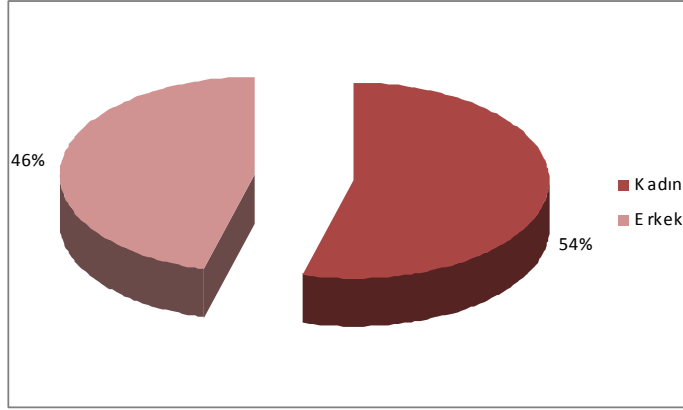
10 µl amplifikasyon ürünü yaklaşık 2 µl yükleme tamponu içerisine karıştırılmış ve 1xTBE tamponu içerisinde, etidyum bromür ile boyanarak % 1,5'lik agaroz jel içerisinde 90 V'da bir saat yürütülmüştür. Elektroforez işlemi sonrasında jel, transilluminatör üzerine alınarak UV ışığı (304 nm) altında görüntülenmiştir. PCR ürününün büyüklüğü 100 bp DNA Ladder (6 µl/Load) (Biomatix, ABD).

4. BULGULAR

Bu çalışmaya Mayıs 2009 – Haziran 2011 tarihleri arasında İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi kliniklerinden, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 235 *Haemophilus influenzae* suşu dahil edilmiştir.

İncelenen 231 hastanın 108 (% 47)'i erkek, 123 (% 53)'ü kadın olarak saptanırken, hasta grubunun yaş dağılımı 1 ila 88 yaş arasında değişmektedir. Klinik örneklerin alındığı hastaların hastaların cinsiyete göre dağılımı tablo 7'de, yaşa göre dağılımı ise tablo 8'de gösterilmiştir.

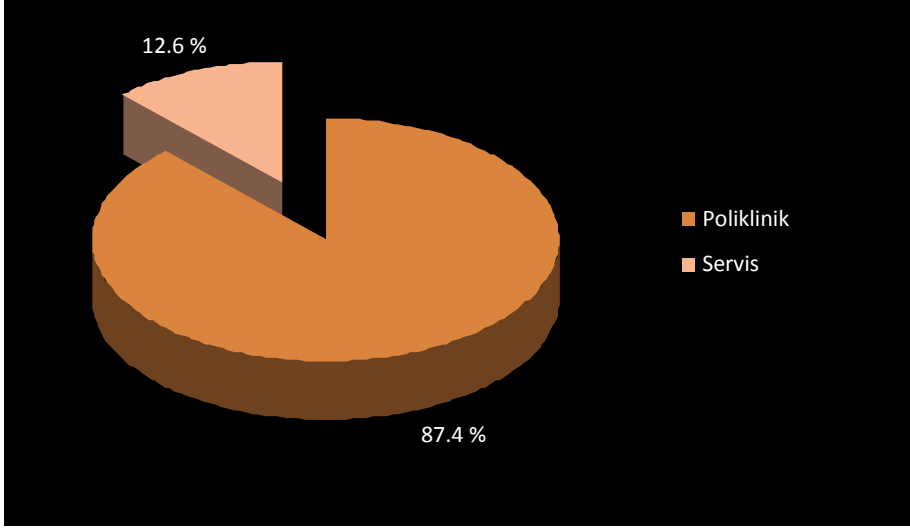
Tablo 7. Örneklerin alındığı hastaların cinsiyete göre dağılımı (%).



Tablo 8. Örneklerin alındığı hastaların yaşa göre dağılımı (%).

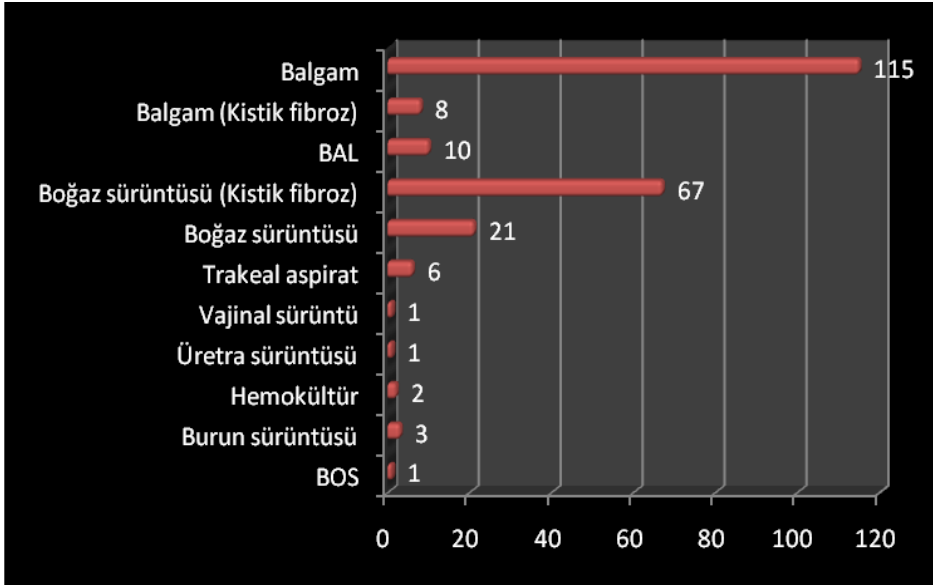
YAŞ	n (%)
0 - 2	48 (20.4)
>5 - 10	40 (17)
>10 - 20	59 (25.1)
>20 - 40	25 (10.6)
>40	63 (26.8)

Poliklinikte takip edilen hasta sayısı 202 (% 87.4), yatan hasta sayısı ise 29 (% 12.6) olarak belirlenmiştir (Tablo 9). İncelenen örneklerden 76 (% 32.3)'ü sığın kistik fibroz tanısı ile takip edilmekte olan hasta grubuna ait olduğu saptanmıştır.

Tablo 9. Yatan hasta ve poliklinik hasta oranı (%).

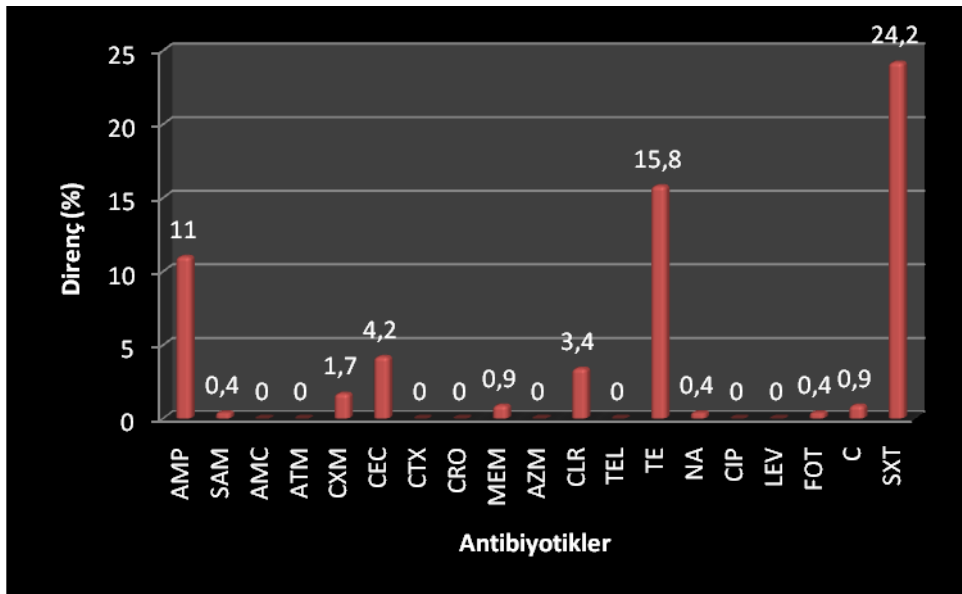
Örneklerin dağılımı, 123 balgam (% 52.3), 88 (% 37.4) boğaz sürüntüsü, 10 (% 4.2) bronkoalveolar lavaj sıvısı, 6 (% 2.5), trakeal aspirat, 3 (% 1.2), burun sürüntüsü olmak üzere toplam 230 solunum yolu izolatu; ayrıca 2 (% 0.8) kan, 1 (% 0.4) vajinal sürüntü, 1 (% 0.4) üretral akıntı ve 1 beyin omurilik sıvısı (% 0.4) olarak belirlenmiştir.

İncelenen balgam örneklerinin 8 (% 3.4)'inin, boğaz sürüntü örneklerinin 67 (% 28.5)'sinin kistik fibrozlu hastalara ait olduğu belirlenmiştir (Tablo 10).

Tablo 10. *H. influenzae* suşlarının izole edildiği örneklerin sayısal dağılımı (n).

Test edilen suşların antibiyotiklere direnç durumları incelendiğinde amoksisilin-klavulanik asit, seftriakson, sefotaksim, aztreonam, azitromisin, telitromisin, siprofloksasin, levofloksasine dirençli suş saptanmamıştır. Trimetoprim-sulfametoksazole 57 (% 24.2), tetrasikline 36 (% 15.2), ampisiline 26 (% 11), sefaklor 10 (% 4.2), klaritromisine 8 (% 3.4), sefuroksime 4 (% 1.7), meropenem 2 (% 0.8), kloramfenikole 2 (% 0.8) ampisilin-sulbaktama 1(% 0.4), nalidiksik aside 1 (% 0.4), fosfomisine 1 (% 0.4) dirençli suş saptanmıştır (Tablo 11-12).

Tablo 11. *H. influenzae* suşlarının çeşitli antibiyotiklere direnç oranları (%).



AMP: Ampisilin, SAM: Ampisilin-sulbaktam, AMC: Amoksisilin-klavulanik asit, ATM: Aztreonam CXM: Sefuroksim, CEC: Sefaklor, CTX: Sefotaksim CRO: Seftriakson, MEM: Meropenem, AZM: Azitromisin, CLR: Klaritromisin, TEL: Telitromisin, TE: Tetrasiklin, NA: Nalidiksik asit, CIP: Siprofloksasin, LEV: Levofloksasin, FOT: Fosfomisin, C: Kloramfenikol, SXT: Trimetoprim-sulfametoksazol.

Tablo 12. İzole edilen *H. influenzae* suşlarının 19 farklı antibiyotiğe direnç oranları (%).

	AMP	SAM	AMC	CEC	CXM	CRO	CTX	SXT	AZM	CLR
	n (%)									
Duyarlı	209 (88.9)	234 (99.6)	235 (100)	225 (95.7)	231(98.2)	235 (100)	235 (100)	178 (75.8)	235 (100)	227 (96.6)
Orta duyarlı	1 (0,4)	0 (0)	0 (0)	5 (2.1)	1 (0.4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0
Dirençli	25 (10.6)	1 (0,4)	0 (0)	5 (2.1)	3 (1.3)	0 (0)	0 (0)	57 (24.2)	0 (0)	8 (3.4)
Toplam direnç	26 (11)	1 (0,4)	0 (0)	10 (4.2)	4 (1.7)	0 (0)	0 (0)	57 (24.2)	0 (0)	8 (3.4)

	TEL	MEM	C	CIP	NA	LEV	FOS	ATM	TET
	n (%)								
Duyarlı	235 (100)	233 (99.1)	233 (99.1)	235 (100)	234 (99.6)	235(100)	234 (99.6)	235(100)	199 (84.6)
Orta duyarlı	0 (0)	0 (0)	2 (0.9)	0 (0)	0(0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	25 (10.6)
Dirençli	0 (0)	2 (0.9)	0 (0)	0 (0)	1 (0.4)	0 (0)	1 (0.4)	0 (0)	11 (4.7)
Toplam direnç	0 (0)	2 (0.9)	2 (0.9)	0 (0)	1 (0.4)	0 (0)	1 (0.4)	0 (0)	36 (15.3)

Sefuroksime disk difüzyon yöntemi ile dirençli bulunan üç suşun E-test yöntemi ile yapılan MİK değerleri dirençlilik sınırları içerisinde ve sırası ile 24 µg/ml, 48 µg/ml, >256 µg/ml olarak bulunmuştur. Meropeneme dirençli bulunan iki suşun ise MİK değeri >256 µg/ml (dirençli) olarak belirlenmiştir. Disk difüzyon yöntemi ile kloramfenikole orta duyarlı saptanan her iki suşun da MİK değeri 6 µg/ml (orta duyarlı) olarak saptanmıştır. Orta duyarlı olan suşlar dirençli olarak kabul edilmiştir. İzole edilen *H. influenzae* suşlarının 19 farklı antibiyotiğe direnci tablo 11’de gösterilmiştir.

İzole edilen suşların 36 (% 15.3)’sında çoğul direnç saptanmıştır. Bu suşlardan 20 (% 8.5)’sinde iki, dokuzunda (% 3.8) üç, beşinde (% 2.1) dört, birer suşda da (% 0.4) beş ve altı antibiyotiğe karşı direnç saptanmıştır (tablo 12).

Tablo 13. *Haemophilus influenzae* suşlarında çoğul direnç (%).

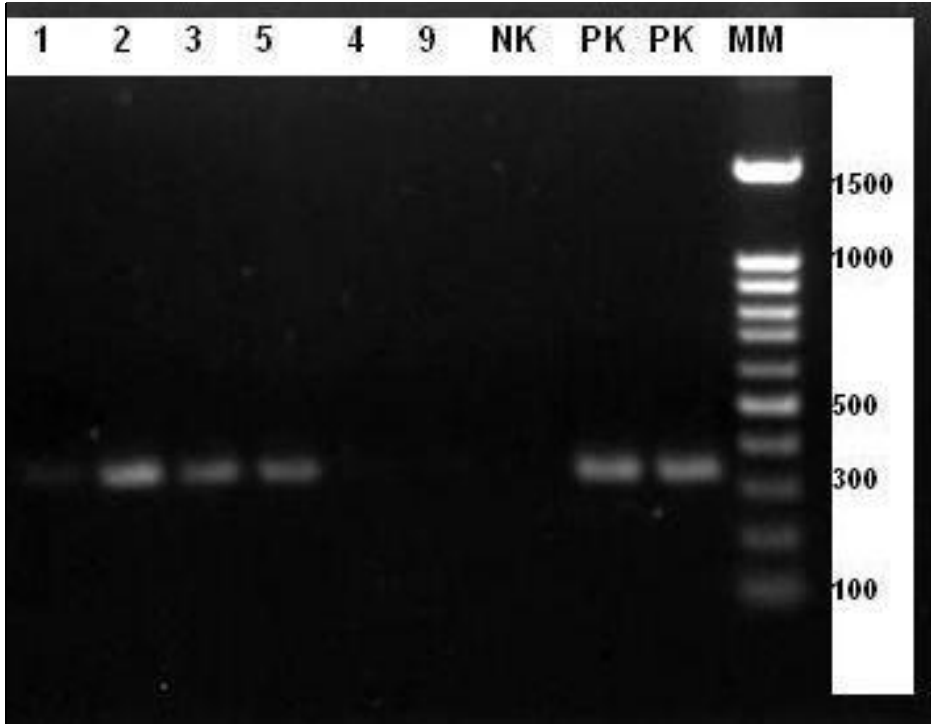
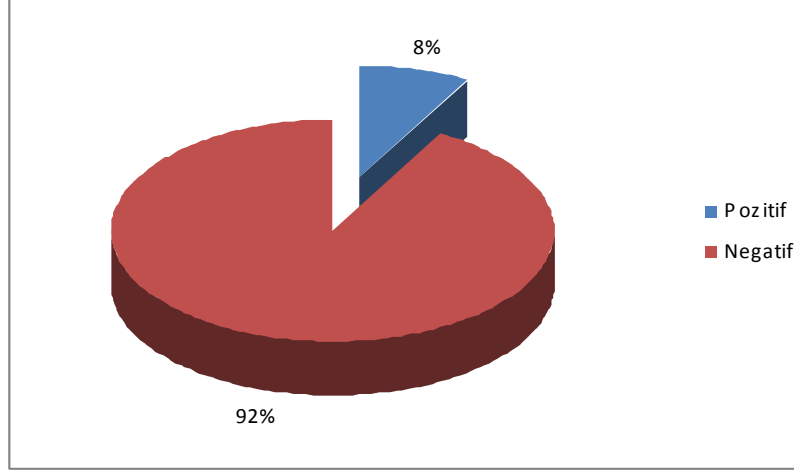
	ANTİBİYOTİKLER	Sayı (n)
1	AMP/ CEC	2
2	AMP/SXT	5
3	AMP/TET	1
4	AMP/CLR	2
5	CEC/TET	1
6	SXT/CLR	1
7	SXT/MEM	1
8	SXT, TET	7
9	AMP/CEC/TET	1
10	AMP/SXT/SAM	1
11	AMP/SXT/CLR	2
12	AMP/SXT/TET	5
13	AMP/SXT/CEC/TET	2
14	AMP/SXT/C/TET	1
15	AMP/SXT/CEC/FOS	1
16	AMP/SXT/TE/CXM	1
17	AMP/SXT/CLR/NA/TET	1
18	AMP/SXT/CEC/MEM/TET/CXM	1

AMP: Ampisilin, SAM: Ampisilin-sulbaktam, CXM: Sefuroksim, CEC: Sefaklor, MEM: Meropenem, CL: Klaritromisin, TET:Tetrasiklin SXT: Trimetoprim-sulfametoksazol, C: Kloramfenikol, NA: Nalidiksik asit, FOS:Fosfomisin.

Tüm izolatlarda beta-laktamaz pozitifliği % 8 olarak saptanmıştır. Nitrosefin diski ile ampisiline dirençli bulunan 26 suşun 19 (% 73)’u beta-laktamaz pozitif, yedi (% 27)’si beta-laktamaz negatif olarak belirlenmiştir.

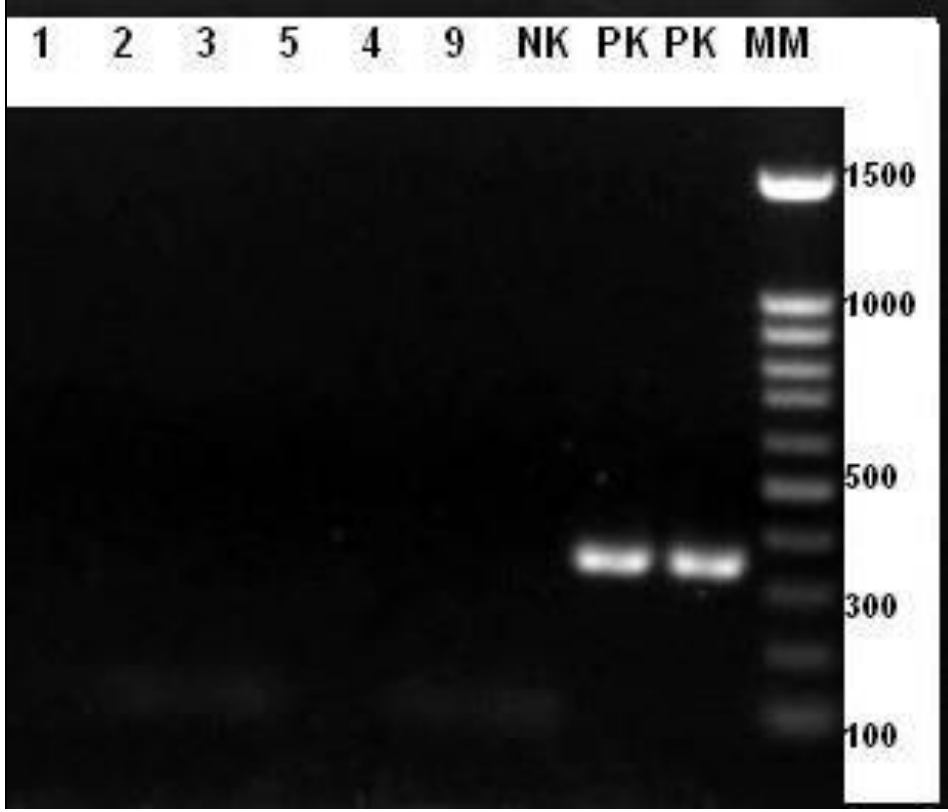
Ampisiline dirençli şuşların PCR analizi yapıldığında beta-laktamaz pozitif bulunan 19 şuşda TEM-1 (% 100) enzimi pozitif bulunmuş (Resim 4), ROB-1 (% 0) pozitif şuşa rastlanmamıştır (Resim 5).

Tablo 14. *H. influenzae* şuşlarının beta-laktamaz üretimine göre dağılımı (%).



Resim 4: 1, 2, 3, 5: TEM-1 pozitif; 4,9: TEM-1 negatif şuşlar. NK: Negatif kontrol

PK: Pozitif kontrol, MM: Moleküler Marker.



Resim 5: 1, 2, 3, 5, 4, 9: ROB-1 negatif suşlar. NK: Negatif kontrol, PK: Pozitif kontrol
MM: Marker.

Beta-laktamaz negatif olup ampisiline dirençli bulunan yedi (% 26.9) suşda ise TEM-1 ve ROB-1 enzimi saptanmamış ve bu suşlar BLNAR (% 2.9) olarak kabul edilmiştir. *H. influenzae* suşlarının beta-laktamaz üretimi, ampisilin ve amoksisilin-klavulanik asit duyarlılığına göre gruplandırılması tablo14 ve 15’de gösterilmiştir.

Tablo 15. 235 *H. influenzae* suşunun beta-laktamaz üretimi ve ampisilin/amoksisilin klavulanik asit duyarlılığına göre gruplandırılması.

Grup	Suş sayısı n (%)	Beta-laktamaz enzimi
BLNAS ^a	209 (88.9)	-
BLPAR ^b	19 (8)	TEM
BLNAR ^c	7 (2.9)	-
BLPACR ^d	0 (0)	-

a: Beta-laktamaz negatif ampisilin duyarlı, *b:* Beta-laktamaz pozitif ampisilin dirençli, *c:* Beta-laktamaz negatif ampisilin dirençli, *c:* Beta-laktamaz pozitif amoksisilin-klavulanik asit dirençli.

İzole edilen ampisiline dirençli *H. influenzae* suşlarının disk difüzyon yöntemi ile elde edilen zon çapları, E-test yöntemi ile saptanan MİK değerleri ve PCR sonuçları Tablo 16'da gösterilmiştir.

Tablo 16. Ampisiline dirençli *H. influenzae* suşlarının ampisilin için MİK değerleri ve TEM-1/ ROB-1 enzimlerinin varlığı.

No	Zon capı	Du/Di/O	MİK µg/ml	BETA- LAKTAMAZ	TEM	ROB
1	6	Di	>256	+	+	-
2	8	Di	>256	+	+	-
3	12	D	96	+	+	-
4	12	D	64	-	-	-
5	6	D	>256	+	+	-
6	6	D	>256	+	+	-
7	6	D	96	+	+	-
8	6	D	>256	+	+	-
9	6	D	>256	-	-	-
10	6	D	>256	-	-	-
11	12	D	6	+	+	-
12	6	D	>256	+	+	-
13	6	D	>256	+	+	-
14	6	D	>256	-	-	-
15	6	D	>256	+	+	-
16	6	D	>256	+	+	-
17	6	D	>256	-	-	-
18	6	D	>256	+	+	-
19	10	D	>256	-	-	-
20	6	D	>256	+	+	-
21	6	D	>256	+	+	-
22	6	D	>256	+	+	-
23	6	D	>256	+	+	-
24	12	D	96	+	+	-
25	19	O	6	-	-	-
26	6	D	>256	+	+	-

5. TARTIŞMA

H. influenzae tüm dünyada çocukluk çağında pnömoni, epiglottit, menenjit, bakteriyemi, yetişkinlerde ise toplum kökenli pnömoni, akut otitis media, KOAH alevlenmeleri gibi morbidite ve mortalitesi yüksek olan infeksiyonlara neden olan bir bakteridir. *H. influenzae*'nin neden olduğu invaziv infeksiyonlarda antibiyotik tedavisi önemli rol oynamaktadır (4). Bu infeksiyonların ampirik antibiyotik tedavisinde yakın zamana kadar ampisilin veya amoksisilin sıklıkla kullanılmıştır (65). Ancak son yıllarda *H. influenzae* suşlarında özellikle beta-laktamlar başta olmak üzere antimikrobiyallere direnç oranlarında artış görülmektedir (66-67). *H. influenzae*'da ampisilin direnci ilk kez 1974 yılında bildirilmiş ve daha sonraki yıllarda bu direnç coğrafik farklılıklar göstermekle birlikte artarak devam etmiştir (68).

Avrupa, Asya, Avustralya, Ortadoğu ve Kuzey Amerika bölgelerinde 1999-2000 yıllarında 13 merkezden izole edilen 2712 *H. influenzae* suşunun incelendiği bir çalışmada genel olarak ampisilin direnci % 20.1, beta-laktamaz üretimi % 19.3 olarak bildirilmiştir. Beta-laktamaz pozitifliği coğrafik bölgeler arası oldukça değişken bir dağılım göstererek Çin'de ve Çek Cumhuriyetinde % 2.6, Kore'de % 61.4, ve Slovak Cumhuriyeti'de % 26.2 olarak bildirilmiştir (51).

Ampisilin direncindeki en önemli mekanizma bakterinin plazmid aracılı TEM-1 ya da ROB-1 beta-laktamaz üretmesidir (4). Her iki enzim de beta-laktamaz inhibitörleri ile inhibe olur ve sefalosporinlere karşı etkinlikleri bulunmaz. Ampisilin direncindeki diğer bir mekanizma ise PBP'lerde meydana gelen mutasyonlar sonucu ortaya çıkar. Bu suşlar beta-laktamaz negatif ampisilin dirençli (BLNAR) suşlar olarak adlandırılmaktadır. Bazı *H. influenzae* suşlarında her iki direnç mekanizması da birlikte görülmektedir. Bu suşlar daha nadir görülmekte ve beta-laktamaz pozitif amoksisilin-klavulanat dirençli (BLPACR) suşlar olarak adlandırılmaktadır (2). BLNAR suşlarının prevalansı tüm dünyada düşük olsa da olasılıkla sınır değer tanımlamasında ve uygulama tekniğinde fikir birliğinin olmaması ve bazı laboratuvarlarda beta-laktamaz testi haricinde duyarlılık testlerinin yapılmaması gibi farklılıklar nedeniyle gerçekte olduğundan daha az oranda saptanıyor olabileceği düşünülmektedir (2).

1999-2000 yıllarında 25 ülkeden 69 merkezin katıldığı PROTEKT (Prospective Resistant Organism Tracking and Epidemiology for the Ketolide Telithromycin)

çalışmasında 2948 izolat incelenmiş ve ampisilin direnci ortalama olarak % 17.1, beta-laktamaz pozitifliği % 16.6 (en yüksek % 64.7 ile Güney Kore, en düşük % 1.8 ile İtalya) oranında saptanmıştır. BLNAR suşlarının oranı ise % 0.07 olarak belirlenmiştir (69). 2001-2002 yılları arasında toplam 242 merkezin katıldığı 3296 suşun dahil edildiği bir diğer PROTEKT çalışmasında ise ampisilin direnci ve beta-laktamaz oranı önceki PROTEKT çalışması sonuçlarına göre daha yüksek olarak sırasıyla % 27.8 ve %27.5 olarak saptanmıştır. Çalışmada BLNAR oranı % 0.4, BLPACR % 0.2, olarak bildirilmiştir (70). 1998-2000 yıllarını kapsayan Alexander projesinde toplam 8523 izolat incelenmiş; bu suşların % 16.9'unda beta-laktamaz pozitif olarak saptanırken (en düşük % 4.2 ile Rusya en yüksek % 29.6 olarak Amerika), amoksisilin direnci % 17.4 oranında bulunmuştur. Bu çalışmada 12'si Japonya'dan izole edilen toplam 21 BLNAR suşu saptanmıştır (68). 2007 yılında Japonya'da yapılan farklı bir çalışmada beta-laktamaz pozitifliği % 5.4 iken BLNAR suşları oldukça yüksek olarak % 20.6 oranında saptanmıştır. Buna ek olarak suşların % 14 kadarı da beta-laktamaz negatif ve ampisiline orta duyarlı bulunmuştur (71).

M. Cerquetti ve ark. (4) yaptıkları çalışmada ampisilin direnç oranının yıllar içinde arttığını ve bu oranın 1998/1999'da % 6.9'dan 2002/2003'de neredeyse üç kat artış göstererek % 19'a çıktığını göstermişlerdir. Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalar incelendiğinde de ülkelere ve bölgelere göre farklılık göstermek üzere direnç oranlarında artış dikkat çekmektedir. Almanya, Fransa, Avusturya, İspanya, İrlanda, Polonya, Portekiz, İtalya ve Hollanda'nın dahil edildiği çok merkezli surveyans çalışmasında 2004-2005 yılları arasında solunum yolu örneklerinden izole edilen 578 *H. influenzae* suşunda ampisilin direnci % 16.4 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada beta-laktamaz pozitifliği en yüksek Fransa'da (% 17.6) saptanmıştır. En yüksek BLNAR oranı ise ise Japonya'dakinden daha yüksek olarak İspanya'dan izole edilen suşlarda (% 33.9) belirlenmiş, Hollanda ve Fransa'da BLNAR suşlarına rastlanmamıştır (67).

Avrupa'da yapılan bir çalışmada genel olarak ampisilin direnci %16.8, beta-laktamaz pozitifliği en yüksek oranda % 38.2 ile Portekiz, % 29.1 ile Fransa, % 21.2 ile İngiltere'de; en yüksek BLNAR prevalansı % 20 ile Polonya en düşük % 2 ile Almanya'da saptanmıştır (72). Tayland'da solunum yolu infeksiyonlarından izole edilen *H.influenzae* suşlarında beş yıllık antimikrobiyal direnç prevalansının incelendiği bir araştırmada suşlardaki ampisilin direnci % 48, beta-laktamaz üretimi ise % 48.5 gibi oldukça yüksek bir oranda saptanmıştır (65).

Solunum yolu florasyndan izole edilen *H.influenzae* suşlarında da ampisilin direnci dikkat çekicidir. 2006 yılında Hindistan’da yapılan bir çalışmada ise sağlıklı olan 2400 okul çağı çocuğundan nazofarengeal sürüntü örneği alınmış ve bunların % 40’den fazlasında *H.influenzae* suşu izole edilmiştir. İzole edilen suşların % 23 kadarının ampisiline dirençli olduğu ve dirençli olanların % 86 kadarının beta-laktamaz ürettiği bildirilmiştir (73).

Çalışmamızda incelenen 235 *H. influenzae* suşunun 26 (% 11)’sının ampisiline dirençli olduğu ve dirençli suşların 19 (% 73)’unun ise beta-laktamaz oluşturduğu saptanmıştır. Ampisiline dirençli suşların yedisinde (% 27) ise beta-laktamaz pozitifliğine rastlanmamıştır. Çalışmamızda elde edilen beta-laktamaz pozitifliği ve ampisilin dirençli suşların oranları dünyada çeşitli ülkelerde son beş yılda yapılan çalışmaların sonuçları ile karşılaştırıldığında saptadığımız oranlar Tayvan, Kore-Güney Kore, Kanada, Fransa, İngiltere, İrlanda, İsrail, ABD ve Hindistan gibi bir çok ülkeye göre daha düşük, Portekiz, İsveç, İsviçre, Çek Cumhuriyeti gibi Avrupa ülkeleri ile Brezilya ve Kolombiya gibi ülkelerle uyumlu bulunmuştur (6,67,72-74). Japonya’da ise dünyadaki birçok ülkenin ve sonuçlarımızın aksine ampisilin direnci ile kıyaslandığında beta-laktamaz oranlarının oldukça düşük olduğu görülmektedir (71).

Hem beta-laktamaz üreten hemde PBP3’deki mutasyonlar sonucunda ampisiline direnç gösteren suşların (BLPACR) dağılımları da ülkeler arasında oldukça farklılık göstermektedir. Yapılan çalışmalarda Amerika’da % 0.1 (75), Fransa’da % 14 (76), İngiltere ve İrlanda’da ortak yapılan ve 7371 suşun incelendiği bir çalışmada % 7.6 (77), 2003 yılında 8523 suşun incelendiği Avrupa, Amerika, Uzak Doğu, Orta Doğu ve Afrika ülkelerinin katıldığı Alexander projesinde % 0.07, Japonya’da 2004 ve 2007 yıllarında yapılan çalışmalarda % 11-18.3 (71,78), Kore’de % 5.2 (79) oranlarında bildirilmiştir. İspanyada BLPACR suşlarının prevalansın azaldığını gösteren bir çalışmada ise BLPACR suşlarının oranı 1997 yılında % 13.6 iken 2007 yılında % 2.8 olarak saptanmıştır. Bu çalışmada ise beta-laktamaz oluşturan ve aynı zamanda amoksisilin-klavulanik aside dirençli bir suşa raslanmamıştır.

Ampisiline karşı dirençli suşların PCR analizinde beta-laktamaz üreten izolatların tamamında (% 100) TEM-1 enzimi saptanmış olup ROB-1 (% 0) pozitif suşa rastlanmamıştır. Ampisiline dirençli yedi (% 26,9) suşda ise TEM-1 ve ROB-1 saptanmamış ve bu suşlar BLNAR olarak kabul edilmiştir. İncelenen tüm suşlar ele alındığında TEM-1 beta-laktamaz pozitifliği % 8, BLNAR oranı ise % 2,9 olarak saptanmıştır.

Dünyada (Japonya dışında) beta-laktamaz oluşturmada ampiciline dirençli (BLNAR) suşlar çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara benzer şekilde düşük orandadır. Japonya'da ise bunun tam aksine bir durum söz konusu olup ampiciline dirençli suşların büyük kısmını BLNAR suşları oluşturmaktadır (71,78).

Ülkemizde *H.influenzae* suşlarının antibiyotiklere direncini araştıran çalışmalar incelendiğinde de merkezler arasında farklılıklar olduğu görülmektedir. Berkiten'in (7) Türkiye'de *H. influenzae*'nin beta-laktamaz pozitifliği ve antibiyotiklere direnç durumunu ortaya koyduğu kapsamlı derlemesinde geçmiş yıllarda da (1987-2002) ülkemizde hem ampicilin direnci hem de beta-laktamaz pozitifliği açısından merkezler arası, hatta aynı merkezde farklı dönemlerde yapılan çalışmalar arasında bile farklılıklar olduğu belirtilmiştir. Bu farklılıklar hastaların yaşına, örneklerin ve/veya uygulanan yöntemlerin farklılığına ya da çalışmalarda incelenen suş sayısına bağlı olabilir.

2000'li yıllardan günümüze kadar yapılan çeşitli çalışmalarda da durum pek farklı olmamakla birlikte ampicilin direnci ve beta-laktamaz pozitifliğinin genel olarak % 3-21 arasında olduğu söylenebilir (Tablo 17).

1996-1997 yıllarına ait çok merkezli bir çalışmada incelenen 272 *H.influenzae* suşunda genel olarak ampicilin direnci % 8.8, beta-laktamaz pozitifliği % 7 oranında bildirilmiştir (80).

Budak ve Gür (81) tarafından yapılan bir araştırmada 2000-2002 yılları arasında Ankara'da çeşitli klinik örneklerden izole edilen 127 *H.influenzae* suşunun antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile incelendiğinde ampicilin direnci ve beta-laktamaz pozitifliği % 5.6 olarak bulunmuştur.

Şener ve ark. nın (82) 2004-2005 yıllarında yaptıkları çok merkezli bir surveyans çalışmasında 379 *H.influenzae* suşu incelenmiş bunların % 4.7'sinde ampicilin direnci, % 5.5 oranında beta-laktamaz pozitifliği saptanmıştır. Direncin şehirlere göre dağılımı incelendiğinde Trabzon'da % 16, Ankara'da % 10, % İstanbul'da % 8.6, İzmir'de % 5.8, Antalya'da % 4.5 oranında olduğu görülmektedir. Beta-laktamaz üreten suşların prevalansı ise % 0 ile % 14 arasında değişmekte olup şehirlere göre dağılımı incelendiğinde; Trabzon'da % 14, İstanbul'da % 6.2, Antalya'da % 4.5, Ankara'da % 3.9 beta-laktamaz pozitifliği olduğu görülmektedir.

Altun ve Gür'ün (10)Ankara'dan yaptıkları çalışmada 2002-2007 yılları arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 861 *H.influenzae* suşu incelenmiş. Bu çalışmada ampisilin direnci % 7.2, beta-laktamaz pozitifliği % 6.1 olarak saptanmıştır. Beta-laktamaz üretmesine karşın ampisilin direnci saptanmayan % 1.2, beta-laktamaz negatif ampisilin dirençli (BLNAR) suş ise % 1.6 oranında bulunmuştur. Yine Özkul ve ark. ile Uncu ve ark. sırası ile ampisilin direncini ve beta-laktamaz pozitifliğini % 5.9 ve % 3.2 oranında saptamışlardır (9,83).

Manisa'da Gazi ve ark.nın (84) 6-14 yaş grubu sağlıklı okul çocuklarında taşıyıcılığı araştırdıkları çalışmalarında ampisilin direnci %20.9, beta-laktamaz pozitifliği % 19.7 olarak bildirilmiştir. Mamal ve ark. nın (85) 2009'da İstanbul'da yaptıkları benzer bir çalışmada ise 6-10 yaş arasında 330 çocuk nazofarengeal taşıyıcılık ve antibiyotik dirençleri açısından incelendiğinde ampisilin direnci ve beta-laktamaz pozitifliği % 12.9 oranında saptanmıştır.

Gönüllü ve ark. nın (86) 2004-2006 yıllarında yaptıkları bir çalışmada 140 *H. influenzae* suşu incelenmiş, ampisilin direnci % 6.4, beta-laktamaz pozitifliği % 5.7 olarak bulunmuştur.

İlki ve ark. (87) 2003-2006 yılları arasında Marmara Üniversitesi Hastanesi Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarına gelen klinik örneklerden izole ettikleri 548 *H.influenzae* suşuna ait antibiyotik direnç oranları incelenmişler ve ampisilin direncini % 3.3 oranında saptamışlardır. Bu çalışmada ampisiline dirençli olan tüm suşların beta-laktamaz ürettiği bildirilmiştir (Tablo 17).

Çalışmamızda elde edilen ampisilin direnci ülkemizde 2000'li yıllardan günümüze kadar klinik izolatlarla yapılan araştırmalarla kıyaslandığında oranlar diğer çalışmaların biraz üzerinde gibi görülmekte (Tablo 17) 1994-1995 yılları arasında Anabilim dalımızda yapılan iki ayrı çalışmanın sonuçları (ampisilin direnci % 12-12.5, beta-laktamaz pozitifliği %12.5-13) ile uyumlu bulunmuştur (88,89). Bununla birlikte saptadığımız ampisilin direnci ve beta-laktamaz pozitifliği oranları ülkemizde sağlıklı taşıyıcı çocuklardan izole edilen suşlardaki direnç oranlarına (% 12.9-%20.9) göre daha düşük kalmaktadır (84,85).

Tablo 17. Türkiye’de *H. influenzae* izolatlarında ampisilin direnci ve beta-laktamaz üretimi oranları (%).

Yer, Yıl ^a	Ampisilin direnci	Beta-laktamaz üretimi	Kaynaklar
Çok merkezli, 1996-1997	8.8	7	(80).
İstanbul, 1999	3	3	(90).
Ankara, 2000-2002	5.6	5.6	(81).
Manisa, 2002-2003	20.9 ^b	20.9 ^b	(84).
İstanbul, 2003-2004	7.3 ^b	6.8 ^b	(91).
İzmir, 2003-2006	5.9	5.9	(9).
Ankara, 2002-2007	7.2	6.1	(12).
Çok merkezli, 2004-2005	9.2	5.5	(82).
Ankara, 2005-2006	3.2	3.2	(83).
İstanbul, 2004-2006	6.43	5.7	(86).
İstanbul, 2003-2006	3.3	3.3	(87).
İstanbul, 2009 ^c	12.9 ^b	12.9 ^b	(85).
Bu çalışma	11	8	

^a: Çalışmaya dahil edilen suşların izole edildiği yıl, ^b: Nazopharengeal taşıyıcılık. ^c: Çalışmanın yayınlandığı tarih

Ülkemizdeki yapılan çalışmalarda BLNAR oranları incelendiğinde 1996-1997 yıllarına ait çok merkezli bir çalışmada incelenen 272 *H.influenzae* suşunda % 3.3 (80), Şener ve ark. nın (82) yaptıkları çalışmada % 0.5, Gazi ve ark. % 1.2 (84), Gönüllü ve ark. % 2.87 (86) BLNAR pozitifliği bildirmişlerdir. Budak ve Gür (81) tarafından yapılan bir araştırmada ise BLNAR suşu saptanmamıştır (Tablo 18). Yukarıdaki çalışmaların aksine moleküler yöntemlerin kullanıldığı çalışmamızda bu oran % 2.9 olarak belirlenmiş olup ülke genelinde BLNAR pozitifliğinin moleküler analizinin yapıldığı çalışmalara gereksinim olduğu açıktır.

Tablo 18. Türkiye’de *H. influenzae* izolatlarında BLNAR oranları (%).

Yer,Yıl ^a	BLNAR	Kaynaklar
Çok merkezli, 1996-1997	3.3	(80).
İstanbul, 1999	0	(90).
Ankara, 2000-2002	0	(81).
Manisa, 2002-2003	1.2 ^b	(84).
İstanbul, 2003-2004	0 ^b	(91).
İzmir, 2003-2006	0	(9).
Ankara, 2002-2007	1.6	(12).
Çok merkezli,2004-2005	0.5	(82).
Ankara, 2005-2006	0	(83).
İstanbul, 2004-2006	2.8	(86).
İstanbul, 2003-2006	0	(87).
İstanbul, 2009 ^c	0 ^b	(85).
Bu çalışma	2.9	

^a: Çalışmaya dahil edilen suşların izole edildiği yıl, ^b: Nazopharengeal taşıyıcılık. ^c: Çalışmanın yayınlandığı tarih.

Bazı çalışmalarda beta-laktamaz oluşturma oranının ampisilin veya amoksisilin direnç oranından daha yüksek olduğu bildirilmiştir. 1997-1999 yıllarını kapsayan ve dünyanın farklı bölgelerinden (Kuzey ve Latin Amerika, Avrupa, Kanada, Asya-Pasifik) 81 merkezin katıldığı bir surveyans çalışmasında (SENTRY) 6242 *H. influenzae* suşu incelenmiştir. Bu suşlardaki amoksisilin direnci ve beta-laktamaz pozitifliği sırasıyla ABD’de % 31.5 ve % 33, Kanada’da % 27 ve % 27, Asya Pasifik bölgesinde % 16.2 ve % 18, Latin Amerika’da % 12.5 ve % 15 ve Avrupa’da % 11.8 ve % 18 oranlarında bildirilmiştir (66).

Beta-laktamaz oluşturan ve ampisiline direnç saptanmayan bu tip suşların varlığı ülkemizde yapılan bazı çalışmalarda da görülmektedir. 2004-2005 yıllarında yapılan çok merkezli bir çalışmada Şener ve ark.(82) suşların % 5.5’nin beta-laktamaz oluşturduğunu ancak % 4.7’sinin ampisiline dirençli olduğunu kaydetmişlerdir. Ancak araştırmacılar buna bir açıklama getirmemişlerdir.

Benzer şekilde ABD’de 406 beta-laktamaz pozitif suşun biri ampisiline duyarlı (MİK: 0.5 µgr/ml) bulunmuştur. Beta-laktamaz varlığı nitrosefin hidrolizi ile gösterilen bu suşun beta-laktamaz enzimleri araştırılmamıştır (75). Bazı araştırmacılar böyle bir durumun olasılıkla daha önce tanımlanmamış bir beta-laktamaz enziminin varlığına veya düşük aktivite

gösteren ya da düşük düzeyde eksprese olan TEM-1 ya da ROB-1 enzimlerinin bir varyantına bağlı olabileceğini ileri sürmüşlerdir (2).

Beta-laktamaz oluşturmada ampiciline dirençli (BLNAR) *H. influenzae* suşlarının oranı dünyanın bir çok bölgesinde olduğu gibi ülkemizde de genel olarak düşük düzeyde (% 0-3.3) bulunmuştur (Tablo 18).

Çalışmamızda incelenen tüm suşların % 2.9'u BLNAR suşu olarak saptanmıştır. Ampiciline dirençli suşlar içerisinde bu oran % 26.9'dur. Çalışmamız sonuçlarının aksine ülkemizde son on yıllık dönemde hiç BLNAR suşu saptanmayan birçok çalışma mevcuttur (9,81,83,85,87,90,91).

Saptadığımız % 2.9'luk BLNAR oranı genel olarak Türkiye'de saptanan oranların üst sınırına yakın olup 2004-2006 yıllarında İstanbul'da yapılan çalışma ile benzer bulunmuştur (86).

Türkiye'de yapılan çalışmalar incelendiğinde beta-laktamaz oluşturan ve aynı zamanda amoksisilin-klavulanik aside direnç gösteren (BLPACR) suşlarla ilgili bir veriye rastlanmamıştır. Çalışmamızda ise BLPACR suşu saptanmamıştır.

H. influenzae suşlarında beta-laktamaz enzimi ve üretilen enzim tiplerinin incelendiği çalışmalar da (TEM-1 ve ROB-1 enzimlerinin sıklığı) coğrafik bölgelere göre farklılar olduğunu göstermiştir.

TEM-1 ve ROB-1 enzimlerinin küresel dağılımının araştırıldığı PROTEKT çalışmasında toplum kökenli solunum yolu enfeksiyonu olan hastalardan izole edilen 14,870 *H.influenzae* suşu incelenmiştir. Suşların genel olarak % 15 oranında beta-laktamaz ürettiği belirlenen çalışmada bu oranın Fransa'da % 31.6, Güney Kore'de % 52.6 ve Tayvan'da % 67.9'a çıktığı görülmüştür. PCR ile yapılan gen analiz çalışmalarında ise TEM-1 tipi enzim prevalansı % 93.7 ve ROB-1 tipi enzim prevalansı ise % 4,6 olarak bulunmuştur. Beta-laktamaz pozitif suşlar arasında ROB-1 enziminin prevalansı coğrafik bölgelere göre önemli ölçüde değişmektedir. 38 ülkenin katıldığı bu çalışmada 21 ülkede ROB-1 enzime rastlanmazken en yüksek prevalans % 30 ile Meksika'da saptanmıştır. Diğerlerine göre oldukça yüksek oranda ROB-1 pozitifliği görülen diğer ülkeler; Kanada ve ABD'dir. Bir suşta ise hem TEM-1 hem de ROB-1 tipinde enzim saptanmıştır. Ayrıca bu çalışmada beta-

laktamaz oluşturmayan 40 izolat (23'ü Japonya'dan) ampisiline dirençli (BLNAR), 222 (176'sı Japonya'dan) izolat ise orta duyarlı bulunmuştur (6).

2004 yılında Fransa'da yapılan bir diğer çalışmada beta-laktamaz üreterek ampisiline dirençli suşların tamamında TEM-1 tipi beta-laktamaz bulunmuş, ROB-1 üreten suşa rastlanmamıştır (76).

ABD ve Japonya'da solunum yolu infeksiyonu ve akut orta kulak iltihabı olan hastalardan izole edilen suşların dahil edildiği bir çalışmada ampisiline dirençli suşların direnç mekanizmaları incelenmiştir. Çalışmada ABD ve Japonya'da sırasıyla TEM-1 % 48.1 ve % 6.8, ROB-1 % 18.5 ve % 0, BLNAR (ampisiline orta duyarlı suşlar dahil) % 24 ve % 88, BLPACR % 9.2 ve % 5.3 olarak saptanmıştır (78). Tunus'da kemik iliği trasplantasyon ünitesinde yatan 50 nütropenik hastadan izole edilen *H.influenzae* suşunun dahil edildiği bir çalışmada % 32 ampisilin direnci, % 20 beta-laktamaz üretimi saptanmıştır. Bu çalışmada ise ROB-1'e rastlanmamış olup, BLNAR oranı da % 4 olarak bulunmuştur (1).

James ve ark. (48) BLNAR suşlarının saptanmasında sefuroksim direncinin (MIK >4,0 µg/ml), Livermore ve ark. (47) ise sefaklor direncinin ampisilin direncine göre daha iyi bir belirteç olduğunu önermişlerdir. Çalışmamızda bunun aksine sefaklora dirençli 10 suşun sadece bir tanesinin BLNAR suşu olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızdaki beta-laktamaz üreten suşların PCR analizindeki sonuçlar Fransa ve İrlanda'dan yapılan çalışmalarla uyumlu olarak, suşların tamamında TEM-1 saptanmıştır. Japonya ve Meksika'dan bildirilen yüksek orandaki ROB-1 üreten suşların aksine çalışmamızda ROB-1 üreten suşa rastlanmamıştır.

Türkiye'de bugüne kadar *H. influenzae* suşlarında TEM-1 ve ROB-1 enzimlerinin araştırıldığı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamız bu anlamda ülkemizde yapılan ilk çalışmadır. Ancak Türkiye ile ilgili bir bulguya rastlayabildiğimiz tek kaynak 1993-2003 döneminde 38 ülkede izole edilen 14,870 suşun incelendiği bir çalışmadır (6). Türkiye'den 242 *H. influenzae* suşunun dâhil edildiği bu çalışmada Farrell ve arkadaşları tarafından % 5.4 beta-laktamaz pozitifliği bildirilmiş ve beta-laktamaz pozitif suşların tamamında TEM-1 enzimi saptandığı bildirilmiştir. Bu sonuçlar çalışmamızdaki suşların tamamında TEM-1 enzimi bulunması ve ROB-1 enzimine rastlanmaması ile benzerlik göstermekle birlikte çalışmamızda beta-laktamaz pozitifliği daha yüksek olarak % 11 oranında saptanmıştır.

Bazı ülkelerden bildirilen çalışmalarda beta-laktamaz üreten suşların prevalansının azaldığına dair veriler bulunmaktadır. ABD’de 2005 yılında yapılan çok merkezli retrospektif bir çalışmada 1994-1995 ve 2002 ve 2003 sonuçları karşılaştırıldığında sırasıyla beta-laktamaz pozitifliğinin % 36.4’ten % 26.2’ye, ampisilin direncinin % 36.6’dan % 26.3’e ve BLNAR suşları oranının da % 1.3’ten % 0.1’e düştüğü bildirilmiştir (92).

2008 yılında S.G. Cobos ve ark.nın (93) İspanya’dan bildirdikleri bir yayında yıllara göre beta-laktamaz pozitifliğinde % 15.5, amoksisilin direncinde % 8.4 oranlarında azalma BLNAR’da ise % 7.1’lik artış bildirmişlerdir. Yine aynı çalışmada yıllar içerisinde azitromisin direncinde % 21.2 oranında artış SXT direncinde % 11.4’lük azalma bildirilmiştir. Bu çalışmalarda benzerlerine göre ortaya çıkan bu farklı sonuçlar kullanılan farklı antibiyotik rejimlerine bağlı olabilir.

Dünyada yapılan çalışmalarda ikinci kuşak sefalosporinlerden sefaklore % 1.1-88.3, sefuroksime % 0-23, sefiksim % 0-0.1, sefnidire % 0-36,1, seprozile % 1-18, oranlarında; üçüncü kuşaklardan sefpodoksime % 0-1, sefotaksime % 0-1 oranlarında direnç saptanırken seftriakson direnci bildirilmemiştir (Tablo 19). Türkiye’de ise genel olarak sefaklor % 0-4, sefuroksim % 0-1.5, sefprozil % 0-3.7 olarak saptanmışken üçüncü kuşak sefalosporinlerden sefotaksim ve seftriakson direnci bildirilmemiştir (Tablo 20). Benzer şekilde çalışmamızda da üçüncü kuşak sefalosporin direnci saptanmamıştır. Sefaklore %4.2, sefuroksime % 1.7 oranında saptadığımız direnç oranları genel olarak Türkiye’deki sonuçlar ile uyumlu olup dünyada bazı ülkelere göre daha düşük bulunmuştur.

Tablo 19. Farklı ülkelerden izole edilen *H. influenzae* suşlarında sefalosporin direnci (%).

Yıl	Sayı	Ülke	CEC	CXM	CFM	CTX	CRO	CFR	CPD	CPR	Kaynak
2010	544	Kore	17	23		0					(79)
2010	2736	İspanya	2.2	0.7		0					(96)
2009	31	Tayvan	45	3							(94)
2009	143	ABD	16.8	0.7	0		0	0		6.8	(95)
2008	7371	İngiltere-İrlanda	88.3	17.2		0.3	11.1				(77)
2007	557	Japonya						36.1			(71)
2007	978	ABD		2.4				5.2			(74)
2005	986	ABD		0.4			0	0.6	0	4.5	(92)
2007	582	Tayland		3		1	0				(65)
2005	915	Hollanda	15.1	5	0						(72)
2004	3296	ABD		3.7		0				18.7	(70)
2002	1434	Çok mekez		0						8.6	(75)
2002	2948	Çok mekez	5.6	0.6	0			1	1	3.6	(69)
2001	2712	Çok mekez	6.1	1.3						8.3	(51)
2001	6242	Çok mekez									(66)
		ABD	9.4	0.6	0.1	0			0.1	10	
		Kanada	8.4	0.9	0	0			0	10	
		Latin Amerika	1.2	0	0	0			0	1.1	
		Avrupa	1.1	0	0	0.1			0	1	
		Asya pasifik	2.3	0.4	0	0			0.5	1.4	

CEC: Sefaklor, CXM: Sefuroksim, CFM: Sefiksım, CFR: Sefnidir, CPR: Sefprozil, CPD: Sefpodoksım, CTX: Sefotaksım, CRO: Seftriakson

Özellikle sefaklor direnci, son yıllarda (2005-2010) yapılan çalışmalarda İngiltere-İrlanda, Tayvan, Kore, ABD, Hollanda'da sırasıyla % 88.3, % 45, % 17, % 16.8, % 15.1 olarak sonuçlarımıza göre oldukça yüksek oranda saptanmıştır. Benzer şekilde Kore ve İngiltere-İrlanda'da saptanan sefuroksım direncinin çalışmamıza ve diğer birçok ülkenin sonuçlarına göre daha yüksek olduğu görülmektedir (Tablo 19). Ayrıca Japonya'da sefnidir direnci (% 36.1), ABD'de ise sefprozil direncinin (% 16.8-% 18.7) diğer ülkelere göre daha yüksek oranda saptandığı bildirilmektedir.

Tablo 20. Türkiyede *H. influenzae* suşlarının sefalosporinlere direnç oranları (%).

Araştırma•	Sefaklor	Sefuroksim	Sefprozil	Sefotaksim	Seftriakson	Kaynaklar
%						
Çok merkez, 1996-1997	3	-	-	0	-	(80).
İstanbul, 1999	2	0	-	-	0	(90).
Ankara, 2000-2002	0	0	0	0	-	(81).
İzmir, 2003-2006	-	0	-	0	-	(9).
İstanbul, 2003-2004 ^a	-	5	-	0	0	(91).
İstanbul, 2003-2006	0.7	-	-	0	-	(87).
Çok merkez, 2004-2005	4	-	3.2	-	-	(82).
Ankara, 2005-2006	0	0	-	0	0	(83).
İstanbul, 2004,2006	-	0	-	-	0	(86).
Ankara, 2002-2007	-	-	3.7	0	-	(10).
İstanbul, 2009* ^a	-	1.5	-	0	0	(85).
Bu çalışma	4.2	1.7	-	0	0	

•: Çalışmaya dahil edilen suşların izole edildiği yıl.*: Çalışmanın yayınlandığı yıl, ^a: Nazopharyngeal taşıyıcılık.

Dünyada *H. influenzae* suşlarında kloramfenikol direnci ABD’de % 0.6 (92) İtalya’da % 1.7 (4), Hindistan’da % 41.9 (73), Tayland’da % 25 (65), Kore’de % 8.1 olarak bildirilmektedir. Türkiye’de yapılan bazı çalışmalarda ise suşların % 0-% 6.4’nün kloramfenikole dirençli olduğu bildirilmektedir. Türkiye’de 2007’den sonra yapılan çalışmalarda kloramfenikol direncinde azalma görülmektedir (Tablo 21). Çalışmamızda kloramfenikol direnci % 0.8 saptanmıştır ve direnç oranı genel olarak Asya kıtasındaki ülkelerin oldukça gerisindedir. Çalışmamızdaki kloramfenikole karşı düşük direnç oranı göz önüne alındığında ülkemizdeki menenjit olgularının ampirik tedavisinde kloramfenikolün hâla değerini koruduğu söylenebilir.

Tablo 21: Türkiyede *H. influenzae* suşlarının tetrasiklin, makrolid, kloramfenikol, trimetoprim-sulfametoksazol ve kinolonlara direnç oranları (%).

Araştırma	Tetrasiklin	Makrolid	Kloramfenikol	Kotrimoksazol	Kinolon	Kaynak
%						
Çok merkez, 1996-1997	-	0 (AZM)	4.7	23.5	-	(80).
İstanbul, 1999	-	-	0	18	0	(90).
Çok merkez, 2000-2001	22	1,1 (AZM) 4,8 (CLR)	3.6	23.5	0,8 (OFX)	(82).
Ankara, 2000- 2002	7	7 (CLR)	4.7	25.9	-	(81).
Manisa, 2002- 2003	-	1,8 (AZM)	2.4	14.2	-	(84).
İzmir, 2003- 2006	-	-	-	31.8	-	(9).
İstanbul, 2003- 2004	2.9	0,5 (AZM)	-	28.6	0	(91).
Ankara, 2005- 2006	-	3,2 (AZM)	6.4	25.8	0	(83).
Ankara, 2002- 2007	1.1	3,7 (CLR)	-	23	0	(10).
İstanbul, 2004,2006	5	0 (AZM) 2,8 (CLR)	1.4	-	0	(86).
İstanbul, 2009*	-	0,5 (AZM)	-	28.6	0	(85).
İstanbul, 2010	-	0 (AZM)	2.2	25.5	-	(87).
Bu çalışmada	15.2	0 (AZM) 3.4 (CLR)	0.8	24.2	0.4 (NA) 0 (CIP) 0 (LEV)	

*: Çalışmanın yayınlandığı yıl, AZM: Azitromisin, CLR: Klaritromisin, OFX: Ofluksasin, NA: Nalidiksik asit, CIP: Siprofloksasin, LEV: Levofloksasin.

Karbapenemler hastane kaynaklı ve ciddi seyirli toplum kökenli pnömonilerin tedavisinde kullanılan en geniş spektrumlu antimikrobiyallerdendir. Japonya'da son yapılan bir araştırmada imipenem ve doripenem % 19.2, panipenem % 11.5, biapenem % 57.7 oranlarında direnç bildirilmişken meropenem karşı direnç saptanmamıştır (97). ABD'de meropenem % 0.3 (74), Tayland'da meropenem ve imipenem % 1 (65), İrlanda ve İngiltere'de ertapenem % 0.1 oranında direnç bildirilmiştir (77). Ancak çalışmamızda sadece iki suşta meropenem direncine rastlanmıştır. Disk difüzyon yöntemi ile dirençli bulunan suşların MİK'leri de oldukça yüksek olarak >256 µg/ml olarak saptanmıştır. Türkiye'den bildirilen çalışmalar incelendiğinde *H. influenzae* suşlarında karbapenem direncine rastlanmaması nedeni ile bu tür suşların ileri düzeyde araştırılmasının uygun olacağı düşünülmüştür (10,81,83,85,91).

Toplum kaynaklı solunum yolu infeksiyonlarının ampirik tedavisinde genellikle makrolidler ve beta-laktam gurubu antimikrobiyaller kullanılmaktadır. Dünya genelinde son yıllarda yapılan çalışmalarda makrolid direncine dair farklı sonuçlar bildirilmektedir. 2004 yılında 242 merkezin katıldığı ve 3296 suşun incelendiği bir çalışmada klaritromisine % 19.8, telitromisine % 3.7, azitromisine % 1.1 oranında direnç bildirilmiştir (70). 2007 yılında Japonya çocuk hastalarda solunum yolu infeksiyonlarından izole edilen 557 suş ile yapılan PROTEKT surveyans çalışmasında telitromisin direnci % 0.7 oranında bildirilirken azitromisin direnci saptanmamıştır (71). Bae S. ve ark.nın (79) 2010 yılında yaptıkları akut solunum yolu infeksiyonları surveyans çalışmasında (ARIS) klaritromisin direnci % 18.7, Haas W. ve ark.nın yaptıkları çalışmada % 0.5 (98), Tayvan'da klaritromisin direnci % 16 (94), 2007 yılında Critchley ve ark.nın (74) ABD'de altı farklı coğrafik bölgeyi kapsayan ve 978 suş ile yaptıkları surveyans araştırmasında telitromisin direnci % 0.7, azitromisin direnci % 1.3, İtalya'da azitromisin direnci % 6.8 (4) olarak bildirilmiştir. İspanya'da 2008 yılında Cobos ve ark.nın (93) yaptıkları çalışmada ise 1997 ve 2007 yıllarındaki direnç oranlarını karşılaştırmışlar ve klaritromisine 1997'de % 2.3 oranında dirençli suş bulunurken 2007'de bu oran % 0 olmuştur. Azitromisine 1997'de % 1.1, 2007'de ise % 0.9 oranında bir direnç bildirilmiştir. Yine 2010 yılında İspanya'da yapılan ve 2736 suşun incelendiği çalışmada da azitromisin ve klaritromisin direnci saptanmamıştır. Bu çalışmalara göre İspanya'da yıllar içerisinde makrolid direncinde azalma meydana gelmiştir (96). Türkiye'de makrolid direncine ilişkin sonuçlar incelendiğinde azitromisine % 0-3.2, klaritromisine % 2.8-7 direnç bildirilmiştir (Tablo 19). Çalışmamızda ise telitromisin ve azitromisin direnci saptanmazken

suşların % 3.4'ü klaritromisine dirençli bulunmuştur. Direnç oranlarımız Kore'deki verilerden oldukça düşük oranda iken İspanya ve ABD verileri ile uyumlu bulunmuştur.

H. influenzae'nin neden olduğu infeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotiklerden bir diğeri de tetrasiklin grubu antibiyotiklerdir. 2001 yılında yapılan çok merkezli bir çalışmada telitromisin direnci Amerika'da % 0.7, Kanada'da % 0.8, Latin Amerika'da % 1.5, Avrupa'da % 2.6, Asya'da % 2.6 olarak bildirilmiştir (67) , 2004 yılında yapılan PROTEKT çalışmasında tetrasiklin direnci % 0.7 olarak bildirmiştir (70). Morrissey ve ark.nın (77) 2008 yılında İngiltere ve İrlanda'dan 7371 suşla yaptıkları çalışmada % 2.1 olarak saptamışlardır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda direnç oranları % 1.1-8.6 iken Şener ve ark.nın (82) yaptıkları çok merkezli çalışmada % 22 gibi daha yüksek oranda saptanmıştır. Çalışmamızda ise % 15.3 oranında saptanan tetrasiklin direnci Şener ve ark.nın çalışmasına göre daha düşük olmakla birlikte, bu oran dünya verilerine ve Türkiyede'ki bir çok çalışma sonuçlarına göre daha yüksektir.

Florokinolonlar *H.influenzae*'nin neden olduğu solunum yolu infeksiyonlarının oral tedavisinde oldukça etkin olan antibiyotiklerdir. *H.influenzae*'ya karşı kinolon direnci ilk kez 1993 yılında bildirilmiş ve sonraki zamanlarda tüm dünyada çeşitli oranlarda bildirilmeye devam etmiştir (99).

Japonya'da genel olarak florokinolon direnç oranı % 2,6 olarak bildirilmiştir (100). Hong Kong'da levofloksasin için % 0.9 (57), ABD'de levofloksasin, gatifloksasin ve moksifloksasin için % 0.3 (70), İrlanda ve İngiltere'de siprofloksasin, moksifloksasin, levofloksasin için sırasıyla % 0.2, % 0.1 ve % 0 oranlarında direnç bildirilmiştir (77). 2001 yılındaki PPOTEKT çalışmasında moxifloksasin ve siprofloksasine direnç % 0.1 oranında saptanırken levofloksasine direnç bildirilmemiştir (66). Kore'de yapılan bir çalışmada da levofloksasin direnci saptanmamıştır (79). Ülkemizde ise Şener ve ark.nın (82) yaptıkları çalışmada *H. influenzae* suşlarında saptanan kinolon (ofloksasin) direnci ortalama olarak % 0.8'dir. Araştırmacılar İstanbul için % 1.2, İzmir için % 1.4 oranında kinolon direnci bildirirken Ankara, Antalya ve Trabzon'dan izole edilen suşlarda kinolon direncine raslanmamıştır. Şener ve ark.nın (82) ve çalışmamızın aksine ülkemizde son on yılda yapılan diğer birçok araştırmada ise kinolon direnci bildirilmemiştir. Çalışmamızda siprofloksasin ve levofloksasine direnç görülmemiş, saptanan % 0.4 oranındaki kinolon direnci nalidiksik aside

dirençli bir suş nedeniyledir. Bu oran ABD ve birçok Avrupa ülkesi verileri ile uyumlu olarak görülmektedir.

H.influenzae suşlarında trimetoprim-sulfametoksazol direnci oldukça yaygın görülmektedir (2). Direncin prevalansı ülkeler arasında önemli oranda farklılık göstermektedir. Belçika'da % 8.5 oranında bildirilen trimetoprim-sulfametoksazol direnci Kenya'da % 55.2'dir (68).

Dünya genelinde yapılan bir çalışmada trimetoprim-sulfametoksazol direnci ABD'de % 14.6, Kanada'da % 18.6, Latin Amerika'da % 30.8, Avrupa'da % 17.8, Asya'da % 13.9 olarak bildirilmiştir (66). 2001 yılında 13 ülkenin katıldığı çalışmada trimetoprim-sulfametoksazol direnci Kıbrıs'da % 66,7, Çin'de % 53,2, Pakistan'da % 52.9, Meksika'da % 46.6, Portekiz'de % 33, Avustralya'da % 16.4, Belçika'da 14.9, olarak bildirilmiştir (51) 2007 yılında ABD'de çok merkezli yapılan bir başka araştırmada % 35.1(74), Tayland'da % 40 (65), İngiltere ve İrlanda'da % 16 (77), Tayvan'da % 45 (94), % 67.3 (73) oranlarında direnç bildirilmiştir. İspanya'da yapılan çalışmada ise bu verilerden farklı olarak 1997'deki direnç oranı % 50 iken 2007'de bu oran % 34.9'a düştüğü saptanmıştır (93). Türkiye'den bildirilen çalışmalarda trimetoprim-sulfametoksazole direnç % 18-31.8 olarak saptanmıştır. Bu oran çalışmamızda ise % 23.8 olarak bulunmuş ve sonucumuz dünya ve Türkiye verileri ile uyumlu olarak değerlendirilmiştir.

1978 yılından beri çoğul dirençli *H.influenzae* suşları bildirilmektedir. İlk çoğul dirençli suş Uzak Doğu'dan bildirilmiştir ve bu suş ampisilin-kloramfenikol-tetrasiklin direnç genleri taşımaktadır (55). 1979'da Bangkok'da ise Hib menenjitli bir olgudan kloramfenikol ve ampisiline dirençli bir suş bildirilmiştir (101). 1982 yılında Belçika'da beta-laktamaz üreten 141 suşun 26'sında kloramfenikol ve tetrasiklin direnci saptanmıştır. Avrupa'da 1983 yılında % 18 oranında ampisilin-kloramfenikol dirençli suş bildirilmiştir (102). 2010-2011 dönemini kapsayan üç ayrı çalışma incelendiğinde çoğul direnç oranları ile ilgili olarak farklı bölgelerden farklı sonuçlar elde edildiği görülmektedir. Hindistan'da HIV ile infekte olan 151 çocuğun nazofarengeal sürüntü örneğinden 19 Hib suşu izole edilmiştir. Bu suşların 14'ünde en az iki antibiyotiğe, 11'inde ise en az 4-6 antibiyotiğe karşı direnç saptanmıştır (103). Kanada'dan yapılan başka bir çalışmada ise 214 *H.influenzae* suşunda çoğul direnç saptanmamıştır (104). Çalışmamızdaki çoğul direnç sonuçlarımız Kanada verilerinden farklı olarak yüksek oranda bulunmuştur. İran'da ise sonuçlarımıza benzer şekilde çeşitli klinik

örneklerden izole edilen 38 *H.influenzae* suşunun % 18.4’ünde çoğul direnç bildirilmiştir (105).

Ülkemizde yapılan bir çalışmada çoğul direnç oranı % 13,8 olarak bulunmuştur. (Altun 2008) Çalışmamızda ise ülkemiz verileriyle uyumlu olarak 36 suş da (15.3) çoğul antibiyotik direnci saptanmıştır. Bu suşların 20 (% 8.5)’si iki antibiyotiğe, dokuzu (% 3.8) üç, beşi (% 2.1) dört, biri (% 0.4) beş ve biri (% 0.4) de altı antibiyotiğe dirençli bulunmuştur.

Çoğul direnç ve beta-laktamaz ilişkisi incelendiğinde klaritromisine dirençli sekiz suşun beşinin aynı zamanda ampisiline dirençli ve bu beş suşun da dördünün beta-laktamaz pozitif olduğu; sefaklara dirençli 10 suşun yedisinin ampisiline dirençli ve bunların da altısının beta-laktamaz pozitif olduğu görülmüştür. Nalidiksik aside dirençli olarak saptanan tek suş ise beta-laktamaz pozitif ampisilin dirençlidir. Ampisiline dirençli tüm suşlarda aynı zamanda trimetoprim-sulfametoksazol direncine de rastlanmıştır.

Sonuç olarak ampirik tedavide önemli bir yeri olan ampisiline karşı gelişen direncin ve bu direncin oluşumundaki en önemli mekanizma olan beta-laktamaz üretiminin ve beta-laktamaz tiplerinin araştırılması, bu konuda her ülke, bölge ve hastanenin kendi veri tabanlarını oluşturması önemlidir. CLSI, BLNAR suşlarının amoksisilin-klavulanik aside, ampisilin-sulbaktama, sefaklara, sefatemed, sefamandol, sefonisid, sefprozil, sefuroksim, piperasilin-tazobaktam ve lorakarbefe in-vitro ortamda duyarlı bulunsalar bile, bu antibiyotiklere karşı dirençli olarak bildirilmelerini önermektedir. Nitrosefin hidrolizi deneyi beta-laktamaz enziminin özellikle TEM-1’in tayininde % 90’na yakın duyarlılığa sahiptir. Bu çalışmada da beta-laktamaz üreten suşların tamamında TEM-1 tipi enzim saptanması ülkemizde nitrosefin deneyinin halen önemini koruduğunu göstermesi açısından önemlidir. Ayrıca ROB-1 tipi enzimin saptanmamış olması nedeniyle beta-laktamaz pozitifliği saptanmadan ampisiline direnç görüldüğünde bu suşların büyük olasılıkla BLNAR tipi suşlar olduğu ve yukarıda belirtilen CLSI kriterlerinin uygulanabileceği söylenebilir. Ampirik tedavinin yoğun olarak uygulandığı ülkemizde *H. influenzae* suşlarında antibiyotik direnci ve beta-laktamaz pozitifliğini belirlemek üzere yapılacak olan çalışmalarda beta-laktamaz enzim tipleri araştırılmalı ve Türkiye ile ilgili daha kapsamlı epidemiyolojik veriler elde edilmelidir. Çünkü *H. influenzae* için ülkemizde beta-laktamaz üretimi ve ampisilin direnci çok yüksek olmadığı halde ampirik tedavide 2. ve 3. kuşak sefalosporinler oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Tüm dünya ile birlikte ülkemizde de antimikrobiyal ajanlara karşı artan

direncin önüne geçebilmek, akılcı antibiyotik kullanımı ve etkin tedavi sağlayabilmek için bu veriler önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Touati A, Achour W, Ben Hassen A. Phenotypic and molecular characterization of β -lactams resistance and capsular typing of colonizing *Haemophilus influenzae* strains isolated from neutropenic patients in Tunisia. *Pathol Biol (Paris)* 2009; 57: 353-357.
2. Tristram S, Jacobs MR, Appelbaum PC. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20, 368-389.
3. Kilian M. *Haemophilus*. İçinde Murray PR, Baron EJ, Phaller MA, Tenover FC, Tenover FC, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 9 th. ed. Washington: ASM Press; 2007. pp. 636-648.
4. Cerquetti M, Cardines R, Giufre M, et al. Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae* strains isolated from invasive disease in Italy. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 1139-1143.
5. Leaves NI, Dimopoulou I, Hayes I, et al. Epidemiological studies of large resistance plasmids in *Haemophilus*. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 599-604.
6. Farrell DJ, Morrissey I, Bakker S, et al. Global distribution of TEM-1 and ROB-1 β -lactamases in *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 773-776.
7. Berkiten R. Türkiye’de *Haemophilus influenzae*: Beta-laktamaz pozitifliği ve antibiyotiklere direnç. *ANKEM Derg* 2004; 18: 53-60.
8. Karlowsky JA, Verma G, Zhanel GG, Hoban DJ. Presence of ROB-1 β -lactamase correlates with cefaclor resistance among recent isolates of *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 871-875.
9. Özkul H, Özbek ÖA, Çoban H, Gülay Z. Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesinde 2003-2006 yıllarında üretilen *Haemophilus influenzae* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *ANKEM Derg* 2007; 21: 86-90.
10. Altun B, Gür D. Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesi’nde Klinik Örneklerden İzole Edilen *Haemophilus influenzae* suşlarının antibiyotiklere direnç durumu (2002-2007). *Çocuk Enf Derg* 2008; 2: 50-54.
11. Slack MPE. *Haemophilus*. İçinde Borriella SP, Murray PR, Funke G, editörler. *Topley and Wilson’s Microbiology and Microbial Infections, Bacteriology*. 10th ed. London: ASM Press; 2005. pp. 1692-1718.
12. Murphy TF. *Haemophilus* species (including *H. influenzae* and Chancroid). İçinde Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editörler. *Mandell, Douglas, and Bennet’s*

- Principles and Practice of Infectious Diseases*. 7th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2010. pp. 2911-2919.
13. Murray PR. *Haemophilus* and Related Bacteria. İçinde Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA, editörler. *Medical Microbiology*. St Louis; Elsevier Mosby: 2009, pp. 367-376.
 14. Munson E, Pfaller M, Koontz F, Doern G. Comparison of porphyrin-based, growth factor-based, and biochemical-based testing methods for identification of *Haemophilus influenzae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21: 196-203.
 15. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarek EB. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 1553-1558.
 16. Kilian M. A taxonomic study of the genus *Haemophilus*, with the proposal of a new species. *J Gen Microbiol* 1976; 93: 9-62.
 17. Pfeiffer R. Vorläufige mittlungen über den erreger der influenza. *Disch Med Wochenschr* 1892; 18: 28.
 18. Eyler JM. The State of Science, Microbiology, and Vaccines Circa 1918. *Public Health Rep* 2010; 3: 27-36.
 19. Pittman M. A classification of the hemolytic bacteria of the genus *Haemophilus*: *Haemophilus haemolyticus* Bergey et al. and *Haemophilus parahaemolyticus* nov spec. *J Bacteriol* 1953; 65: 750-751.
 20. Ward JI. *Haemophilus influenzae*. İçinde Feigin RD, Cherry JD, Demmler GJ, Kaplan SL, editörler. *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*. 5th ed. Philadelphia: Saunders; 2004. pp. 1636-1663.
 21. Hasegawa K, Chiba N, Kobayashi R, Murayama SY, Iwata S, Sunakawa K, Ubukata K. Rapidly increasing prevalence of beta-lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b in patients with meningitis. *J Antimicrob Chemother* 2004; 48: 1509-1514.
 22. 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. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 1077-1082.

23. Peltola H. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 302-317.
24. Evans NM, Smith DD, Wicken AJ. Haemin and nicotinamide adenine dinucleotide requirements of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae*. *Med Microbiol* 1974; 7: 359-365.
25. Ryan KJ. *Haemophilus* and *Bordetella*. İçinde Ryan KJ, Ray CG, editörler. *Sherris Medical Microbiology, An Introduction to Infectious Diseases*. 4th ed. New York; McGraw-Hill: 2003. pp. 395-407.
26. Gilsdorf JR, Marrs CF, Foxman B. *Haemophilus influenzae*: genetic variability and natural selection to identify virulence factors. *Infect Immun* 2004; 72: 2457-2461.
27. Tunkel AR, Scheld WM. Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis. *Clin Microbiol Rev* 1993; 6: 118-136.
28. Rosenau A, Sizaret PY, Musser JM, Goudeau A, Quentin R. Adherence to human cells of a cryptic *Haemophilus* genospecies responsible for genital and neonatal infections. *Infect Immun* 1993; 61: 4112-4118.
29. Hood DW, Deadman ME, Jennings MP, Bisercic M, Fleischmann RD, Venter JC, Moxon ER. DNA repeats identify novel virulence genes in *Haemophilus influenzae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 11121-11125.
30. Cope LD, Yogev R, Mertsola J, Argyle JC, McCracken GH Jr, Hansen EJ. Effect of mutations in lipooligosaccharide biosynthesis genes on virulence of *Haemophilus influenzae* type b. *Infect Immun* 1990; 58: 2343-2351.
31. Möller LV, van Alphen L, Grasselie H, Dankert J. N-acetyl-D-glucosamine medium improves recovery of *Haemophilus influenzae* from sputa of patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 1952-1954.
32. Levinthal W. Bakteriologicche und serologische influenzastuen. *Z Hyg Infektionskr* 1918; 86: 1-23.
33. Bradley JS. Management of community-acquired pediatric pneumonia in an era of increasing antibiotic resistance and conjugate vaccines. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21: 592-598.

34. Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; eighteenth informational supplement, CLSI document M100-S18, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA (2010).
35. Hindler JF, Patel JB. Susceptibility Test Methods: Fastidious Bacteria. İçinde Murray PR, Baron EJ, Phaller MA, Tenover FC, Yolken RH, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 9 th. ed., Washington: ASM Press; 2007. pp. 1193-1213.
36. Race LB, Bonoma RA. Mechanisms of resistance to antimicrobial agents. İçinde Murray PR, Baron EJ, Phaller MA, Tenover FC, Yolken RH, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed., Washington: ASM Press; 2007. Pp 1114-1145.
37. Rubin IG, Mederios AA, Yolken RH, Moxon ER. Ampicillin treatment failure of apparently beta-lactamase-negative *Haemophilus influenzae* type b meningitidis due to novel beta-lactamase. *Lancet* 1981, 1008-1010.
38. Tristram SG, Hawes R, Souprounov J. Variation in selected regions of blaTEM genes and promoters in *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Sep;56(3):481-4.
39. Scriver SR, Walmsley SL, Kau CL, Hoban DJ, Brunton J, McGeer A, et al. Determination of antimicrobial susceptibilities of Canadian isolates of *Haemophilus influenzae* and characterization of their beta-lactamases. Canadian *Haemophilus* Study Group. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 1678-1680.
40. Leaves NI, Dimopoulou I, Hayes I, Kerridge S, Falla T, Secka O, et al. Epidemiological studies of large resistance plasmids in *Haemophilus*. *J Antimicrob Chemother* 2000; 45: 599-604.
41. Dimopoulou ID, Russell JE, Mohd-Zain Z, Herbert R, Crook DW. Site-specific recombination with the chromosomal tRNA(Leu) gene by the large conjugative *Haemophilus* resistance plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1602-1603.
42. Scheifele DW, Fussell SJ, Roberts MC. Characterization of ampicillin-resistant *Haemophilus parainfluenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 21: 734-739.
43. Maclean IW, Slaney L, Juteau JM, Levesque RC, Albritton WL, Ronald AR. Identification of a ROB-1 beta-lactamase in *Haemophilus ducreyi*. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36: 467-469.

44. Serfass DA, Mendelman PM, Chaffin DO, Needham CA. Ampicillin resistance and penicillin-binding proteins of *Haemophilus influenzae*. *J Gen Microbiol* 1986; 132: 2855-2861.
45. Markowitz SM. Isolation of an ampicillin-resistant, non-beta-lactamase-producing strain of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; 17: 80-83.
46. Parr TR Jr, Bryan LE. Mechanism of resistance of an ampicillin-resistant, beta-lactamase-negative clinical isolate of *Haemophilus influenzae* type b to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 1984; 25: 747-753.
47. Livermore DM, Brown DF. Detection of beta-lactamase-mediated resistance. *J Antimicrob Chemother* 2001; 48: 59-64.
48. James PA, Reeves DS. Bacterial resistance to cephalosporins as a function of outer membrane permeability and access to their target. *J Chemother* 1996; 8: 37-47.
49. Hirakata Y, Ohmori K, Mikuriya M, Saika T, Matsuzaki K, Hasegawa M, et al. Antimicrobial activities of piperacillin-tazobactam against *Haemophilus influenzae* isolates, including beta-lactamase-negative ampicillin-resistant and beta-lactamase-positive amoxicillin-clavulanate-resistant isolates, and mutations in their quinolone resistance-determining regions. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 4225-4230.
50. Kishii K, Chiba N, Morozumi M, Ono A, Ida T, Ubukata K. In vitro activity of tebipenem, a new oral carbapenem antibiotic, against beta-lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 3970-3973.
51. Turnak MR, Bandak SI, Bouchillon SK, Allen BS, Hoban DJ. Antimicrobial susceptibilities of clinical isolates of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* collected during 1999-2000 from 13 countries. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7: 671-677.
52. Hoban DJ, Doern GV, Fluit AC, Roussel-Delvallez M, Jones RN. Worldwide prevalence of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis* 2001; 32: S81-93.
53. Tait-Kamradt A, Davies T, Appelbaum PC, Depardieu F, Courvalin P, Petitpas J, et al. Two new mechanisms of macrolide resistance in clinical strains of *Streptococcus pneumoniae* from Eastern Europe and North America. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3395-3401.

54. Burns JL, Mendelman PM, Levy J, Stull TL, Smith AL. A permeability barrier as a mechanism of chloramphenicol resistance in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 27: 46-54.
55. Roberts MC, Swenson CD, Owens LM, Smith AL. Characterization of chloramphenicol-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; 18: 610-615.
56. Nakamura S, Yanagihara K, Morinaga Y, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, et al. Melting curve analysis for rapid detection of topoisomerase gene mutations in *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 781-784.
57. Ho PL, Chow KH, Mak GC, Tsang KW, Lau YL, Ho AY, et al. Decreased levofloxacin susceptibility in *Haemophilus influenzae* in children, Hong Kong. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 1960-1962.
58. Ho PL, Mak GC, Tse CW, Chow KH, Cheung CH. Invasive *Haemophilus influenzae* isolates with decreased levofloxacin susceptibility in Hong Kong. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 366.
59. Hirakata Y, Ohmori K, Mikuriya M, Saika T, Matsuzaki K, Hasegawa M, et al. Antimicrobial activities of piperacillin-tazobactam against *Haemophilus influenzae* isolates, including beta-lactamase-negative ampicillin-resistant and beta-lactamase-positive amoxicillin-clavulanate-resistant isolates, and mutations in their quinolone resistance-determining regions. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 4225-4230.
60. Campos J, Chanyangam M, deGroot R, Smith AL, Tenover FC, Reig R. Genetic relatedness of antibiotic resistance determinants in multiply resistant *Hemophilus influenzae*. *J Infect Dis* 1989; 160: 810-817.
61. Levy J, Verhaegen G, De Mol P, Couturier M, Dekegel D, Butzler JP. Molecular characterization of resistance plasmids in epidemiologically unrelated strains of multiresistant *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis* 1993; 168:177-187.
62. Roberts MC, Swenson CD, Owens LM, Smith AL. Characterization of chloramphenicol-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; 18: 610-615.
63. Garvey RJ, McMullin GP. Meningitis due to beta lactamase producing type b *Haemophilus influenzae* resistant to chloramphenicol. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1983;287:1183-1184.

64. Sanbongi Y, Suzuki T, Osaki Y, Senju N, Ida T, Ubukata K. Molecular evolution of beta-lactam-resistant *Haemophilus influenzae*: 9-year surveillance of penicillin-binding protein 3 mutations in isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2487-2492.
65. Srifuengfung S, Chayakulkeeree M, Chokephaibulkit K, Tribuddharat C. Five-year study of antimicrobial susceptibility and beta-lactamase production in *Haemophilus influenzae*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2007; 38: 732-736.
66. Hoban DJ, Doern GV, Fluit AC, Roussel-Delvallez M, Jones RN. Worldwide prevalence of antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis* 2001; 32: S81-93.
67. Jansen WT, Verel A, Beitsma M, Verhoef J, Milatovic D. Longitudinal European surveillance study of antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 873-877.
68. Jacobs MR, Felmingham D, Appelbaum PC, Gruneberg RN. The Alexander Project 1998-2000: susceptibility of pathogens isolated from community-acquired respiratory tract infection to commonly used antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 229-246.
69. Hoban D, Felmingham D. The PROTEKT surveillance study: antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* from community-acquired respiratory tract infections. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 49-59.
70. Brown SD, Rybak MJ. Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* and *Haemophilus influenzae* collected from patients across the USA, in 2001-2002, as part of the PROTEKT US study. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: i7-15.
71. Sunakawa K, Farrell DJ. Mechanisms, molecular and sero-epidemiology of antimicrobial resistance in bacterial respiratory pathogens isolated from Japanese children. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2007; 6: 7.
72. Fluit AC, Florijn A, Verhoef J, Milatovic D. Susceptibility of European beta-lactamase-positive and -negative *Haemophilus influenzae* isolates from the periods 1997/1998 and 2002/2003. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 133-138.

73. Jain A, Kumar P, Awasthi S. High ampicillin resistance in different biotypes and serotypes of *Haemophilus influenzae* colonizing the nasopharynx of healthy school-going Indian children. *J Med Microbiol* 2006; 55: 133-137.
74. Critchley IA, Brown SD, Traczewski MM, Tillotson GS, Janjic N. National and regional assessment of antimicrobial resistance among community-acquired respiratory tract pathogens identified in a 2005-2006 U.S. Faropenem surveillance study. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 4382-4389.
75. Karlowsky JA, Critchley IA, Blosser-Middleton RS, Karginova EA, Jones ME, Thornsberry C, Sahm DF. 2002. 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. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1063-1066.
76. Dabernat H, Delmas C, Seguy M, Pelissier R, Faucon G, Bennamani S, Pasquier C. 2002. Diversity of beta-lactam resistance-conferring amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2208-2218.
77. Morrissey I, Maher K, Williams L, Shackcloth J, Felmingham D, Reynolds R; BSAC Working Parties on Resistance Surveillance. Non-susceptibility trends among *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* from community-acquired respiratory tract infections in the UK and Ireland, 1999-2007. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62: ii97-103.
78. Hasegawa K, Yamamoto K, Chiba N, Kobayashi R, Nagai K, Jacobs MR, et al. Diversity of ampicillin-resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. *Microb Drug Resist* 2003; 9: 39-46.
79. Bae S, Lee J, Lee J, Kim E, Lee S, Yu J, Kang Y. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae* respiratory tract isolates in Korea: results of a nationwide acute respiratory infections surveillance. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 65-71.
80. Gür D, Ozalp M, Sümerkan B, Kaygusuz A, Töreci K, Köksal I, et al. Prevalence of antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* and *Streptococcus pyogenes*: results of a multicentre study in Turkey. *Int J Antimicrob Agents* 2002; 19: 207-211.

81. Budak F, Gür D. In vitro sensitivity to antimicrobial agents of *Haemophilus influenzae* strains isolated from clinical spacimens. *Microbiyol Bül* 2003; 37: 19-25.
82. Sener 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. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 587-593.
83. Uncu H, Çolakoğlu S, Turunç T, Demiroğlu YZ, Arslan H. In vitro resistance rates of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* clinical isolotes to the antibiotics used in therapy. *Mikrobiyol Bul.* 2007;41 (3):441-446
84. Gazi H, Kurutepe S, Sürücüoğlu S, Teker A, Özbakkaloğlu B. Antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens in the oropharynx of healty school children in Turkey. *Indian J Med Res* 2004; 120: 489-494.
85. Torun MM, Namal N, Demirci M, Bahar H. Nasopharyngeal carriage and antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis* in healthy school children in Turkey. *Indian J Med Microbiol* 2009; 27: 86-88.
86. Gönüllü N, Çatal F, Küçükbasmacı Ö, Özdemir S, Mamal Torun M, Berkiten R. Comparison of in vitro activities of Tigecycline with other antimicrobial agents against *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* in two university hospitals in İstanbul, Turkey. *Chemotherapy* 2009; 55: 161-167
87. Ilki A, Sağıroğlu P, Elgörmüş N, Söyletir G. Trends in antibiotic susceptibility patterns of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* isolates: four years follow up. *Mikrobiyol Bul* 2010; 44: 169-175.
88. Öngen B, Kaygusuz A, Gürler N, Töreci K: İstanbul'da çocuk hastalardan izole edilen *Haemophilus influenzae* suşlarında antibiyotik direnci, " Anğ Ö, Mamal-Torun M (eds): *Haemophilus influenzae* Simpozyumu" kitabında s.174, Türk Mikrobiyoloji Cem Yayını No.24, İstanbul (1995).
89. Saydam C, Tünger A, Özinel MA, Tokbaş A: *Haemophilus influenzae* kökenlerinin serotipleri, beta-laktamaz salgılama özellikleri ve antibiyotiklere duyarlılıkları, *ANKEM Derg* 1996; 10:415.
90. Berkiten R, Gürol SD. Solunum yolu infeksiyonlarından izole edilen *Haemophilus influenzae* suşları ve çeşitli antimikrobik maddelere direnç. *ANKEM Derg* 2001; 15: 718-723.

91. Torun MM, Namal N, Demirci M, Bahar H, Kocazeybek B. Pharyngeal carriage and antimicrobial resistance of *Haemophilus influenzae* in non-type-b-vaccinated healthy children attending day care centers in Turkey. *Chemotherapy* 2007; 53: 114-117.
92. 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. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 2561-2564.
93. García-Cobos S, Campos J, Cercenado E, Román F, Lázaro E, Pérez-Vázquez M, de Abajo F, Oteo J. 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. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 2760-2766.
94. Jean SS, Hsueh PR, Lee WS, Chang HT, Chou MY, Chen IS, et al. Nationwide surveillance of antimicrobial resistance among *Haemophilus influenzae* and *Streptococcus pneumoniae* in intensive care units in Taiwan. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009; 28: 1013-1017.
95. 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. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Mar;63(3):511-9.
96. Pérez-Trallero E, Martín-Herrero JE, Mazón A, García-Delafuente C, Robles P, Iriarte V, et al. Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens Antimicrobial resistance among respiratory pathogens in Spain: latest data and changes over 11 years (1996-1997 to 2006-2007). *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 2953-2959.
97. Gomi K, Fujimura S, Fuse K, Takane H, Nakano Y, Kariya Y, et al. Antibacterial activity of carbapenems against clinical isolates of respiratory bacterial pathogens in the northeastern region of Japan in 2007. *J Infect Chemother* 2011; 17: 200-206.
98. Haas W, Pillar CM, Hesje CK, Sanfilippo CM, Morris TW. Bactericidal activity of besifloxacin against staphylococci, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 1441-1447.
99. Pérez-Vázquez M, Román F, Aracil B, Cantón R, Campos J. Laboratory detection of *Haemophilus influenzae* with decreased susceptibility to nalidixic acid, ciprofloxacin,

- levofloxacin, and moxifloxacin due to GyrA and ParC mutations. *Clin Microbiol* 2004; 42: 1185-1191.
100. Yokota S, Ohkoshi Y, Sato K, Fujii N. Emergence of fluoroquinolone-resistant *Haemophilus influenzae* strains among elderly patients but not among children. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 361-365.
 101. Fraise AP, Meeks AC, Richards JE. Meningitis due to *Haemophilus influenzae* resistant to ampicillin and chloramphenicol. *Arch Dis Child* 1986; 61: 1134-1135.
 102. Levy J, Verhaegen G, De Mol P, Couturier M, Dekegel D, Butzler JP. Molecular characterization of resistance plasmids in epidemiologically unrelated strains of multiresistant *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis* 1993; 168: 177-187.
 103. Bhattacharya SD, Niyogi SK, Bhattacharyya S, Fitzwater S, Chauhan N, Sudar A, Mandal S. High rates of colonization with drug resistant *Haemophilus influenzae* type B and *Streptococcus pneumoniae* in unvaccinated HIV infected children from West Bengal. *Indian J Pediatr* 2011; 78: 423-429.
 104. Zhanel GG, DeCorby M, Adam H, Mulvey MR, McCracken M, Lagacé-Wiens P, et al. Prevalence of antimicrobial-resistant pathogens in Canadian hospitals: results of the Canadian Ward Surveillance Study (CANWARD 2008). *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 4684-4693.
 105. Mojgani N, Rahbar M, Taqizadeh M, Ashtiani MP, Mohammadzadeh M. Biotyping, capsular typing, and antibiotic resistance pattern of *Haemophilus influenzae* strains in Iran. *Jpn J Infect Dis* 2011; 64: 66-68.



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI
Yerel Etik Kurulu




Sayı : 2327

Tarih : 27/07/2009

Konu : Prof.Dr. Betigül ÖNGEN hk,

Sayın Prof.Dr. Betigül ÖNGEN
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Öğretim Üyesi
İlgil : 03.06.2009 tarihli 391 sayılı yazınız

Sorumlu araştırıcılığını üstlendiğiniz ve Tıpta Uzmanlık Öğrencisi Dr. Nuray KUVAT'ın yürüteceği 2009/1929 dosya numaralı "Haemophilus influenzae suşlarında antibiyotik direnci ve direncin moleküler analizi" başlıklı uzmanlık tez çalışması kurulumuzun 26.06.2009 tarihli 07 sayılı toplantısında onaylanmış olup, tutanaklar ekte sunulmuştur.
Bilgilerinize saygılarımla rica ederim.


Prof.Dr. Güher SARUHAN DİRESKENELİ
İstanbul Tıp Fakültesi
Dekan Yardımcısı ve
Etik Kurul Başkanı

Eki: Tutanak



İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
YEREL ETİK KURUL TUTANAĞI


Toplantı Tarihi : 26/06/2009

Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Etik Kurul Toplantı Salonu

Toplantı Sayısı : 7

Sorumlu araştırmacılığını Fakültemiz Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof.Dr. Betigül ÖNGEN'in üstlendiği ve Tıpta Uzmanlık Öğrencisi Dr. Nuray KUVAT'ın yürüteceği 2009/1929 protokol numaralı "Haemophilus influenzae suşlarında antibiyotik direnci ve direncin moleküler analizi" başlıklı uzmanlık tez çalışması kurulumuzda incelendi.

Etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, uygulamaya konulabileceğine karar verildi.


Prof.Dr. Güher SARUHAN DİRESKENELİ
Etik Kurul Başkanı (Dekan Yardımcısı)

Prof.Dr. A.Yağız ÜRESİN
Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Prof.Dr. Ahmet GÜL
İç Hast. A.D, Romatoloji Bilim Dalı

Prof.Dr. Berrin UMMAN
Kardiyoloji A.D.

Prof.Dr. Kamil PEMBEÇİ
Anesteziyoloji A.D.

Prof.Dr. Sevinç EMRE
Çocuk Sağ. Ve Hast. A.D

Prof.Dr. Nuran YILDIRIM
Deontoloji ve Tıp Tarihi A.D.

Prof.Dr. Oğuzhan ÇOBAN
Nöroloji A.D.

Prof.Dr. Pınar SAİP
İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr. Ümit TÜRKOĞLU
Biokimya A.D

Prof.Dr. Neşe ÇOLAK
İç Hast.A.D. End. Ve Metabolizma Hast. B.D.

Prof.Dr. Nurhan ENGİNAR
Farmakoloji ve Kli.F. A.D

Fatma Ceyda DÖNMEZER
Sivil Toplum Örgütü Üyesi

Av. Dilek TEMİZ ÖZBEK
Hukukçu

Prof.Dr. Y. Sümer YAMANER
Genel Cerrahi A.D.