

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN
***HAEMOPHILUS* TÜRLERİNİN ANTİBİYOTİK DİRENÇ**
PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Hatice Hanım YURTTAKAL

KAYSERİ 2022

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN
HAEMOPHILUS TÜRLERİNİN ANTİBİYOTİK DİRENÇ
PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Hatice Hanım YURTTAKAL

Danışman

Doç. Dr. Pınar SAĞIROĞLU

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından TTU-2021-11316 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

KAYSERİ 2022

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın planlanmasında, yürütülmesinde ve sonuçlanmasında desteğini gördüğüm değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Doç. Dr. Pınar Sağıroğlu'na teşekkür ederim. Tez çalışmam sırasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Prof. Dr. Selma Gökahmetoğlu'na, Prof. Dr. Mustafa Altay Atalay'a, Dr. Öğr. Üyesi Ömür Mustafa Parkan'a ve uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, eğitimimde emeği geçen hocalarıma teşekkür ederim.

Çalışmamdaki desteklerinden dolayı Yasin Gülpınar'a, Pınar Yaşar'a, Gülşah Koç'a, Ela Başok'a, Mustafa Dursun'a, asistan arkadaşlarım Dr. Sema Nur Dede'ye, Dr. Mehtap Oskay'a teşekkür ederim. Asistanlık sürem boyunca çalıştığım asistan arkadaşlarıma ve tüm Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim.

TTU-2021-11316 no'lu bu tez projesini maddi olarak destekleyen Erciyes Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri birimine teşekkür ederim.

Tüm hayatım boyunca desteğini esirgemeyen, bugünlere gelmemde büyük emeği olan aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR ve SİMGELER	vii
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
ÖZET.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Haemophilus spp.</i>	3
2.1.1. Tarihçe	3
2.1.2. Sınıflandırma	4
2.1.3. Mikrobiyolojik Özellikleri.....	4
2.1.4. Biyokimyasal Özellikleri.....	5
2.2. <i>Haemophilus spp.</i> Enfeksiyonları	7
2.2.1. Epidemiyoloji	7
2.2.2. Patogenez.....	9
2.2.3. <i>H. influenzae</i> için Risk Faktörleri.....	11
2.2.4. Klinik.....	11
2.2.4.1. <i>Haemophilus influenzae</i> tip b'nin Neden Olduğu Enfeksiyonlar	12
2.2.4.2. NTHi'nin Neden Olduğu Enfeksiyonlar.....	14
2.2.4.3. Diğer <i>Haemophilus</i> Türlerinin Neden Olduğu Enfeksiyonlar	16
2.3. Laboratuvar Tanısı	18
2.3.1. Klinik Örneklerin Toplanması, Taşınması ve Saklanması	18

2.3.2. Klinik Örneklerin Direkt İncelenmesi	19
2.3.2.1. Mikroskopi.....	19
2.3.2.2. Antijen Saptama.....	19
2.3.2.3. Moleküler Teknikler	20
2.3.3. <i>Haemophilus</i> Türlerinin Kültürden İzolasyonu.....	20
2.3.3.1. Besiyeri	20
2.3.3.2. İnkübasyon Ortamı ve Süresi.....	21
2.3.3.3. Koloni Görünümü.....	21
2.3.3.4. Tanımlama	22
2.3.4. <i>Haemophilus</i> Türlerinin Biyotiplendirilmesi	23
2.3.5. <i>Haemophilus influenzae</i> Suşlarının Serotiplendirilmesi	24
2.3.6. <i>Haemophilus influenzae</i> Suşlarının Genotiplendirilmesi	25
2.3.7. İn vitro Antibiyotik Duyarlılığı	25
2.4. Tedavi.....	25
2.5. Antibiyotik Direnci	26
2.5.1. Beta Laktam Antibiyotik Direnci	28
2.5.1.1. β -laktamaz Aracılı Direnç.....	29
2.5.1.1.1 TEM β -laktamazlar	30
2.5.1.1.2 ROB β -laktamazlar	30
2.5.1.1.3 Yeni β -laktamazlar.....	30
2.5.1.2. Penisilin Bağlayan Proteinlerdeki Değişikliklere Bağlı Direnç	30
2.5.2. Makrolid Direnci	32
2.5.3. Kinolon Direnci	33
2.5.4. Trimetoprim-Sülfametoksazol Direnci.....	34
2.5.5. Tetrasiklin Direnci	36

2.5.6. Kloramfenikol Direnci.....	36
2.6. Korunma.....	36
2.6.1. Doğal Bağışıklık.....	36
2.6.2. Kemoprofilaksi	37
2.6.3. Aktif Bağışıklama.....	37
3. GEREÇ VE YÖNTEM	39
3.1. Çalışmaya Alınan <i>Haemophilus spp.</i> İzolatları.....	39
3.2. Klinik Örneklerden <i>Haemophilus spp.</i> İzolasyonu, Saklanması ve Stokların Canlandırılması.....	39
3.3. Bakterilerin Tanımlanması.....	39
3.3.1. X ve V Faktörleri ile Tanımlama.....	39
3.3.2. MALDI-TOF MS ile Tanımlama	40
3.3.3. <i>H. influenzae</i> Suşlarının Moleküler Yöntem ile Doğrulanması	41
3.3.3.1. DNA İzolasyonu	41
3.3.3.2. <i>H. influenzae</i> Tespiti için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	42
3.4. <i>H. influenzae</i> Suşlarının Tip b Antiserum ile Serotiplendirilmesi	43
3.5. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi.....	44
3.5.1. Beta Laktamaz Varlığının Gösterilmesi	45
3.5.2. Disk Difüzyon Testi	45
3.5.3. Gradyent Strip Test	46
3.5.4. Sıvı Mikrodilüsyon Testi.....	47
3.5.4.1. %50 Hemolizli At Kanı Stok Çözeltilisinin Hazırlanması	47
3.5.4.2. β -Nicotinamide adenine dinucleotide (β -NAD) Stok Çözeltilisinin Hazırlanması.....	48
3.5.4.3. MH-F Sıvı Besiyerinin Hazırlanması	48

3.5.4.4. Antibiyotik Stok Solüsyonlarının Hazırlanması.....	48
3.5.4.5. Bakteri İnokulumu Hazırlanması.....	49
3.5.4.6. Testin Yapılışı.....	49
3.5.5. Değerlendirme ve Yorum	51
3.6.Moleküler Yöntemler ile Direnç Genlerinin Araştırılması	52
3.6.1. DNA İzolasyonu	52
3.6.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	52
3.6.2.1. Çalışmada Kullanılan Primer Dizileri	52
3.6.2.2. PCR Karışımı ve Amplifikasyon Koşulları	54
3.6.3. Agaroz Jel Elektforezi.....	56
3.6.4. Dizi Analizi	57
3.6.4.1. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması	57
3.6.4.2. Sekans PCR	57
3.6.4.3. Sekans PCR sonrası saflaştırma.....	58
3.6.4.4. Değerlendirme	58
4. BULGULAR.....	60
4.1. <i>Haemophilus spp.</i> İzolatları.....	60
4.2. Tanımlama Sonuçları	64
4.3. <i>H. influenzae</i> Suşlarının Tip b Antiserum ile Serotiplendirilmesi	65
4.4. Beta Laktamaz Varlığının Gösterilmesi	66
4.5. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Sonuçları	67
4.6. Beta Laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmalarının Belirlenmesi	70
4.6.1. <i>bla</i> _{TEM} ve <i>bla</i> _{ROB} Direnç Genlerinin Varlığı.....	70
4.6.2. <i>bla</i> _{TEM} Genlerinin Dizi Analizi Sonuçları	71
4.6.3. <i>ftsI</i> Gen Mutasyonları	72
4.6.3.1. <i>H. influenzae</i>	72

4.6.3.2. <i>H. parainfluenzae</i> ve <i>H. haemolyticus</i>	73
4.7. Beta Laktam Antibiyotiklere Dirençte Fenotipik ve Genotipik Test Sonuçlarının Yorumlanması.....	73
4.7.1. Fenotip ve Genotip Sonuçlarına Göre Sınıflandırma	73
4.7.2. <i>H. influenzae</i> 'da Ampisilin Açısından Disk Difüzyon Testi ve Sıvı Mikrodilüsyonun Karşılaştırılması	74
4.7.3. Beta Laktam Grupları ile Sefaloporinlere Direnç Oranlarının Karşılaştırılması.....	75
4.8. Kinolonlara Direnç Mekanizmalarının Belirlenmesi	75
4.8.1. QRDR Gen Mutasyonları	75
4.8.2. QRDR Mutasyonları ile Siprofloksasin MİK'leri Arasındaki İlişki.....	77
4.9. <i>sul1</i> ve <i>sul2</i> Direnç Genlerinin Varlığı	77
5. TARTIŞMA	80
6. SONUÇLAR	89
KAYNAKLAR	91

KISALTMALAR ve SİMGELER

ADT	: Antibiyotik duyarlılık testi
AMC	: Amoksisilin klavulanat
AMP	: Ampisilin
AZT	: Azitromisin
β -NAD	: β -Nicotinamide adenine dinucleotide
BAL	: Bronkoalveolar lavaj
BP	: Benzilpenisilin,
bp	: Baz çifti
BLPAR	: Beta laktamaz pozitif ampisilin dirençli
BLNAR	: Beta laktamaz negatif ampisilin dirençli
BLNAS	: Beta laktamaz negatif ampisilin duyarlı
BLPACR	: Beta laktamaz pozitif amoksisilin klavulanat dirençli
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
°C	: Santigrad derece
C	: Kloramfenikol
CO ₂	: Karbondioksit
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
CEC	: Sefaklor
CFU	: Colony Forming Unit
CIP	: Siprofloksasin
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
CLR	: Klaritromisin
CRO	: Seftriakson
CTX	: Sefotaksim
dH ₂ O	: Deiyonize su
DHFR	: Dihidrofolat redüktaz
DHPS	: Dihidropteroat sentaz
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ETA	: Endotrakeal aspirat
EUCAST	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FEP	: Sefepim

HIV	: Human Immunodeficiency Virus
Hia	: <i>Haemophilus influenzae</i> serotip a
Hib	: <i>Haemophilus influenzae</i> serotip b
Hic	: <i>Haemophilus influenzae</i> serotip c
Hid	: <i>Haemophilus influenzae</i> serotip d
Hie	: <i>Haemophilus influenzae</i> serotip e
Hif	: <i>Haemophilus influenzae</i> serotip f
HTM	: <i>Haemophilus</i> Test Medium
IgA1	: İmmunglobulin A1
IgG	: İmmunglobulin G
IgM	: İmmunglobulin M
KOAH	: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
LPS	: Lipopolisakkarit
MHA	: Mueller Hinton Agar
MH-F	: Mueller Hinton Fastidious Agar
MEM	: Meropenem
MİK	: Minimal inhibitör konsantrasyon
MLST	: Multilocus sequence typing
MOX	: Moksifloksasin
LEV	: Levofloksasin
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotit
NADP	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NAL	: Nalidiksik asit
NTA	: Nazotrakeal aspirat
NTHi	: Tiplendirilemeyen <i>Haemophilus influenzae</i>
PRP	: Poliribozil ribitol fosfat
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PFGE	: Pulsed-field gel electrophoresis
PBP	: Penisilin bağlayan protein
QRDR	: Quinolone Resistance-Determining Region
rRNA	: Ribozomal ribonükleik asit
RIF	: Rifampisin

RNA	: Ribonükleik asit
SAST	: Lam aglütinasyon yöntemi ile serotiplendirme
SF	: Serum fizyolojik
<i>spp.</i>	: türleri
SXT	: Trimetoprim-sülfametoksazol
TBE	: Tris-borik asit-EDTA
TET	: Tetrasiklin
tRNA	: Taşıyıcı RNA
V	: Volt
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
mg	: Miligram
mL	: Mililitre
mm	: Milimetre
pmol	: Pikomol

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 1.	<i>Haemophilus influenzae</i> 'nin tarihçesi	3
Tablo 2.	<i>Haemophilus</i> türlerinin fenotipik özellikleri	6
Tablo 3.	<i>Haemophilus</i> türlerinin tanımlanmasında kullanılan fenotipik özellikler	6
Tablo 4.	<i>H. influenzae</i> tip b (Hib) ve tiplendirilemeyen <i>H. influenzae</i> (NTHi) özelliklerinin karşılaştırılması	8
Tablo 5.	<i>H. influenzae</i> 'nin virülans faktörleri	10
Tablo 6.	<i>H. influenzae</i> 'nin neden olduğu enfeksiyonlar	12
Tablo 7.	<i>H. influenzae</i> ve <i>H. parainfluenzae</i> 'nin biyotiplendirilmesi	24
Tablo 8.	<i>Haemophilus spp.</i> 'nin tedavisinde kullanılan antibiyotikler ve bakteri hücrendeki hedefleri	26
Tablo 9.	<i>H. influenzae</i> , <i>H. parainfluenzae</i> ve <i>H. haemolyticus</i> türlerinde daha önce tanımlanmış moleküler direnç mekanizmaları ve ilgili genlerde bildirilen mutasyonlar	27
Tablo 10.	Beta laktam antibiyotiklere direnç mekanizmalarına göre fenotipik ve genotipik sınıflandırma	29
Tablo 11.	Farklı BLNAR çalışmalarında tanımlanan <i>ftsI</i> mutasyonları	31
Tablo 12.	Konjuge monovalan <i>Haemophilus influenzae</i> tip b aşıları	38
Tablo 13.	<i>H. influenzae</i> Real-Time PCR Tespit Kiti için kullanılan PCR karışımı.	42
Tablo 14.	<i>H. influenzae</i> Real-Time PCR Tespit Kiti için uygulanan PCR protokolü ..	42
Tablo 15.	<i>H. influenzae</i> Real-Time PCR Tespit Kiti için yorumlama kriterleri	43
Tablo 16.	Çalışmada kullanılan antibiyotik tozları ve potensleri	48
Tablo 17.	Antibiyotik tozlarının çözücü ve sulandırıcıları	49
Tablo 18.	Mikroplakta bulunan antibiyotikler ve dilüsyon aralıkları (µg/mL)	50
Tablo 19.	Çalışmada kullanılan kalite kontrol suşları	51
Tablo 20.	Klinik sınır değerler için kullanılan rehberler	52
Tablo 21.	Çalışmada kullanılan primer dizileri	53
Tablo 22.	<i>sul1</i> ve <i>sul2</i> için kullanılan PCR karışımı	55

Tablo 23. <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{ROB} , <i>ftsI</i> , <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>parC</i> ve <i>parE</i> için kullanılan PCR karışımı.....	55
Tablo 24. Direnç genlerinin amplifikasyonu için uygulanan PCR protokolü	56
Tablo 25. Sekans PCR’da kullanılan reaktifler ve hacimleri	58
Tablo 26. Sekans PCR protokolü	58
Tablo 27. <i>Haemophilus</i> kökenlerinin izole edildiği hastalar ve örneklerin dağılımı ...	60
Tablo 28. XV Testi, MALDI-TOF MS ve <i>H. influenzae</i> Real-Time PCR Tespit Kiti’nden elde edilen sonuçlar ve suşların tanımlanması.....	65
Tablo 29. Antiserum ile Hib bulunan kökenler ve izole edildiği hasta bilgileri	66
Tablo 30. Disk difüzyon testine göre duyarlılık sonuçları	68
Tablo 31. Sıvı mikrodilüsyon/gradiyent strip teste göre duyarlılık sonuçları	68
Tablo 32. MİK50, MİK90 ve MİK aralığı.....	69
Tablo 33. Hib ve Hib dışı <i>H. influenzae</i> izolatlarının duyarlılıklarının karşılaştırılması	69
Tablo 34. <i>bla</i> _{TEM} geni pozitif BLPAR ve BLPACR suşlar	71
Tablo 35. <i>H. influenzae</i> kökenlerinde saptanan <i>ftsI</i> gen mutasyonları ve BLNAR/BLPACR sınıflaması	72
Tablo 36. <i>H. influenzae</i> kökenlerinin beta laktam antibiyotikler açısından fenotipik ve genotipik test sonuçları ve sınıflandırılması.....	73
Tablo 37. <i>H. influenzae</i> ’da ampisilin için disk difüzyon testi ve sıvı mikrodilüsyonun karşılaştırılması	74
Tablo 38. Beta laktam sınıfına göre sefalosporinlere duyarlılık oranları	75
Tablo 39. Kinolon dirençli bulunan kökenlere ait antibiyotik duyarlılık testi sonuçları ve QRDR genlerinde bulunan mutasyonlar.....	76
Tablo 40. Trimetoprim-sülfametoksazol dirençli bulunan kökenlere ait antibiyotik duyarlılık testi sonuçları ve <i>sul1</i> , <i>sul2</i> PCR sonuçları.....	78

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	CDC verilerine göre invaziv enfeksiyonlarda <i>H. influenzae</i> ve serotiplerinin yıllar içindeki insidansı	9
Şekil 2.	Trimetoprim ve sülfametoksazolün etki mekanizması.....	34
Şekil 3.	<i>Haemophilus</i> türlerinin X ve V faktör ile tanımlanması	40
Şekil 4.	<i>H. influenzae</i> Real-Time PCR Tespit Kiti	43
Şekil 5.	Tip b antiserum ile <i>H. influenzae</i> tip b araştırılması	44
Şekil 6.	Sefinaz diski ile beta laktamaz araştırılması.....	45
Şekil 7.	Disk difüzyon testi.....	46
Şekil 8.	Gradient strip test	47
Şekil 9.	Sıvı mikrodilüsyon testi.....	51
Şekil 10.	<i>Haemophilus</i> kökenlerinin mevsimsel dağılımı	62
Şekil 11.	Polimikrobiyal numunelerdeki etkenleri dağılımı	63
Şekil 12.	Erciyes Üniversitesi Hastanesi Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda izole edilen <i>Haemophilus</i> kökenlerinin yıllar içerisinde değişimi.....	64
Şekil 13.	PCR ile <i>bla</i> _{TEM} geni pozitif saptanan izolatlara ait jel görüntüsü.....	71
Şekil 14.	<i>gyrA</i> -S84, D88; <i>parC</i> -S84 ve <i>parE</i> -D420 mutasyonu bulunan suşlarda mutasyon sayısı ile siprofloksasin MİK'i arasındaki ilişki	77
Şekil 15.	<i>sul1</i> ve <i>sul2</i> çalışılan bazı suşlara ait jel görüntüsü	79

ÖZET

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *HAEMOPHILUS* TÜRLERİNİN ANTİBİYOTİK DİRENÇ PROFİLLERİNİN BELİRLENMESİ VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Amaç: *Haemophilus* türleri; solunum yolu enfeksiyonları başta olmak üzere çeşitli enfeksiyonlarda karşımıza çıkmakta ve artan antibiyotik dirençleriyle toplum sağlığını tehdit etmektedir. Bu çalışmada, klinik örneklerden izole edilen *Haemophilus* türlerinin doğru tanımlanması, antibiyotik direnç profilinin saptanması, beta laktam, kinolon ve trimetoprim-sülfametoksazol dirençlerinin moleküler karakterizasyonunun yapılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı Bakteriyoloji Ünitesinde Haziran 2020-Aralık 2021 tarihleri arasında izole edilen 96 *Haemophilus* kökeni çalışmaya dahil edildi. İzolatlar XV faktör gereksinimi, MALDI Biotyper® sirius (Bruker, Almanya) ve *H. influenzae* Real Time PCR Tespit Kiti (Bioeksen, Türkiye) kullanılarak tanımlandı. Lam aglütinasyon yöntemi ile *H. influenzae* tip b ve sefinaz diskiyle beta laktamaz üretimi araştırıldı. Kökenlerin antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon testi, sıvı mikrodilüsyon testi/gradiyent strip test yöntemiyle belirlendi. Ampisilin dirençli kökenlerde *bla*_{TEM}, *bla*_{ROB}, *ftsI*, kinolon dirençli kökenlerde QRDR (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*) ve trimetoprim-sülfametoksazol dirençli kökenlerde *sul1*, *sul2* genleri PCR ile amplifiye edildi. *ftsI* geni ve QRDR genlerinin dizi analizi yapıldı.

Bulgular: Çalışma sonuçları COVID-19 pandemisi sırasında değişen hasta ve antibiyotik duyarlılık profilini temsil etmekteydi. Kökenlerin çoğu solunum yolu örneklerinden (%94.7), erkek cinsiyetten (%68.7) ve 18 yaş üzeri (%89.5) hastalardan izole edilmişti. MALDI-TOF MS ile dört, XV ile iki izolat tür düzeyinde yanlış tanımlandı. *H. influenzae*'ların 12'si (%24.4) serotip b olarak bulundu. İzolatların disk difüzyon testine göre %46.8'i ampisiline, %96.8'i amoksisilin klavulanata, %76'sı siprofloksasin, %77'si trimetoprim-sülfametoksazole duyarlı bulundu. Dokuz suşun nitrosefin hidrolizi pozitif olarak bulundu. PCR ile 12 kökende *bla*_{TEM} geni saptandı. *bla*_{ROB} geni, çalışılan hiçbir kökende saptanmadı. Beta laktam antibiyotiklere ana direnç mekanizması olarak *ftsI* gen mutasyonları gözlemlendi. Kinolon dirençli 23 kökenin hepsinde QRDR genlerinde mutasyon saptandı.

Trimetoprim-sülfametoksazol dirençli 25 kökenin 22'sinde *sul1+sul2*, birinde ise sadece *sul1* geni saptandı.

Sonuç: *Haemophilus* türlerinin tür düzeyinde doğru tanımlanmasının, antibiyotik direnç profillerinin bölgesel ve ulusal olarak takibi ve dirence yol açan mekanizmaların saptanmasının; tedavi protokollerinin ve direnç yayılımını önlemeye yönelik politikaların oluşturulmasında önemli rol oynayacağı sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: *Haemophilus spp.*, *bla*, *ftsI*, QRDR, *sul*



ABSTRACT

**DETERMINATION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE PROFILES AND
MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *HAEMOPHILUS* SPECIES
ISOLATED FROM CLINICAL SAMPLES**

Aim: *Haemophilus species*; It occurs in various infections, especially respiratory tract infections, and threatens public health with increasing antibiotic resistance. This study aimed to identify correctly *Haemophilus species* isolated from clinical specimens, determine the antibiotic resistance profile, and perform molecular characterization of beta-lactam, quinolone, and trimethoprim-sulfamethoxazole resistances.

Materials and Methods: *Haemophilus* strains isolated in Erciyes University Medical Faculty Central Laboratory Bacteriology Unit between June 2020 and December 2021 were included in the study. XV factor requirement, MALDI Biotyper ® sirius (Bruker, Germany), and *H. influenzae* Real-Time PCR Detection Kit (Bioeksan, Turkey) were used to identify the strains. *H. influenzae* type b was investigated by the slide agglutination method, and beta-lactamase production was determined with cefinase disc. Antibiotic susceptibility of strains determined by disc diffusion test, broth microdilution test/gradient strip test method. The genes of *bla*_{TEM}, *bla*_{ROB}, and *ftsI* in ampicillin-resistant isolates, QRDR (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*) in quinolone-resistant isolates, and *sul1*, *sul2* genes in trimethoprim-sulfamethoxazole resistant isolates were amplified by PCR. *ftsI* gene and QRDR genes were sequenced.

Results: Study results were representative of the changing patient and antibiotic susceptibility profile during the COVID-19 pandemic. Most patients were isolated from respiratory specimens (94.7%), male (68.7%) and over 18 (89.5%) years old. Four isolates with MALDI-TOF MS and two with XV were misidentified at the species level. Twelve (24.4%) *H. influenzae* were found to be serotype b. *Haemophilus* tested in the study according to the disk diffusion test results, 46.8% was susceptible to ampicillin, 96.8% to amoxicillin-clavulanate, 76% to ciprofloxacin, 77% to trimethoprim-sulfamethoxazole. Nine strains of nitrocefin hydrolysis were positive. The *bla*_{TEM} gene was detected in 12 strains by PCR. The *bla*_{ROB} gene was not detected in any of the studied strains. The main resistance

mechanism to beta-lactam antibiotics in these strains was *ftsI* gene mutations. Mutations in QRDR genes were detected in all 23 quinolone resistant strains. In 25 isolates resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole, 22 isolates harbored *sul1+sul2* together, and the *sul1* gene was found solely in one isolate.

Conclusion: Identifying the *Haemophilus* strains at the species level, monitoring antibiotic resistance profiles regionally and nationally, and determining the leading to resistance mechanisms; will play an essential role in developing treatment protocols and policies to prevent the spread of resistance.

Key words: *Haemophilus spp.*, *bla*, *ftsI*, QRDR, *sul*



1.GİRİŞ VE AMAÇ

Haemophilus cinsi *Pasteurellaceae* ailesi üyelerinden olup, küçük, hareketsiz, sporsuz, aside dirençli olmayan, pleomorfik, zor üreme özelliği gösteren, aerop/fakültatif anaerop, kokobasil/kısa basil şeklinde Gram negatif bakterilerdir (1–3). *Haemophilus* cinsi içerisinde *H. influenzae*, *H. haemolyticus*, *H. aegyptius*, *H. parainfluenzae*, *H. parahaemolyticus*, *H. paraphrohaemolyticus*, *H. pittmaniae*, *H. sputorum* ve *H. ducreyi* olmak üzere, insanları kolonize ve enfekte eden dokuz tür yer almaktadır. (4–6).

Haemophilus türleri; solunum yolu enfeksiyonları başta olmak üzere menenjit, otitis media, epiglotit, bronşit, KOAH alevlenmesi, pnömoni ve ampiyem, selülit, sinüzit, septik artrit, ürogenital, neonatal ve maternal enfeksiyonlar, konjonktivit, bakteriyemi gibi çok çeşitli spektrumda invaziv ve lokal hastalığa neden olmaktadır (7).

H. influenzae'da β -laktamaz aracılı ampisilin direnci ilk olarak 1970'lerin başında saptanmış ve 1975'te TEM tipi β -laktamaz, 1981 yılında ROB-1 tipi β -laktamazın varlığı bildirilmiştir. *H. influezae* tip b BLNAR suşuna bağlı menenjit ilk olarak 1980'de rapor edilmiştir. Kinolon direnci ilk olarak 1993'te, kinolon direncine neden olan bazı spesifik mutasyonlar ise 1996'da tanımlanmıştır ve antibiyotik direnci yıllar içerisinde artmaktadır (8–11).

Bu çalışmada, klinik örneklerden izole edilen *Haemophilus* türlerinin doğru tanımlanması, antibiyotik direnç profilinin saptanması, beta laktam, kinolon ve trimetoprim-sülfametoksazol dirençlerinin moleküler karakterizasyonunun yapılması

amaçlandı. Bu sonuçların, tedavi protokollerinin ve direnç yayılımını önlemeye yönelik politikaların oluşturulmasında önemli rol oynayacağı düşünüldü.



2.GENEL BİLGİLER

2.1. *Haemophilus spp.*

2.1.1. Tarihçe

Haemophilus influenzae ilk olarak 1889-1890 grip pandemisi sırasında tanımlanmıştır. Pandemi sırasında gribin etkenini belirlemek için araştırmalar yapılmıştır. 1892 yılında, Richard Friedrich Johannes Pfeiffer, Pfeiffer basili ya da *Bacillus influenzae* olarak bilinen *Haemophilus influenzae*'yı bir hastanın burun mukusunda izole ettiğini açıklamıştır (12,13). Pfeiffer'in keşfini takip eden yıllarda grip vakalarından basil izole edilmeye devam edilmiş ama diğer hastalıklardan ve normal boğazlardan da izole edildiği bildirilmiştir. Bu bulgular Pfeiffer basilinin grip hastalığı açısından sekonder bir patojen olduğunu düşündürmüştür (12). *H. influenzae*'nın tarihçesindeki önemli olaylar Tablo 1'de yer almaktadır.

Tablo 1. *Haemophilus influenzae*'nın tarihçesi (5,14)

Tarih	Önemli Olaylar
1893	Pfeiffer, grip basilinin keşfini yayınladı.
1917	<i>Haemophilus</i> cinsi, <i>H. influenzae</i> türüyle oluşturuldu.
1921	Thjötta ve Avery, kanda bulunan iki ayrı üreme faktörünü tanımladı.
1931	Margaret Pittman, <i>H. influenzae</i> 'nin kapsülünü ve <i>H. influenzae</i> tip b ile menenjit ilişkisini tanımladı.
1935	Grip virüsü keşfedildi.
1980'ler	<i>H. influenzae</i> serotip b (Hib) aşısı dünyanın birçok yerinde uygulanmaya başlandı.
1995	<i>H. influenzae</i> , genom dizilimi yapılan ilk serbest yaşayan organizma oldu.
2006	Hib aşısı Türkiye'de aşı takvimine girdi.

2.1.2. Sınıflandırma

Haemophilus spp.; *Proteobacteria*'nın gama bölümünde, *Pasteurellales* takımında, *Pasteurellaceae* ailesi üyelerindendir (2,3). *Haemophilus* cinsi içerisinde insanları kolonize ve enfekte eden dokuz tür yer almakta ve bu türler beslenme gereksinimlerine göre üç gruba ayrılmaktadır. *H. influenzae* grup içerisinde *H. influenzae*, *H. haemolyticus*, *H. aegyptius*; *H. parainfluenzae* grup içerisinde *H. parainfluenzae*, *H. parahaemolyticus*, *H. paraphrohaemolyticus*, *H. pittmaniae*, *H. sputorum* bulunmakta ve *H. ducreyi* ayrı bir grup olarak yer almaktadır (4–6). *H. haemolyticus* ve *H. parahaemolyticus*, sırasıyla *H. influenzae* ve *H. parainfluenzae*'nin hemolitik varyantlarıdır (15). Sırasıyla *H. parahaemolyticus*, *H. influenzae* ve *H. haemolyticus* ile yakından ilişkili olan *H. paraphrohaemolyticus*, *H. aegyptius* ve *H. quentini*'nin ayrı türler olarak sınıflandırılması tartışılmaktadır (4). *H. quentini*, kriptik genotür biyotip IV olarak da adlandırılmaktadır (5).

Haemophilus aphrophilus ve *Haemophilus paraphrophilus*, *Aggregatibacter aphrophilus* adıyla tek bir tür olarak birleştirilmiştir. Aynı şekilde *Haemophilus segnis* artık *Aggregatibacter* cinsinin bir üyesidir (1,15).

Ayrıca, *Haemophilus* cinsi HACEK (*Haemophilus spp.*, *Aggregatibacter spp.*, *Cardiobacterium spp.*, *Eikenella spp.*, *Kingella spp.*) olarak adlandırılan, yavaş üreyen bakteriler grubundadır (16,17).

2.1.3. Mikrobiyolojik Özellikleri

Haemophilus cinsinin üyeleri küçük, hareketsiz, sporsuz, aside dirençli olmayan, pleomorfik, zor üreme özelliği gösteren, aerop/fakültatif anaerop, kokobasil/kısa basil şeklinde Gram negatif bakterilerdir (1). Genellikle oksidaz ve katalaz pozitif, nitratları nitritlere indirger, alkalin fosfataz üretir (18). Tüm türlerin CAMP reaksiyonu negatiftir. Bazı *H. influenzae* ve *H. aegyptius* türlerinin hücre duvarlarında fimbria gözlenmiştir *Haemophilus spp.* genomu %37-45 Guanin+Sitozin içermektedir. (1).

Akut enfeksiyonlardan alınan örneklerde, mikroorganizmalar kısa (1,5 µm) kokobasiller halinde bulunurlar. Kültürlerde morfoloji, inkübasyon süresi ve ortama bağlı olarak değişmektedir. Zenginleştirilmiş besiyerlerinde 6-8 saatte küçük

kokobasil formları baskınken, sonra daha uzun basiller ve çok pleomorfik formlar gözlenmektedir (15).

Haemophilus türleri basit besiyerlerinde üremez (18). Besiyerinde üremek için X ve/veya V faktörlerine gereksinim duymaktadırlar. X faktörü, hemin biyosentetik yolundaki bir metabolik ara madde olan protoporfirin IX; V faktörü ise, NAD veya NADP olarak kompleks halde nikotinamidden oluşmaktadır (1). Bu faktörlerin eritrositler tarafından sağlanması nedeniyle *Haemophilus* (kan seven) adını almıştır (7). *Haemophilus* türleri tipik olarak çikolata agarda ürer (1). Koloniler, 24 saatlik inkübasyon sonrası 0.5-2.0 mm çapında, düz veya konveks şekilli, yarı saydam, pigmentsiz veya rengi hafif sarıdır (1,7). Koyun kanlı agarda ise Stafilokok kolonileri (“uydu/sütanne fenomeni”) olmadan üreyemezler (15). Kanlı agarda üreme olduğu zaman bazı türler beta hemoliz yapabilir. Optimal üremeleri %5-7 CO₂ varlığında 35-37°C’de gerçekleşmektedir (1).

Haemophilus cinsindeki organizmaların tür tanımlamasında; çeşitli biyokimyasal substratların fermentasyonu, biyokimyasal testler, kan içeren besiyerlerinde beta hemoliz oluşturmaları ve faktör gereksinimleri kullanılmaktadır (1).

H. influenzae suşları, altı farklı kapsüller polisakkaritten birini üretebilir veya kapsüllenmemiş olabilir. Kapsül polisakkarit antijenine göre serotip a-f olarak sınıflandırılmakta; kapsülsüz suşlar ise, tiplendirilemeyen *H. influenzae* (NTHi) olarak adlandırılmaktadır (1,15). *Haemophilus influenzae* tip b’nin kapsüler antijeni; riboz, ribitol (beş karbonlu bir şeker alkolü) ve fosfodiester bağlarıyla bağlı fosfat içeren lineer bir teikoik asitten oluşan poliribozil ribitol fosfattır (PRP) (2,15).

H. influenzae ve *H. parainfluenzae* indol, ornitin dekarboksilaz ve üreaz testleri ile 8 biyotipe ayrılmaktadır (15).

2.1.4. Biyokimyasal Özellikleri

Haemophilus cinsine fenotipik özellikler Tablo 2’de, *Haemophilus* türlerinin tanımlanmasında kullanılan fenotipik özellikler Tablo 3’te yer almaktadır.

Tablo 2. *Haemophilus* türlerinin fenotipik özellikleri (2)

Özellik		Asit Üretimi	
Koyun kanlı agarda hemoliz	D	Glukoz	+
Katalaz	D	Maltoz	D
Oksidaz	D	Fruktoz	D
Aminolevulinik asit porfirin testi	D	Sükroz	D
X faktör gereksinimi	D	Laktoz	-
V faktör gereksinimi	+	Ksiloz	D
İndol	D	Arabinoz	-
Üreaz	D	Myoinositol	-
Asetoin (VP)	-	Mannitol	-
Hareket	-	Mannoz	D
Ornitin dekarboksilaz	D	Melibiyoz	-
NO ₃ RED	+	Sorbitol	-
ONPG	-	Trehaloz	-

+, pozitif reaksiyon; -, negatif reaksiyon; D, değişken reaksiyon; NO₃ RED, nitratın nitrite indirgenmesi; ONPG, o-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid.

Tablo 3. *Haemophilus* türlerinin tanımlanmasında kullanılan fenotipik özellikler (5)

<i>Haemophilus</i> türü	Özellik								Asit üretimi			IgA1 proteaz
	X faktör gereksinimi	V faktör gereksinimi	Katalaz	Hemoliz	β-Galaktozidaz	Triptofanaz	Üreaz	ODK	Sükroz	Mannoz	Laktoz	
<i>H. influenzae</i>	+	+	+	-	-	D	D	D	-	-	-	+
<i>H. aegyptius</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+	+	-	D	+	-	-	-	-	-
<i>H. parainfluenzae</i>	-	+	D	D	D	D	D	D	+	+	-	-
<i>H. parahaemolyticus</i>	-	+	D	+	-	-	+	-	+	-	-	+
<i>H. paraphrohaemolyticus</i>	-	+	D	+	+	-	+	-	+	-	-	-
<i>H. sputorum</i>	-	+	D	+	+	-	+	-	+	-	-	-
<i>H. pittmaniae</i>	-	+	D	+	+	-	-	-	+	+	-	-
<i>H. ducreyi</i>	+	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-

+, pozitif; -, negatif; D, değişken; ODK, ornitin dekarboksilaz; IgA1, immunglobulin A1.

2.2. *Haemophilus spp.* Enfeksiyonları

2.2.1. Epidemiyoloji

H. influenzae'nin bulaşı insandan insana olmaktadır; başka bir doğal konak bilinmemektedir. Bulaş; çoğunlukla üst solunum yolu ile, nadiren de genital sistem yolu ile olmaktadır. Yayılma, havadaki damlacıklar veya salgılarla doğrudan temas yoluyla gerçekleşmektedir (7). Ayrıca, anneden bulaşma ile neonatal enfeksiyon gelişebilmektedir (16). Enfeksiyon görülme sıklığı mevsimlere göre değişkenlik göstermekte, en sık Eylül-Aralık ve Mart-Mayıs aylarında görülmektedir (16).

İnvaziv *H. influenzae* tip b (Hib) enfeksiyonlarının inkübasyon süresi bilinmemektedir, mikroorganizmalarla nispeten uzamış asemptomatik kolonizasyon invaziv enfeksiyon gelişimi açısından önemlidir (18). Hib suşları ile üst solunum yollarının asemptomatik kolonizasyonu nadirdir. Buna karşılık, NTHi ve *H. parainfluenzae* suşları, sağlıklı bireylerin >%90'ında farenks ve nazofarinksin kültürlenebilen bakteriyel mikrobiyotanın büyük bir bölümünü oluşturur (1).

NTHi maruziyeti doğumdan sonra başlar ve suşlar sık olarak solunum yollarından alınıp temizlenir. Yaşamın ilk iki yılında özellikle kreşe giden çocuklarda farklı suşlarla tekrarlayan kolonizasyon olmaktadır. Özellikle ilk yılda nazofaringeal kolonizasyon, tekrarlayan otitis media riskinin artmasıyla ilişkilidir (7). Asemptomatik kolonizasyonda klonlar, ortalama bir iki aylık taşıma süresi ile sürekli olarak değişmekte; ancak enfeksiyon sırasında tek bir klonal grup baskın bulunmaktadır (1). Hib ve NTHi suşlarının özellikleri karşılaştırmalı olarak Tablo 4'te verilmiştir.

Tablo 4. *H. influenzae* tip b (Hib) ve tiplendirilemeyen *H. influenzae* (NTHi) özelliklerinin karşılaştırılması (7)

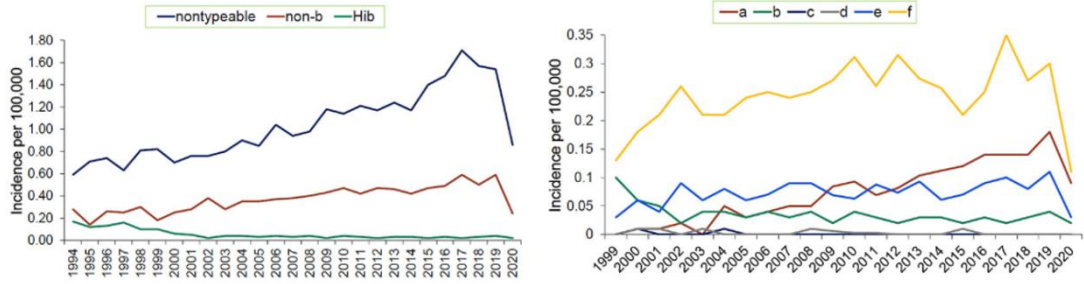
Özellik	NTHi	Hib
Üst solunum yollarında kolonizasyon oranı	%30-80	Aşıllı popülasyonlarda <%1; Aşılanmamış popülasyonlarda %2-4
Kapsül	Kapsülsüz	PRP kapsül
Hastalık	Lokal enfeksiyonlar	İnvaziv enfeksiyonlar
Evrimsel süreç	Genetik olarak çeşitli	Klonal
Aşı	Yok	PRP konjuge aşıları

PRP, Poliribozil ribitol fosfat.

Diğer *Haemophilus* türleri de insanlarda mukoza mikrobiyotasının bir parçası olarak bulunabilir. Ağız boşluğunda palatal arkların üstünde *H. parainfluenzae* ve *H. pittmaniae* kolonizasyonu saptanabilir. Sağlıklı bireylerde *H. parahaemolyticus* ve *H. haemolyticus* kolonizasyonu nadirdir, ancak *H. haemolyticus* subgingival dental plaklardan izole edilmiştir. Cinsel ilişki sonrasında serviksin *H. ducreyi* ile kolonizasyonu gösterilmiştir (1).

H. influenzae, konjuge aşıların kullanıma sunulduğu 1990'ların başına kadar beş aylıktan beş yaşına kadar olan çocuklarda bakteriyel menenjitin en yaygın nedeniyken Hib aşısının yaygın kullanımı ile çocuklarda Hib menenjit insidansı %95'ten fazla azalmıştır. Aşı, Hib için taşıyıcılık oranlarını da azaltmaktadır (15). 2021 yılında Hacettepe Üniversitesi'nde yapılan bir tez çalışmasında 252 *H. influenzae* suşu moleküler olarak serotiplendirilmiştir. Kökenlerin Hia, Hib, Hic, Hid, Hie, Hif ve NTHi oranları sırasıyla; %3.1, %6.7, %1.5, %1.1, %15.0, %4.7 ve %67 olarak bulunmuş, en fazla NTHi suşları saptanırken onu *H. influenzae* tip e suşları takip etmiştir (19). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC) verilerine göre ABD'de *H. influenzae*'nin neden olduğu invaziv enfeksiyonlar en fazla 1 yaş altı ve 65 yaş üstü hastalarda görülmektedir. 1990'lı yıllardan itibaren en fazla NTHi suşlarının saptandığı, bunu Hib dışı suşların takip ettiği belirtilmektedir. Kapsüllü

suşlar arasında ise; en fazla tip f'nin görüldüğü, bunu tip a ve tip e suşların takip ettiği bildirilmektedir (20). Bu veriler Şekil 1'de yer almaktadır.



Şekil 1. CDC verilerine göre invaziv enfeksiyonlarda *H. influenzae* ve serotiplerinin yıllar içindeki insidansı

2.2.2. Patogenez

Enfeksiyonun patogeneziindeki ilk adım, üst solunum yollarının kolonizasyonudur (7). Nazofaringeal kolonizasyonu bulunan konakta, bakterilerin kan dolaşımına ve menisklere ulaşması ile menenjit oluşmaktadır. Menenjit, sinüslerden veya orta kulaktaki bir enfeksiyon odağından da kaynaklanabilmektedir (2).

NTHi suşları mukozal yüzeylerin lokal invazyonu ile hastalığa neden olmaktadır. KOAH'lı yetişkinlerin alt solunum yolları, NTHi ile kronik olarak kolonize haldedir. Aralıklı alevlenmeler; yeni bir NTHi suşunun kazanılması, suşun virülansı, konağın bağışıklığı, akciğer fonksiyonunun bozulma derecesi, konakçı inflamatuvar yanıtı gibi konak-patojen etkileşimi sonucu meydana gelmektedir. Otitis media, bakterilerin östaki borusu yoluyla nazofarinksten orta kulağa doğrudan ulaşması ile oluşmaktadır (7). Solunum salgıları yoluyla, genellikle hastaların ellerine yayılan NTHi, konjonktival enfeksiyona da yol açabilir. Viral enfeksiyonlar da, östaki tüplerinin ve sinüs ostiumlarının kapanmasına yol açarak hastaları sırasıyla orta kulak boşluğu ve maksiller sinüslerin enfeksiyonuna yatkın hale getirmektedir (1).

H. influenzae'nin virulans faktörleri Tablo 5'te verilmiştir. Diğer virülans faktörleri arasında, bakteriosin (hemosin) ve histamin üretimi yer almaktadır (18). Ayrıca, *H. influenzae* ekzotoksin üretmez (15).

Tablo 5. *H. influenzae*'nin virölans faktörleri (7,16,18,21,22)

Virölans faktörü	Özellik
Kapsül	En önemli virölans faktörüdür. Bakteriye opsonizasyon ve fagositozdan korur.
Endotoksin	Solunum yolundaki silli epitel hücreleri için toksiktir.
IgA1 proteaz	Hem serbest IgA1 hem de antijene bağlı IgA1'i parçalar.
Hemoglobin/demir bağlayıcı proteinler	İnsan transferrininden direkt olarak hemini bağlar.
Biyofilm	Kolonizasyonu artırır, enfeksiyonun kronikleşmesini sağlar.
Adezinler	
Hemaglutine edici pili	<i>hif</i> A-E gen bölgesinde yapımı kontrol edilir.
Tip 4 pilus	<i>pilABCD</i> gen kümesi; motilitede rol oynar.
HMW1 ve HMW2	<i>Bordetella pertussis</i> 'in filamentöz hemaglutinini ile homolog. NTHi'lerin %53-75'inde bulunur.
Hap	IgA proteaz ile homolog, mikrokoloni oluşumu. IgA proteaz ile dizi benzerliğine rağmen, Hap, insan IgA1'ini parçalayamaz.
Hia	HMW1, HMW2 eksprese eden suşlarda Hia yoktur. NTHi suşlarında bulunur.
Hsf	Yüzey fibrilleri. Hib suşlarında bulunur. Hia ile homolog.
OMP P5	Müsine bağlanır, fimbrin olarak da adlandırılır; <i>E. coli</i> 'deki OMP A ile homolog
OMP P2	Müsine bağlanır.
OMP P6	Diğer dış zar proteinlerine göre genetik çeşitliliği düşük.
PE bağlayıcı adezin	Fosfatidil etanolamine bağlanır.
Protein E	Miyelom IgD ve tip 2 alveolar hücrelerine bağlanır.
Lipooligosakkarit (LOS)	Solunum yolu epiteline bağlanır.

IgA1, İmmünglobulin A1; OMP, dış membran proteini.

Konak savunmasında; alternatif ve klasik kompleman yollarının aktivasyonu, Hib'in PRP kapsülüne karşı oluşan antikorlar, Hib lipooligosakkaritlere ve dış zar proteinlerine karşı oluşan antikorlar önemli olmaktadır (1,16). Hib kapsülüne karşı oluşan antikor, bağışıklık kazanmada primer rol oynamaktadır (1). Serum anti-PRP antikorları, in vitro kompleman aracılı bakterisidal ve opsonik aktiviteyi aktive etmekte ve sistemik enfeksiyonlara karşı koruyuculuğu sağlamaktadır (7). NTHi kökenleri ile oluşan KOAH atakları gibi enfeksiyonlarda dış zar proteinleri olan P2 ve P5'e karşı oluşan antikor tekrarlayan enfeksiyonlara karşı koruyucu olmaktadır (16).

Yenidoğanlarda, maternal antikorların varlığı nedeniyle düşük enfeksiyon riski bulunmaktadır. Yaklaşık 2 aylıkken, maternal antikorlar azalmaya başladığında, bebekler invaziv *H. influenzae* hastalığı açısından yüksek risk altında olurlar. Bebekler, doğal enfeksiyon geçirse bile anti-PRP immün yanıtı azdır. Bu nedenle, bebekler tekrarlayan enfeksiyonlar için risk altındadır. 5 yaşına kadar, çoğu çocuk doğal olarak antikorları kazanmış olur (1).

2.2.3. *H. influenzae* için Risk Faktörleri

H. influenzae enfeksiyonu geçirmek için risk faktörleri şunlardır (20):

- 5 yaşından küçük çocuklar ve 65 yaşından büyük yetişkinler
- Amerikan Kızılderilileri, Alaska Yerlileri
- Orak hücre hastalığı
- Aspleni
- HIV enfeksiyonu
- Antikor ve kompleman eksikliği sendromları
- Kemoterapi, radyasyon tedavisi veya kemik iliği kök hücre nakli ile tedavi gerektiren kanser

2.2.4. Klinik

H. influenzae tip b sıklıkla invaziv enfeksiyonlara, tiplenemeyen *H. influenzae* kökenleri ise sıklıkla lokal enfeksiyonlara neden olmaktadır (7). Bununla birlikte; Hib, NTHi'den çok daha az sıklıkta olsa da kronik bronşit, otitis media, sinüzit ve konjonktivite neden olabilir. Benzer şekilde, NTHi nadiren invaziv hastalığa neden

olabilir (vakaların ~%5'i) (15). Bunların dışında nadiren; abdominal enfeksiyonlardan (peritonit, pankreatik ve pelvik apseler, apandisit) ve hepatobiliyer sistem enfeksiyonlarından (kolesistit, piyogenik karaciğer apsesi) izole edilmiştir (2). Hib ve NTHi suşlarının daha sık etken olduğu enfeksiyonlar Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. *H. influenzae*'nin neden olduğu enfeksiyonlar (7)

Hib	NTHi
Menenjit	Otitis media
Epiglotit	Bronşit, KOAH alevlenmesi
Pnömoni ve Ampiyem	Toplum kökenli pnömoni
Selülit	Sinüzit
Septik artrit	Ürogenital, neonatal ve maternal enfeksiyonlar
	Konjonktivit
	Bakteriyemi

2.2.4.1. *Haemophilus influenzae* tip b'nin Neden Olduğu Enfeksiyonlar

Menenjit

Menenjit, *H. influenzae*'nin neden olduğu sistemik hastalıklar arasında en ciddi olanıdır (7). Aşı öncesi dönemde bir ay-iki yaş arası çocuklarda bakteriyel menenjitin en sık nedeni olup, en yüksek insidans 6-12 aylar arasında görülmekteydi. 2-6 yaş arası *Neisseria meningitidis* ile eşit sıklıkta oluşmakta ve 6 yaş üstünde yaygın görülmemekteydi. Bu suşların %90'ından fazlası serotip b'ye aitti.

Bugün için en çok, aşısız kişiler veya primer immünizasyonunu tamamlamamış küçük bebeklerde ortaya çıkar (2). Yetişkin vakalar nadirdir; sıklıkla kafa travması, geçirilmiş beyin cerrahisi, paranazal sinüzit, otit veya BOS sızıntısı öyküsü bulunmaktadır (7).

Klinik tablo ile diğer pürülan menenjit formlarından ayrılamaz (7). Bulgu ve semptomlar genelde sinsi başlangıç gösterir. Çocuklarda ateş, halsizlik, bazen kusma mevcut olup ense sertliği sıklıkla bulunmaz. Bazen periferik ve/veya kraniyal sinir felci ve nöbetler gelişebilir (2).

Uygun tedaviyle, *H. influenzae* menenjitinden kaynaklanan genel ölüm oranı %5'ten azdır, ancak hayatta kalanların çoğunda kalıcı sekeller meydana gelir (7). Komplikasyonlar nadir olmakla birlikte; beyin ve beyin sapı apseleri, subdural efüzyon, perikardit, septik artrit, hematogen yayılım nedeniyle diğer vücut bölgelerinde lokalize enfeksiyonlar görülebilir (2).

Epiglotit

Epiglotit; supraglottik dokuların selülitinin neden olduğu akut solunum yolu obstrüksiyonu gözlenen bir hastalıktır. Genellikle 2-7 yaş arası çocuklarda görülmektedir. Klinik; boğaz ağrısı, ateş ve hızla disfajiye ilerleyen dispne, oral sekresyonların birikmesi ve ağızdan salyanın akması şeklinde görülmektedir. Genellikle birkaç saat içinde ani kötüleşme meydana gelir ve yeterli tedavinin yokluğunda ölümle sonuçlanır (7).

Pnömoni ve Ampiyem

H. influenzae pnömonisi; 4 ay ile 4 yaş arası hastalarda, kış veya ilkbaharda görülen ve hastaneye yatmayı gerektirecek kadar şiddetli konsolidatif pnömoni (genellikle plevral tutulumlu) ile kendini gösterir. Diğer bakteriyel pnömonilerden klinik olarak farkı daha sinsi başlangıç göstermesidir. Şiddetli dispne gelişimi, taşikardi ve kardiyovasküler yetmezlik, nadir fakat önemli bir komplikasyon olan perikarditi düşündürür (7).

Selülit

Selülit daha çok küçük çocuklarda görülmektedir. Ateşle birlikte, çoğunlukla bir yanakta veya periorbital bölgede gözlenir. Birkaç saat içinde hızla ilerler (7). Genellikle etmoid sinüzitin bir komplikasyonudur (16). Eşlik eden bakteriyemi yaygın olduğundan, menenjit gibi başka bir septik odak kanıtı vardır veya daha sonrasında gelişebilmektedir (7).

Lokalize Hastalık Olmadan Bakteriyemi

Özellikle 6-36 aylık çocuklarda, lokal hastalık bulgusu olmadan bakteriyemi görülebilir. *S. pneumoniae* bu sendromun en sık nedenidir. Ateş, iştahsızlık ve letarji gözlenir. Erken tanı ve tedavi önemlidir çünkü bu hastalar hızla kötüleşebilir ve septik şok veya lokalize pürülan odak gelişebilir (7).

Septik artrit

Genellikle 2 yaşından küçük çocuklarda, hareket kabiliyetinde azalma, harekette ağrı ve şişlik gösteren, ağırlık taşıyan (osteomyelitsiz) tek bir büyük eklem tutulumu ile gözlenmektedir. Kan ve eklem sıvısı kültürleri pozitif bulunabilir (7).

2.2.4.2. NTHi'nin Neden Olduğu Enfeksiyonlar

Otitis media

NTHi, tüm akut otitis media vakalarının %25-35'ini oluşturur. Her yaşta ortaya çıksa da, en sık 6 ay-5 yaş arasındaki çocuklarda görülmektedir (7). Küçük çocuklardaki yüksek insidans, üstaki borusunun koruyucu mekanizmalarının yeterince gelişmemiş olmasından kaynaklanmaktadır (2). Genellikle viral solunum yolu enfeksiyonu sonrası; bebeklerde ateş ve irritabilite, daha büyük çocuklarda kulak ağrısı olmaktadır (7).

NTHi'nin sebep olduğu otitis mediada *S. pneumoniae*'ya göre; ateş, otore daha az görülmektedir. Tekrarlayan epizod, tedavi başarısızlığı, eşlik eden konjonktivit, amoksisilin tedavisi alma öyküsü, bilateral otitis media, antibiyotik tedavisi tamamlandıktan sonraki iki hafta içerisinde akut otitis media daha fazla olmaktadır (7).

Komplikasyonlar; tekrarlayan otitis media, drenaj tüpü gerektiren orta kulak efüzyonu, işitme kaybı, mastoidit, menenjit, kronik otitis media, beyin apsesi ve sepsisi içerir (2).

KOAH Alevlenmesi

KOAH'ın seyri, hastalığın aralıklı alevlenmeleri ile karakterizedir. Alevlenmelerin yaklaşık yarısının bakterilerden kaynaklandığı ve NTHi'nin en yaygın bakteriyel neden olduğu tahmin edilmektedir. Bir alevlenmenin üç ana belirtisi; balgam üretiminde artış, balgam pürülansı (balgam renginde değişiklik) ve dispnedir. Ateş genellikle yoktur ve akciğer grafisinde infiltrasyon yoktur (7).

Toplum Kökenli Pnömoni

NTHi; özellikle yaşlı erişkinlerde ve KOAH'lı, edinilmiş immün yetmezlik sendromu olanlarda önemli bir pnömoni nedenidir. Klinik özellikler genellikle birkaç gün süren

ateş, öksürük ve pürülan balgamı içerir. Akciğer grafisinde lobar infiltrasyonlar gözlenir (7).

Gelişmekte Olan Ülkelerde Çocuklarda Akut Solunum Yolu Enfeksiyonları

Olumsuz sosyoekonomik koşulların yaygın olduğu birçok ülkede, bebeklerde NTHi kaynaklı akut pnömoni, önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir (7).

Sinüzit

NTHi, akut maksiller sinüzitin yaygın bir nedeni olarak görülmektedir. Kliniğinde burun tıkanıklığı, pürülan burun akıntısı, baş ağrısı ve yüz ağrısı görülmektedir (7). Yüzde hassasiyet, ödem veya periorbital solgunluk; enfeksiyonun sinüslerden orbitanın yumuşak dokularına yayılımına işaret edebilir. Tanı genellikle görüntüleme teknikleri ve klinik değerlendirme ile konmaktadır. Sfenoid ve etmoid sinüslerden doğrudan yayılım ile epidural apse gibi ciddi intrakraniyal enfeksiyonlar ortaya çıkabilir (2).

Ürogenital, Neonatal ve Maternal Enfeksiyonlar

Haemophilus türleri, özellikle NTHi ve *H. parainfluenzae*, nadiren; üretrit, kadın genital yol enfeksiyonları, vulvovajinit, obstetrik ve jinekolojik enfeksiyonlar, postpartum bakteriyemi, septik abortus, tubo-ovaryan apse, intrauterin fetal ölüm ve neonatal sepsise yol açabilir. NTHi biyotip IV, biyotip I ve II *H. parainfluenzae*'nın genital kanalda bulunan organizmalar olduğu ve genital sistem enfeksiyonları, postpartum maternal ve neonatal sistemik enfeksiyonlarla ilişkili olabileceği gösterilmiştir (2).

Bakteriyemi ve İnvaziv Enfeksiyonlar

Hib aşılarının kullanıldığı ülkelerde invaziv *H. influenzae* enfeksiyonlarının çoğu NTHi'lerden kaynaklanmaktadır. Bu enfeksiyonlar erişkinlerde epiglotit, ampiyem, septik artrit, selülit, osteomyelit, perikardit, kolesistit, karın içi enfeksiyon ve vasküler greft enfeksiyonunu içermektedir. İnsidans genelde yaşlı erişkinlerde en yüksektir. Bakteriyemide solunum yolları enfeksiyon kaynağıdır ve hastalarının çoğunda alkolizm, kardiyopulmoner hastalık, HIV enfeksiyonu veya kanser gibi altta yatan nedenler vardır (7).

Göz Enfeksiyonları

H. influenzae; konjonktivit, sklerit, subkonjonktival apse ve endoftalmite neden olabilmektedir (2). NTHi, çocuklarda konjonktivitin en yaygın bakteriyel nedenidir. Konjonktival hiperemi ve pürülan akıntıyı gözlenir. Akut konjonktivit salgını şeklinde görülebilir (18).

2.2.4.3. Diğer *Haemophilus* Türlerinin Neden Olduğu Enfeksiyonlar

***H. parainfluenzae*:** insan ağız boşluğu ve farinks florasının yaklaşık %75'ini oluşturan baskın türdür (1,7). Burun boşluğunu kolonize etmez (1). Bazı akut otitis media, akut sinüzit ve kronik bronşitin akut bakteriyel alevlenmesi vakalarından sorumlu olduğu düşünülmektedir (1). Nadiren enfektif endokardit ve üretrit etkeni olabilir (15).

HACEK Grubu: *Haemophilus* türleri, özellikle *H. parainfluenzae* ve *Haemophilus*'tan *Aggregatibacter*'e taşınan *A. aphrophilus* giderek artan bir şekilde enfektif endokarditin bir nedeni olarak kabul edilmekte ve endokardit vakalarının %5'ine neden olmaktadır. Güçlü klinik endokardit şüphesi olan ve kan kültürü negatif olan hastalarda *Haemophilus* türlerinin (ve HACEK grubundaki diğerlerinin) varlığından şüphelenilmelidir. Hastaların çoğunda altta yatan kalp kapak hastalığı vardır. Hastalığın klinik seyri subakut olma eğilimindedir ve embolizasyon yaygındır (7).

***H. haemolyticus*:** İn vitro olarak en belirgin hemoliz yapan *Haemophilus* türüdür. Normal nazofarinkste bulunabilir, nadiren çocuklukta üst solunum yolu enfeksiyonları ile birlikte ortaya çıkar (15). Yapılan çalışmalarda bakteriyemi, septik artrit veya peritonit gibi invaziv hastalıklarda fenotipik yöntemlerle *H. influenzae* olarak yanlış karakterize edildiği gösterilmiştir. Bu yüzden NTHi suşlarının tanımlanmasında moleküler teknikler önemli olmaktadır (1).

***H. ducreyi*:** Maruziyetten 2-7 gün sonra ortaya çıkan, genellikle tek bir genital ülser ve inguinal lenfadenit ile karakterize cinsel yolla bulaşan bir enfeksiyon olan şankroidin (yumuşak şankr) etkenidir (1,7). Şankroid; şişlik, hassasiyet ile düzensiz bir ülserden oluşur. Bölgesel lenf düğümleri büyümüş ve ağrılıdır (15). Tek kaynağı insandır (7). Enfeksiyondan sonra kalıcı bir bağışıklık oluşmaz. Hastalığın sifiliz,

Herpes simpleks enfeksiyonu ve lenfogranüloma venereum ile ayırıcı tanısı yapılmalıdır (15).

H. aegyptius: *H. influenzae*'nin biyotip III suşlarına çok benzeyen ve Koch-Weeks basili olarak adlandırılan *H. aegyptius*, akut pürülan konjonktivitın önemli bir nedenidir. Genellikle pembe göz olarak adlandırılan bu hastalık, daha çok küçük çocuklarda, özellikle gündüz bakım merkezleri ve ilkokul sınıfları gibi kapalı ortamlarda diğerk çocuklarla yoğun teması olanlarda görölmektedir. Konjonktival inflamasyonun hızlı başlangıcı, görme bozukluğu, oküler ağrı ve kaşıntı ile karakterizedir. Genellikle her iki gözü de tutar ve oldukça bulaşıcıdır (1).

1984 yılında, bir Brezilya kasabasında bir pürülan konjonktivit atağının ardından çocuklarda yüksek ateş, kusma ve karın ağrısı ile giden fulminan sistemik bir hastalık tanımlandı. Bu semptomları peteşi, purpura, periferik nekroz ve vasküler kollaps izledi. Kan kültürlerinde tanımlanan mikroorganizma *H. influenzae biogroup aegyptius* olarak tanımlandı. Hastalığa Brezilya purpurik ateşi adı verildi. Hastalığın en yüksek insidansı 1-4 yaştır. Kapsülsüz olmasına rağmen fulminan invaziv bir hastalığa neden olmasından dolayı önemli bir mikroorganizmadır (7).

H. sputorum: *H. paraphrohaemolyticus* ile yakından ilişkili bir tür olup, kistik fibrozis hastalarının alınan balgamdan, kandan ve periodontal eksudadan izole edilmiştir. Bir erkek hastada üretritten sorumlu bulunmuştur (1,23).

H. pittmaniae: Sağlıklı oral mikrobiyotanın bir parçasını oluşturmaktadır. Hastalardan çeşitli vücut sıvılarında izole edilmiştir. Ancak birkaç klinik vaka bildirilmiştir. Son dönem fibrotik siderozisi olan ve akciğer transplantasyonu adayı olan bir hastada solunum yolu enfeksiyonundan ve bir erkek hastada üretritten sorumlu bulunmuştur (5,23,24).

H. parahaemolyticus: Sıklıkla akut farenjit ve bazen de subakut endokardit ile ilişkili bulunan bir türdür. Farenjitli hastalarda kültürlenebilen mikrobiyotasının baskın bir üyesi olarak gözlenirken, sağlıklı çocuk ve ergenlerde ağız boşluğunda ve farinkste hemen hemen hiç bulunmamıştır. IgA1 proteaz eksprese ettiği için potansiyel bir patojen olarak kabul edilmiştir (5).

H. paraphrohaemolyticus: Klinik örneklerde son derece nadir görülür ve kolayca tanımlanamaz (5).

2.3. Laboratuvar Tanısı

2.3.1. Klinik Örneklerin Toplanması, Taşınması ve Saklanması

Klinik örneklerden *Haemophilus* türlerinin optimum izolasyonu; örneklerin uygun bir şekilde toplanması, taşınması, uygun besiyeri ve inkübasyon ortamının kullanılmasına bağlıdır. Bakterilerin hassas yapısı nedeniyle örnekler kurumaya ve aşırı sıcaklıklara maruz bırakılmamalıdır. BOS örneği mümkün olan en kısa sürede laboratuvara ulaştırılmalıdır (2).

BOS, plevral boşluk, sinovyum, perikard veya periton gibi normalde steril bölgelerde enfeksiyondan şüphelenilen hastalarda, tutulum bölgesinden aseptik olarak aspire edilen sıvı ve eş zamanlı kan kültürleri yapılmalıdır (1).

Maksiller sinüzit için endoskopik olarak direkt sinüs aspiratları veya meatus nasi mediustan sürüntü örnekleri, konjonktivit için konjonktival sürüntü örnekleri, otitis media için timpanosentez ile elde edilen orta kulak sıvısı tercih edilen örneklerdir. Kulak zarı perforé ve kulak akıntısı olan hastalarda, dış kulak yolundan aseptik olarak toplanan orta kulak sıvısı aspirasyonu da kullanılabilir (1).

İnflame epiglotit kültürleri genellikle pozitifdir (7). Ama arka farinksten örnek alınması sırasında hava yollarının tamamen tıkanmasını stimüle edebileceğinden buradan örnek alınmamalıdır. Tanı kan kültürü ile konur (16).

Bronkopulmoner enfeksiyondan şüphelenilen hastalarda, orofaringeal kommensal mikrobiyota ile kontaminasyonu önleyecek şekilde bronkoalveolar lavaj veya bronş yıkama gibi alt solunum yolu sekresyonlarını temsil eden örnekler alınmalıdır. Balgam ve trakeal aspiratların toplanması daha az invaziv olmakla birlikte, patojen ve oral mikrobiyota ayrımı zorlaşmaktadır. Bakteriyel pnömoniden şüphelenildiğinde kan kültürleri de alınmalıdır. Alevlenme yaşayan kistik fibrozis hastaları dışında nazal, nazofaringeal ve nazal sürüntü örneklerinin tanıda değeri yoktur (1).

2.3.2. Klinik Örneklerin Direkt İncelenmesi

2.3.2.1. Mikroskopi

Gram boyamada *Haemophilus* türleri; küçük, pleomorfik, Gram negatif kokobasil, basil veya filamentöz formda görünmektedir (1).

H. influenzae menenjitinin hızlı ön tanısı için, BOS örneğinin Gram boyalı yaymaları incelenebilir (2). Eğer BOS örneği 1-2 ml'den fazla ise, inceleme ve kültür için santrifüj edilerek veya sitosantrifüjde 10 dakika boyunca 10.000 x g'de santrifüjlenerek elde edilen pellet kullanılabilir (1,2). Görünür şekilde bulanık örneklerle, pellet yaymasına ek olarak doğrudan bir yayma hazırlanmalıdır (1).

Plevral, peritoneal, sinovyal ve perikardiyal sıvı örneklerine de Gram boyamada BOS örneği ile aynı yaklaşım uygulanmalıdır. Orta kulak sıvısı ve sinüs aspirat örneklerinin yayması sitosantrifüj edilmeden doğrudan örnekten hazırlanmalıdır. Alt solunum yolu örnekleri için balgam, endotrakeal aspirat, transbronşiyal biyopsi, bronşiyal fırça biyopsi ve torakotomi örnekleri doğrudan örnekten; bronş yıkama ve bronkoalveolar lavaj örnekleri sitosantrifüj sonrası hazırlanabilir (1). Diğer örnek türlerinin de Gram ile boyalı yaymaları ön tanı için yararlı olabilir (2).

Hastanın kliniği ve klinik örneğin Gram boyamadaki görünümü ile *H. influenzae*'nin muhtemel patojen olduğu düşünülebilir; ancak Gram boyama ile tanımlama yapılamaz. Negatif Gram boyama sonucu *Haemophilus* enfeksiyonunu dışlamaz, örnekte az sayıda mikroorganizma bulunabilir (2).

2.3.2.2. Antijen Saptama

BOS ve çeşitli vücut sıvılarında Hib kapsül antijeninin hızlı tanısı için kapsül şişme reaksiyonu, lateks aglütinasyon (LA), enzim immünassay (EIA) ve monoklonal antikorlar kullanılabilir. Epiglotit tanısında IgM ve IgG antikorlarının belirlenmesi için ELISA uygulanabilir (18). Bu teknikler hızlı tanı sağlamakta ama Gram boyamaya göre duyarlılık ve özgüllükleri düşük olmaktadır. Bu nedenle, sınırlı klinik değere sahiptir ve genellikle önerilmez. Bununla birlikte, hastalık prevalansının yüksek olduğu ve kaynakların kısıtlı olduğu bölgelerde antijen bazlı tespit yöntemleri yararlı olabilmektedir (1).

2.3.2.3. Moleküler Teknikler

Nükleik asit amplifikasyon testleri, özellikle PCR'a dayanan testler, *H. influenzae*'yi doğrudan BOS, plazma, serum ve tam kan dahil olmak üzere çeşitli klinik örneklerde tespit etmek için geliştirilmiştir. Duyarlılıkları yöntemine göre değişiklik gösterirken özgüllükleri yüksektir (1).

Antibiyotik kullanımı ile kültür negatifleşse de klinik örneklerde bakteriyel DNA kalabilir, bu da yalancı pozitifliğe yol açar. Ayrıca, özellikle solunum yolu örneği gibi bazı örneklerde, kommensal *Haemophilus* türlerinin sıklıkla bulunmasından dolayı pozitif sonuçları yorumlamada sorunlar olabilir. Bu sebeplerle testin spesifikliğı düşmekte ve klinik örneklerde doğrudan *Haemophilus spp.*'nin saptanması için moleküler saptama tekniklerinin kullanılması savunulmamaktadır (1).

2.3.3. *Haemophilus* Türlerinin Kültürden İzolasyonu

2.3.3.1. Besiyeri

Haemophilus türlerinin kültürde optimum üremesi için, müşkülpesent bakterilerin üremesini destekleyen zenginleştirilmiş besiyerlerinin kullanılması gerekmektedir (1). Primer izolasyon, çikolata agarda veya Stafilokok çizgi tekniğı (*S. aureus* başta olmak üzere hemolizin üreten *Staphylococcus spp.*) kullanılarak kanlı agarda yapılabilir. Çikolata agar kullanmanın dezavantajı, hemolitik özellik gösteren türlerin (*H. haemolyticus*, *H. parahaemolyticus*, *H. pittmanniae*) hemolitik özelliklerinin saptanamamasıdır (2).

Hem X hem de V faktörü tam kanda yüksek konsantrasyonda bulunmakta ve çoğı eritrositler içinde tutulmaktadır. X faktörü protoporfirin IX'dur. Tam kandan elde edilebilir veya kristalin hemin kullanılarak besiyerine eklenebilir. V faktörü ise, NAD veya NADP olarak kompleks halde nikotinamidden oluşur ve kanda kolayca bulunmaktadır. Bununla birlikte, nikotinamid, hücre içinde olduğu ve kanda NAD-glikohidrolaz enzimlerinin olması nedeniyle biyoyararlanımı kolay olmayabilir. *Haemophilus spp.*'nin üremesi için katı besiyerine ya kristal hemin ve NAD eklenmeli veya kandaki eritrositlerin lizisi ile X ve V faktörlerinin serbestleşmesi amacıyla ısıtılmalıdır (1).

Birçok bakteri ve maya, besiyerlerinde üreme sırasında NAD sentezler ve salgılarlar. V faktör gereksinimi olan *Haemophilus* türleri, bu kolonilerin çevresinde iğne ucu büyüklüğünde koloniler oluşturarak üreyebilir. Bu fenomene satellitizm (sütanne fenomeni) adı verilir. Bu fenomenden yararlanılarak Stafilokok çizgi tekniği ile koyun kanlı agarda *Haemophilus* izolasyonu gerçekleştirilebilir (2).

Haemophilus spp.'nin solunum yolu örneklerinde izole edilmesinde önemli bir zorluk, kommensal bakterilerin varlığına bağlı olarak aşırı bakteri üremesidir. Ortama basitrasin, vankomisin ve/veya klindamisin ile takviyesi, kommensal bakterileri inhibe ederek *Haemophilus spp.*'nin üremesine izin vermektedir (1).

Ek olarak, IsoVitaleX (BD, ABD) ve Vitox (Thermo Scientific, ABD) kullanılabilir. Bu üreme faktörleri glikoz, sistin, glutamin, adenin, tiamin, B12 vitamini, guanin, demir ve aminobenzoik asit içermektedir. %5 lize koyun kanı ve %1 IsoVitaleX veya %1 Vitox ile desteklenmiş zenginleştirilmiş çikolata agar, klinik laboratuvarlarda *Haemophilus spp.*'yi etkili bir şekilde üretmek için kullanılabilir (1).

Haemophilus spp. için kullanılabilecek diğer bir besiyeri Levinthal besiyeridir. Şeffaf olması nedeniyle sıklıkla kapsülle ilişkili bir özellik olan kolonide parlak renk yansımalarının (kırmızı, mavi, yeşil, sarı) saptanmasını sağlamaktadır (1,18).

Kanda *Haemophilus spp.* izolasyonu için kan kültürü sistemleri kullanılabilir. Bu tür sistemlerde kullanılan sıvı besiyeri, *Haemophilus spp.*'nin üremesini destekler çünkü kandaki eritrositler kan kültürü besiyeri ile temas ettiğinde parçalanır ve hem X hem de V faktörlerinin yeterli konsantrasyonlarını sağlar (1).

2.3.3.2. İnkübasyon Ortamı ve Süresi

Haemophilus türlerinin üremesi için artmış CO₂ (%3-5) içeren, nemli ve 35-37°C sıcaklıkta bir inkübasyon ortamı gereklidir (2). Bu koşullar altında çoğu 24-48 saat içinde ürer. *H. ducreyi* ve *H. aegyptius* gibi daha zor üreyen türler için 5 güne kadar inkübasyon gerekebilir. Ayrıca, *H. ducreyi* 30 ila 33°C'de inkübe edildiğinde üremesi kolaylaşacaktır (1).

2.3.3.3. Koloni Görünümü

H. influenzae kolonileri genellikle yarı saydam, pigmentsiz veya hafif sarı renkte, düz veya dışbükey şekilli, düzgün kenarlı, şebnem tanelerine benzeyen koloniler

oluşturmaktadır (1,7,18). Çikolata agarda ilk 24 saatlik inkübasyon sonrası koloniler yaklaşık 0.5-0.8 mm'lik bir boyuta, 48 saatte ise 1.0-1.5 mm'ye ulaşmaktadır. Kapsüllenmiş suşların kolonileri mukoiddir (7). *H. influenzae* türlerinin çoğu, güçlü bir amin benzeri koku yayan indol üretmektedir. İndol üretmeyen suşlar "fare gibi" bir koku yaymaktadır (1).

H. parainfluenzae kolonileri tipik olarak kirli beyaz ya da sarı renktedir. 24 saatlik inkübasyon sonrası 1-2 mm çapa ulaşır. Koloni görünümü son derece çeşitlidir, düzgün ya da buruşuk olabilir. Agar yüzeyi boyunca bozulmadan kaydırılabilir. Koloniler yaşlandıkça morfoloji değişebilir (1).

H. haemolyticus yarı saydam, dışbükey ve S koloniler oluşturur. *Staphylococcus spp.* çevresinde uydu koloni oluşturmaz. Kanlı agarda beta hemoliz yapabilir, seri pasajlar sonrası hemoliz özelliğini kaybedebilir. *H. parahaemolyticus* ve *H. paraphrohaemolyticus*'un üreme özellikleri ve koloni morfolojisi, *H. haemolyticus*'a benzer özellikte görülür (1).

H. aegyptius kolonileri 48 saatte sadece 0,5 mm boyutuna ulaşır. Dışbükey, yarı saydam, S koloniler oluşturur (1).

H. ducreyi yavaş üreme gösterir, üremesi için 3-5 gün geçer. Çikolata agarda küçük, düz, gri ve S koloniler oluşturur. Kanlı agarda zayıf beta hemoliz yapar. Koloniler *H. parainfluenzae* gibi agar boyunca kaydırılabilir (1).

2.3.3.4. Tanımlama

Tanı laboratuvarlarında X ve/veya V faktörü gereksinimi, *Haemophilus* türlerini ayırt etmek için rutin olarak kullanılmaktadır, ancak *H. influenzae* ve *H. haemolyticus* için hem X hem de V faktörleri gerekmektedir. Temel fenotipik fark, *H. haemolyticus*'un hemolizin üretmesidir. Bununla birlikte, *H. haemolyticus* hemoliz özelliğini kaybedebilir veya başlangıçta olmayabilir. Kültür bu ayrımı tek başına güvenilir bir şekilde yapamamaktadır (25). Sağlıklı bireylerin solunum yollarından *H. influenzae* olarak tanımlanan izolatların %15-20'si, invaziv suşların %0,5-2'si, KOAH hastalarının balgamından sürveyans kapsamında izole edilen olası *H. influenzae* suşlarının %40'ının *H. haemolyticus*'un hemolitik olmayan varyantları olduğu bulunmuştur. CDC; *H. haemolyticus* ve ilgili organizmaların, patojenik potansiyeli

olmayan kommensal mikroorganizmalar olarak kabul edilmemesi gerektiğini vurgulamaktadır (5).

Yanlış tanımlama yapılmasının; klinik hastalıkların teşhisi, antibiyotik tedavisi verilmesi, antibiyotiğe dirençli NTHi oranları, aşılardan ve *H. influenzae* tedavilerinin etkinliğinin yanlış tahmin edilmesi gibi geniş kapsamlı etkisi olmaktadır (25).

Haemophilus spp.'nin tür düzeyinde tanımlanması fenotipik olarak, otomatize/yarı otomatize ticari sistemler ile veya Matriks aracılı lazer dezorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanlı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) ile yapılmaktadır (18,25). Moleküler tanımlamada ise; 16S rRNA, *sodC*, *ompP6*, *rnbP*, *bexA*, LOS genleri (*licA*, *lic2A*, *IgtC*), *iga*, *hpd*, *omp p2*, *recA*, *fuck*, *hap*, *adk*, *pgi*, *infB* ve antibiyotik direnç genleri kullanılmıştır (25).

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında MALDI-TOF MS ile tanımlama yapılarak daha nadir görülen *Haemophilus* türlerinin tanımlanması mümkün olacaktır. Bununla birlikte, tanımlamada sorun olan suşlarda housekeeping genlerinin veya tam uzunluktaki 16S rRNA genlerinin DNA dizilimi kullanılabilir (5).

2.3.4. *Haemophilus* Türlerinin Biyotiplendirilmesi

Kilian yaptığı taksonomik çalışmada *Haemophilus spp.*'nin saptanması ve karakterizasyonu için biyokimyasal testler tanımlamıştır. Biyotiplerin belirlenmesinde; indol üretimi, üreaz ve ornitin dekarboksilaz olmak üzere üç test kullanılmaktadır. *H. influenzae* ve *H. parainfluenzae* serotipten bağımsız olarak 8 biyotipe ayrılmaktadır (2).

Belirli biyotipler; farklı enfeksiyonlar, kaynaklar, antijenik özellikler ve antimikrobiyal direnç paternleriyle ilişkili olarak görülmektedir. *H. influenzae* biyotip I suşları çoğunlukla 1 yaş altı bebeklerin BOS, kan ve solunum yolu salgılarından; biyotip II ve III 1-5 yaş arası çocukların ve 20 yaş üstü erişkinlerin konjonktiva ve balgam kültürlerinden; biyotip IV obstetrik, jinekolojik, perinatal ve neonatal enfeksiyonlardan izole edilmiştir (2). Biyotip III, “Koch Weeks basili” olarak bilinir ve *H. aegyptius* ile identiktir (18).

Tablo 7. *H. influenzae* ve *H. parainfluenzae*'nın biyotiplendirilmesi (1,2)

<i>H. influenzae</i>				<i>H. parainfluenzae</i>			
Biyotip	Üre	ODK	İndol	Biyotip	Üre	ODK	İndol
I	+	+	+	I	-	+	-
II	+	-	+	II	+	+	-
III	+	-	-	III	+	-	-
IV	+	+	-	IV	+	+	+
V	-	+	+	V	-	-	-
VI	-	+	-	VI	-	+	+
VII	-	-	+	VII	+	-	+
VIII	-	-	-	VIII	-	-	+

ODK, Ornitin dekarboksilaz.

2.3.5. *Haemophilus influenzae* Suşlarının Serotiplendirilmesi

Genetik kapsülasyon lokusu, işlevsel olarak farklı üç bölgeden oluşmaktadır (5). Bölge I genleri (*bexDCBA*) ve bölge III genleri (*hcsAB*), altı kapsül tipinin tümü için ortaktır (≥ 82 nükleotid özdeşliği). Bölge II'deki genler daha az korunmuştur (≥ 56 nükleotid özdeşliği), altı kapsül tipinin her birine ait biyosentez genlerini taşır ve serotipe özgüdür (5,26).

Hastalık izolatlarının serotiplerinin belirlenmesi; aşı eksikliği/başarısızlığından kaynaklanan hastalık ile Hib dışı suşların neden olduğu invaziv hastalığın ayrımını sağlaması yönüyle önemlidir (7). Serotiplendirme; fenotipik ve genotipik yöntemlerle yapılabilmektedir (1). Sıklıkla lam aglütinasyon yöntemi ile serotiplendirme (SAST) ve PCR ile serotiplendirme yapılmaktadır. SAST ile serotip belirleme, teknik farklılıklardan ve kullanılan antiserum lotundan etkilenebilmekte, kapsüllenmemiş suşlarla yalancı pozitif reaksiyonlar gözlenebilmektedir. PCR tabanlı yöntemlere kıyasla yüksek oranda uyumsuz sonuç verebilmektedir. Moleküler yöntemler ile bu dezavantajlar görülmemektedir, ayrıca gelişmiş duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir (1,5,26).

SAST, poliklonal ve monoklonal antiserumlar kullanılarak yapılabilir. Tekrarlanan pasajlarla kapsül antijen miktarı azalabileceğinden, izolasyon sonrası en kısa sürede serotiplendirme yapılması tavsiye edilmektedir. Alternatif olarak, tipe özgü

antikorlar, floresan moleküller ile doğrudan veya dolaylı olarak saptanabilir ve floresan mikroskopisi ile belirlenebilir (1).

PCR ile kapsüllü suşları tanımlamak için *bexA* geni; serotip a, b, c, d, e ve f için sırasıyla *acsA*, *bcsB*, *ccsB*, *dcsC*, *ecsC* ve *fcsA* genleri kullanılmaktadır. Pulsed field jel elektroforez (PFGE), ribotipleme, restriksiyon fragman uzunluk polimorfizm analizi, multilokus enzim elektroforezi, rastgele amplifiye edilmiş polimorfik DNA profil analizi, multilokus dizi tipleme ve yeni nesil dizileme *Haemophilus*'un tipleme için kullanılan diğer moleküler yöntemler arasında bulunmaktadır (1).

2.3.6. *Haemophilus influenzae* Suşlarının Genotiplendirilmesi

Epidemiyolojik çalışmalarda bakterilerin genotiplendirilmesi amacıyla sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS PAGE) kullanılarak LPS analizi, DNA parmak izi metodu, ribotipleme, PFGE ve multilokus dizi tiplendirmesi (MLST) kullanılmaktadır. En uygun metod; yedi seçilmiş “housekeeping” geni olan *adk*, *atpG*, *frdB*, *fucK*, *mdh*, *pgi* ve *recA*’nın sekanslanmasını temel alan MLST’dir (18).

2.3.7. İn vitro Antibiyotik Duyarlılığı

Antimikrobiyal duyarlılık testi (ADT) yöntemleri ile klinik merkezler arasında tekrarlanabilir sonuçlar sağlamak için standart koşullar gerekmektedir. ADT yöntemlerinin uygulanması ve yorumlanması için Amerikan Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) ve Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST) gibi kuruluşlar tarafından, disk difüzyon testi ve referans yöntem olarak sıvı mikrodilüsyon standartlaştırılmıştır. *Haemophilus influenzae* gibi zor üreyen mikroorganizmalar kullanıldığında, Müller Hinton (MH) besiyerinin desteklenmesi gerekmektedir. Bu amaçla EUCAST kriterlerine göre MH Fastidious (MH-F) ve CLSI kriterlerine göre *Haemophilus* Test Medium (HTM) besiyerleri önerilmektedir. Kullanılan besiyerine ve yöntemle bağlı olarak farklılıklar gözlemlendiği ve disk difüzyon yöntemleriyle yanlış yorumlama potansiyeli olduğu bildirilmiştir (27).

2.4. Tedavi

Haemophilus influenzae enfeksiyonları genellikle beta laktam antimikrobiyal ajanlarla tedavi edilmektedir. Tedavide, beta-laktamaz inhibitörü ile kombine

aminopenisilinler birincil antimikrobiyal ajan olarak kabul edilirken, menenjit gibi invaziv enfeksiyonlar genellikle üçüncü kuşak sefalosporinlerle tedavi edilmektedir (28). Bunların dışında, tedavide florokinolonlar ve makrolidler kullanılmaktadır (7). Tedavide kullanılan antibiyotikler ve bakteri hücresindeki hedefleri Tablo 8’de verilmiştir.

Antibiyotik tedavisi, *H. influenzae* enfeksiyonu yönetiminin sadece bir yönüdür. Hib menenjiti olan hastalara kortikosteroid uygulanması nörolojik sekel insidansını azaltmaktadır. Oksijenizasyonun sürdürülmesi ve dokuların yeterli perfüzyonunun sağlanması da dahil olmak üzere destekleyici tedaviye de kritik önem verilmelidir (7).

Tablo 8. *Haemophilus spp.*’nin tedavisinde kullanılan antibiyotikler ve bakteri hücresindeki hedefleri (29)

Antibiyotik	Hedef
Hücre duvarı sentezini inhibe eden antibiyotikler	
Beta laktamlar	Transpeptidazlar (PBP)
Protein sentezini inhibe eden antibiyotikler	
Makrolid	Ribozom 50S alt ünite
Tetrasiklin	Ribozom 30S alt ünite
Kloramfenikol	Ribozom 50S alt ünite
DNA replikasyonunu inhibe eden antibiyotikler	
Kinolon	DNA giraz
Rifampisin	RNA polimeraz
Folik asit sentezi	
Trimetoprim	Dihidrofolat redüktaz (DHFR)
Sülfametoksazol	Dihidropteroat sentaz (DHPS)

2.5. Antibiyotik Direnci

H. influenzae, *H. parainfluenzae* ve *H. haemolyticus* türlerinde daha önce tanımlanmış moleküler direnç mekanizmaları Tablo 9’da gösterilmiştir. Bunların dışında; *H. influenzae*’da AcrAB eflüks pompası tanımlanmıştır (10,30).

AcrAB eflüks pompası, RND süper ailesine aittir ve *acrA/acrB* geni tarafından kodlanmaktadır. Pompanın üçüncü bileşeni olarak TolC yer almakta, birlikte AcrAB/TolC kompleks yapısını oluşturmaktadırlar. Ayrıca, bu eflüks pompasını

baskılayan *acrR* gen ürünü AcrR'yi eksprese edebilmektedir (10,30–32). Bu eflüks pompasının *H. influenzae*'da ilaç direncindeki rolü hakkında nispeten az şey bilinmektedir (30). Makrolid, novobiosin, rifampin eflüksüne neden olup bu organizmanın başlangıç düzeyindeki direncine katkıda bulunduğu; β -laktamlar, kloramfenikol, kanamisin, monobaktam, tetrasiklin, florokinolonlara dirençte ise rol oynamadığı raporlanmıştır. (30–34).

Tablo 9. *H. influenzae*, *H. parainfluenzae* ve *H. haemolyticus* türlerinde daha önce tanımlanmış moleküler direnç mekanizmaları ve ilgili genlerde bildirilen mutasyonlar

Antibiyotik	<i>H. influenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. haemolyticus</i>
Beta laktamlar	Beta laktamaz: TEM-1, TEM-1D, ROB-1 (4,10,35)	Beta laktamaz: TEM-1, TEM-15, TEM-34, TEM-182, GES, OXA, VEB, SHV, CMY, DHA, ROB-1 (17,36,37)	Beta laktamaz: TEM-1D (4)
	<i>ftsI</i> : A337V/N, I349N, D350N, S352F/N/T, S357N, A368T, M377I/L, S385T, L389F, A437S, T443A/S, I449V, G490E/V, R501L/H/E, A502V/T/S, V511A, R517H, I519L, N526K, Y528H, A530S, T532S, V547I, Y557H, V562L, N569S, A586S/P, N589K, T591A, S594T, A595T, I601V (10,38–40)	<i>ftsI</i> : K276N, A307N, V329I, V342A, A343V, K344R, I348V, D350N, T352G, K355T, L356V, A368P, M377I, S385T, E398D, S406G, P408D, D410E, I414V, V418R, I420V, I442F, A444S, V461I, K477Q, V488I, I491M, V511A, I519V, N526K/S, N526H, A530S, D551L, V562I, T574A (17,36,40–42)	<i>ftsI</i> : F332L, V342A, K344R, I348V, D350N, T352G, S353A, K355T, L356V, A368V/P, M377I, P392A, S406G, P408S/D, D410E, V418A/R, I420V, A437S, A444S, V461I, K477Q, K486Q, I488V, G490E, I491M, A502V, A502T, R517H, I519L, N526K, V547I, D551N/A, N569S (40,43)
Makrolid	AMRG: <i>ermA</i> , <i>ermB</i> , <i>ermC</i> , <i>ermF</i> , <i>mefA</i> (44,45)	AMRG: <i>mefA/E</i> , <i>msr (D)</i> , <i>ermB</i> (17,42,46,47)	AMRG:-
	L4: nokta mutasyon (48)	L4: nokta mutasyon (17,42,46)	L4:-
	L22: nokta mutasyon, delesyon, insersiyon (48–50)	L22:-	L22:-
	23rRNA: nokta mutasyon (48,49)	23rRNA:-	23rRNA:-
Tetrasiklin	<i>tetB</i> , <i>tetM</i> (45,51,52)	<i>tetB/C/D/R</i> , <i>tetM</i> (17,42,46)	<i>tetB</i> (4)
Kloramfenikol	<i>catP</i> , <i>catA</i> -like (51)	<i>catS</i> , <i>catA2</i> (17,42,46)	<i>catA2</i> (4)
Kinolon	<i>gyrA</i> : D83G, S84L/F/N/Y/D/A/I/T, D88A/N/Y/G/E/A, P118Y, E142K, M121L, A117E, (9,40,53–64)	<i>gyrA</i> : S84F/Y/L, D88Y, K130R (6,17,40–42,46,47,65–68)	<i>gyrA</i> : S84L (43)
	<i>gyrB</i> : D489N, T472I, A400V, D429E, S467Y, Q468R (9,55,57,61–64)	<i>gyrB</i> : -	<i>gyrB</i> :-
	<i>parC</i> : G82D/C/R, D83N/G, S84R/I/A/N/T,	<i>parC</i> : S84F/L/Y, S138T, M198L, E88K/Y, P203L,	<i>parC</i> : S84I, N138S (43)

	E88K/A/D, S133A/T, N138S, G206R, V210L, A120S, K131E (9,40,53–64,69)	A205V, V91E (6,17,40– 42,46,47,65–68)	
	<i>parE</i> : D420N, R368H, S458L/A, R381C, V466M, G405S, S474N, S451Y, P452L (9,55,59,61,62,64)	<i>parE</i> : D420N, A451S, A403P, G457A (17,47,66,67)	<i>parE</i> : D420N (43)
	PMQR: -	PMQR: <i>aac-(6')-Ib-cr</i> (17,47)	PMQR: -
Trimetoprim	<i>folA</i> : dfrA1 (70)	<i>folA</i> : I95L, F154V/S <i>folA</i> promotör bölge mutasyonu (46)	-
Sülfametoksazol	<i>sul2</i> (70,71)	<i>sul2</i> (46)	<i>sul2</i> (4)
	<i>folP</i> : insersiyon, nokta mutasyon (70,71)	<i>folP</i> : insersiyon, nokta mutasyon (46)	-

INS, insersiyon; DEL, delesyon.

2.5.1. Beta Laktam Antibiyotik Direnci

Beta laktam ajanlar; kimyasal yapılarında ortak bir beta laktam halkası taşıyan bir antibiyotik grubudur (29). Peptidoglikan sentezinin son aşamasında rol alan transpeptidaz enzimlerine (Penisilin bağlayan proteinler-PBP) bağlanırlar. Peptidoglikan tabakasını bozarak hücre duvar sentezini inhibisyonu ile bakterisidal etki gösterirler (29,72).

Beta laktam halkasına bağlı yan zincirler ve diğer halkalara göre penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler, monobaktamlar ve beta laktamaz inhibitörleri olmak üzere beş temel sınıfa ayrılırlar (29).

H. influenzae'da beta laktam grubu antibiyotiklere dirençte en yaygın mekanizma; β -laktamaz üretimi olup, daha az olarak PBP3 kodlayan *ftsI* geninde mutasyon gözlenmektedir. Suşların bir kısmı her iki mekanizmaya da sahiptir (10).

Haemophilus spp. beta laktam direnci açısından fenotipik ve genotipik olarak 4 sınıfa ayrılmaktadır. Fenotipik sınıflama; nitrosefin diski ile beta laktamaz araştırılması, ampisilin ve amoksisilin klavulanat duyarlılıkları ile yapılmaktadır. Genotipik sınıflama; *bla_{TEM}*, *bla_{ROB-1}* genlerinin araştırılması ve *ftsI* geninin dizi analizi ile yapılmaktadır (10). Sınıflandırma Tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. Beta laktam antibiyotiklere direnç mekanizmalarına göre fenotipik ve genotipik sınıflandırma (39)

Fenotip	Tanım
BLNAS	Beta laktamaz negatif, ampisilin duyarlı izolat
BLNAR	Beta laktamaz negatif, ampisilin dirençli izolat
BLPAR	Beta laktamaz pozitif, ampisilin dirençli izolat
BLPACR	Beta laktamaz pozitif, amoksisilin klavulanat dirençli izolat
Genotip	Tanım
gBLNAS	β -laktamaz genleri negatif, PBP3'te önemli aminoasit değişikliği olmayan izolat
gBLNAR	β -laktamaz genleri negatif, PBP3'te önemli aminoasit değişikliği olan izolat (fenotipik olarak ampisilin duyarlı olabilir.)
gBLPAR	β -laktamaz genleri pozitif, PBP3'te aminoasit değişikliği olmayan izolat
gBLPACR	Hem β -laktamaz genleri pozitif, hem de PBP3'te aminoasit değişikliği olan izolat

g:Genetik

2.5.1.1. β -laktamaz Aracılı Direnç

H. influenzae'da β -laktamaz aracılı ampisilin direnci ilk olarak 1970'lerin başında saptanmış ve 1975'te TEM tipi β -laktamaz, 1981 yılında ROB-1 tipi β -laktamazın varlığı bildirilmiştir (10). *Haemophilus spp.*'de en yaygın ampisilin direnç mekanizması TEM-1 β -laktamaz üretimi olup ROB-1 β -laktamaz daha az sıklıkla gözlenmektedir (10,37). Hem *bla*_{TEM-1} hem *bla*_{ROB-1} pozitif olan sadece bir köken raporlanmıştır (10).

TEM ve ROB β -laktamazın her ikisi de ampisiline direnç kazandıran, klavulanat gibi β -laktamaz inhibitörleri ile etkili bir şekilde inhibe edilen, benzer substrat profillerine sahip plazmit aracılı sınıf A serin β -laktamazlardır. Klinik izolatlarda, β -laktamaz aracılı ampisilin direnci genellikle kolayca tespit edilir, çünkü her iki enzim için de pozitif olan suşlar yüksek MİK değerleri göstermekte ve nitrosefin hidrolizi pozitif olarak bulunmaktadır. Ayrımları için moleküler yöntemlerin kullanılması gerekmektedir (10).

2.5.1.1.1 TEM β -laktamazlar

Plazmit aracılı TEM β -laktamazlar, *bla*_{TEM} genleri tarafından kodlanmaktadır (10). *H. influenzae*'da TEM-1; *H. parainfluenzae*'da TEM-1, TEM-15, TEM-34 ve TEM-182 olmak üzere dört farklı TEM beta-laktamaz belgelenmiştir (28,73).

TEM-1 β -laktamazın aracılık ettiği ampisilin direnci *H. influenzae* ve *H. parainfluenzae*'da yaygındır ve iki tip plazmit ile ilişkilidir. Küçük (~10 kb) konjugatif olmayan plazmitler genellikle sadece *bla*_{TEM} kodlarken, daha büyük (yaklaşık 40 kb) konjugatif plazmitler genellikle kromozoma entegredir ve çoklu antibiyotik direnç genlerini (kloramfenikol, tetrasiklin veya kanamisin gibi) kodlamaktadır. Büyük plazmitler daha yaygındır ve *H. influenzae*'de *bla*_{TEM} genlerinin yayılmasında daha önemli görünmektedir (10,74).

2.5.1.1.2 ROB β -laktamazlar

ROB-1 geninin kromozomal olduğu bir izolat dışında hepsinde, gen, 4.1 ila 5.0 kb arasında değişen küçük plazmitler üzerinde yer almaktadır. *H. influenzae*'da ROB-1 varlığı ile daha yüksek sefaklor MİK'leri arasında belirgin bir ilişki vardır (10).

2.5.1.1.3 Yeni β -laktamazlar

Beta laktamaz üreten *H. influenzae* kökenlerinde nitrosefin hidrolizi pozitif, PCR ile hem TEM-1 hem de ROB-1 genleri için negatif olan suşlar tanımlanmıştır. Bu durum, *H. influenzae* için daha önce tanımlanmayan bir β -laktamazı veya azalmış aktivite veya ekspresyon seviyesine sahip bir ROB-1 veya TEM-1 varyantını gösteriyor olabilir (10).

2.5.1.2. Penisilin Bağlayan Proteinlerdeki Değişikliklere Bağlı Direnç

Beta laktamaz negatif, ampisilini MİK değeri sınır değerinde olan suşlar BLNAR olarak tanımlanmaktadır (10). *H. influenzae* tip b BLNAR suşuna bağlı menenjit ilk olarak 1980'de rapor edilmiştir (11). BLNAR suşları, *ftsI* gen mutasyonlarına ve ilişkili PBP3 aminoasit değişikliklerine dayalı olarak ortaya çıkmaktadır (10). Çeşitli çalışmalarda tanımlanmış olan *ftsI* gen mutasyonları ve buna dayalı oluşturulan farklı sınıflandırmalar Tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 11. Farklı BLNAR çalışmalarında tanımlanan *ftsI* mutasyonları (10)

Suş	Aminoasit pozisyonu																			
	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5
	3	5	5	5	6	7	8	8	3	4	4	9	0	0	1	1	2	2	3	4
	7	0	2	7	8	7	5	9	7	3	9	0	1	2	1	7	6	8	2	7
Rd	A	D	S	S	A	M	S	L	A	T	I	G	R	A	V	R	N	Y	T	V
Ubukata																				
I		<u>N</u>		<u>N</u>		I	T		S							H				S
II		<u>N</u>		<u>N</u>									V				K			S
III		<u>N</u>		<u>N</u>		I	T	F									K		L	S
Straker		V	N	<u>N</u>	T	I			A				L/H	<u>T/V</u>	A	H	<u>K</u>	H	S	
Kubota		<u>N</u>	F	<u>N</u>		<u>I</u>	<u>T</u>	<u>F</u>							A		K		<u>I</u>	<u>L</u>
Dabernat																				
I		N		N										T		H				
Ila																	K			
Iib		N		N		<u>L</u>			S		E		<u>V</u>				K			
Iic		N		T									<u>T</u>				K			
Iid										V							K			
Hasegawa																				
I																	H			
II						I	T	F									H			
III							T											K		
IV						I	T											K		
V							T	F										K		
VI						I	T	F										K		
Fluit		<u>N</u>		N	T	I			S			V	E	<u>T/V</u>		H	<u>K</u>			

Koyu renkli mutasyonlar yapılan çalışmalardaki tüm suşlarda bulunanları, altı çizili mutasyonlar bazı suşlarda bulunanları göstermektedir.

A:Alanin, D:Aspartik asit, S:Serin, M:Metionin, L:Lösin, T:Treonin, I:İzolösin, G:Glisin, V:Valin, R:Arjinin, N:Asparajin, F:Fenilalanin, H:Histidin, K:Lizin, E:Glutamik asit.

PBP'ler de dahil olmak üzere çoğu penisilin bağlayıcı enzim, yüksek oranda korunmuş üç amino asit motifine sahiptir. *H. influenzae* PBP3'te bu motifler S327-T-V-K, S379-S-N ve K513-T-G'dir (10). Bu motifler baz alınarak BLNAR suşları *ftsI* genindeki mutasyonlara göre 3 gruba ayrılır (11,75):

I: Korunmuş KTG (Lys-Thr-Gly) motifi yakınında Arg517His mutasyonu olan

II: Korunmuş KTG (Lys-Thr-Gly) motifi yakınında Asn526Lys mutasyonu olan

Ila: Ek mutasyon olmadan Asn526Lys

Iib: Ala502Val

Iic: Ala502Thr

Iid: Ile449Val

III: Asn526Lys mutasyonuna ilaveten korunmuş SSN (Ser-Ser-Asn) motifi yakınında Met377Ile, Ser385Thr, Leu389Phe mutasyonları olan

Grup I ve II suşlarına birlikte ‘zayıf gBLNAR’, Grup III suşlarına ‘gBLNAR’ (yüksek BLNAR) denmektedir. Ampisilin MİK'leri, zayıf BLNAR suşlarında genellikle 0.5-2.0 µg/mL aralığında ve gBLNAR suşlarında 1.0-16 µg/mL aralığında gözlenmektedir. BLNAR suşları, yalnızca ampisiline değil, aynı zamanda diğer beta laktam antibiyotiklere, özellikle sefalosporinlere karşı da azaltılmış duyarlılık gösterir. Sefaklor direncinin bir BLNAR suşu için ampisilin direncinden daha iyi bir gösterge olabileceği öne sürülmüştür (10,11,36).

BLPACR suşları da *ftsI* genindeki mutasyonlara göre 2'ye ayrılır (76):

BLPACR I: Zayıf BLNAR suşlarına benzer Arg517His veya Asn526Lys mutasyonu olan

BLPACR II: gBLNAR suşlarına benzer mutasyonları olan

BLPACR suşları, aynı PBP3 amino asit ikamelerine sahip BLNAR suşları ile karşılaştırıldığında, çok daha yüksek ampisilin MİK'lerine (0,5-64 µg/ml) sahip olup amoksisilin klavulanat ve sefalosporin MİK'leri aynıdır. Bu da beta laktamazın dirence katkısının ampisilin ile sınırlı olduğunu göstermektedir (10).

2.5.2. Makrolid Direnci

Makrolid grubu antibiyotikler, bakteri ribozomunun 50S ribozomal alt birimlerinin 23S rRNA'sına geri dönüşümlü olarak bağlanırlar. Böylece polipeptit zincir uzaması bloke ederek protein sentezini inhibe ederler (1).

H. influenzae, bir eflüks pompasının varlığı ile ilişkili olarak makrolid-linkosamid-streptogramin B ajanlarına ve ketolidlere doğal olarak dirençlidir. Bazı *H. influenzae* suşları bu eflüks pompasından yoksundur ve sokak tipi suşlardan daha düşük MİK'lere sahiptir. Bazıları ise ek direnç mekanizmaları ile daha yüksek MİK'lere sahip olabilmektedir (10).

H. influenzae'da makrolidlere karşı tanımlanmış olan ek direnç mekanizmaları şunlardır:

- 1) Kazanılmış makrolid direnç genleri (AMRG) olan *mefA*, *msr* ve *erm* genleri. *mefA* ve *msr*, eflüks pompası kodlar. *erm* genleri (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *ermF*) ise, 23S rRNA metilazı kodlar (44,47,49,59,77–79). Bazı çalışmalarda *mefE* tanımlanmakla birlikte; *mefE* geni, *mefA* ile %80'in üstünde amino asit özdeşliği olan bir *mefA* varyantıdır ve ayrı bir gen olarak tanımlanmaz (80).
- 2) 23S rRNA ve ribozomal proteinler L4, L22'deki mutasyonlar (59,79)
- 3) Kromozomal çoklu ilaç eflüks pompalarının aşırı ekspresyonu (59)

2.5.3. Kinolon Direnci

Kinolonlar ve bunların temel halkasının 6. pozisyonuna bir florür atomu eklenmesiyle sentezlenen florokinolonlar, DNA sentezini inhibe ederek bakterisidal etki gösterir (29,81).

Kinolonların hedefleri olan DNA giraz ve topoizomera IV, tip 2 topoizomera sınıfında yer alan enzimlerdir. DNA giraz, replikasyon sırasında replikasyon çatalının önündeki süper sarmalları kaldırır (29). Topoizomera IV ise, DNA replikasyonu sırasında karışık DNA'yı keser ve yeniden bağlar (61). Bu bakteriyel enzimlerin inhibisyonu, süper sarmal DNA'nın gevşemesine veya bozulmasına neden olarak bakteriyel DNA sentezini inhibe eder (1).

DNA giraz ve topoizomera IV yapısal olarak birbirine benzer ve ikisi de iki alt ünitenin tekrarından oluşan tetramerik proteinlerdir. DNA giraz, GyrA ve GyrB; topoizomera IV, ParC ve ParE alt ünitelerinden oluşur (29). A alt birimi (GyrA ve ParC) DNA kesme ve bağlama aktivitesine sahiptir, B alt birimi (GyrB ve ParE) ATPaz aktivitesine sahiptir (61). Gram negatif bakterilerde kinolonların ana hedefi DNA giraz A alt birimi iken, Gram pozitif bakterilerde topoizomera IV birincil hedeftir (1).

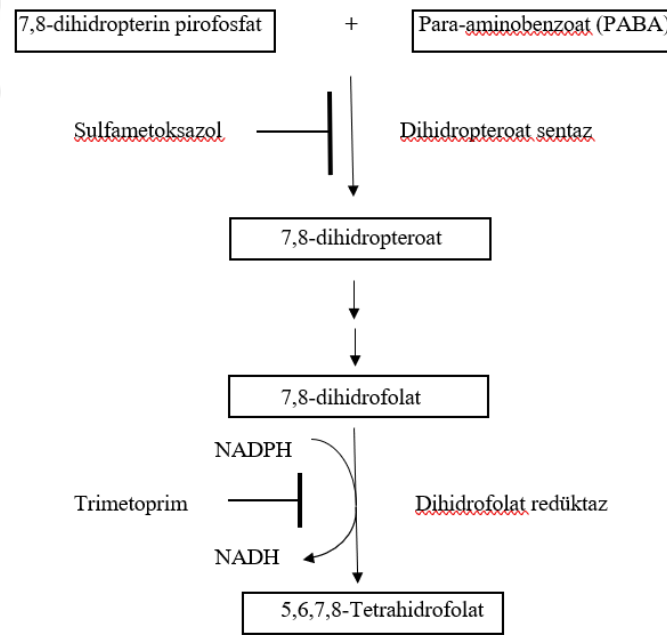
H. influenzae'da kinolon direnci ilk olarak 1993'te, kinolon direncine neden olan bazı spesifik mutasyonlar ise 1996'da tanımlanmıştır (8,9). Direnç, esas olarak DNA giraz (*gyrA* ve *gyrB*) ve topoizomera IV'ü (*parC* ve *parE*) kodlayan genlerin kinolon direnç belirleyici bölgelerindeki (QRDR) kromozomal nokta mutasyonlara bağlı olarak ortaya çıkmaktadır (9,60,61).

Direncin QRDR genlerinde kademeli olarak artan mutasyonlarla gerçekleştiği gösterilmiştir. İlk basamak mutasyon *gyrA* geninde meydana gelmekte ve spesifik mutasyon sayısı arttıkça kinolon MİK'lerinde artış gözlenmektedir (9,61). *gyrA*-S84, D88, *parC*-G82, D83, S84, E88 ve *parE*-D420 mutasyonlarının MİK artışı ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (8,9,59,61,62).

gyrA geninde ilk mutasyonlar görüldüğünde kinolon MİK'leri duyarlı aralıkta kalabilmektedir. NAL (nalidiksik asit) diski ile tarama; kinolon MİK'leri duyarlı sınırdan iken, QRDR genlerinde oluşan ilk değişikliklerin saptanmasında faydalıdır (9,60).

Ayrıca; kinolon dirençli *H. influenzae* ve *H. parainfluenzae*'da PMQR (Plazmid Aracılı Kinolon Direnci) genleri *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*, *oqxA* ve *oqxB*'nin araştırıldığı çalışmalar yapılmıştır (60,66,67). Sadece bir çalışmada dört *H. parainfluenzae* suşunda *aac(6')-Ib-cr* saptanmıştır (47).

2.5.4. Trimetoprim-Sülfametoksazol Direnci



Şekil 2. Trimetoprim ve sülfametoksazolün etki mekanizması (29)

Trimetoprim, dihidrofolatın bir substrat analogudur ve dihidrofolatın dihidrofolat redüktaz (DHFR) tarafından tetrahidrofolata indirgenmesini bloke eder. Sülfametoksazol ise, para-aminobenzoik asidin (PABA) bir substrat analogudur ve

dihidrofolatın bir öncü bileşiği olan dihidropteroatın üretiminde yer alan dihidropteroat sentetaz (DHPS) enzimini bloke eder. Bu bileşiklerin kombinasyon halinde kullanımı, dihidrofolat üretimini sınırlar ve dihidrofolattan tetrahidrofolata dönüşümü engeller. Tetrahidrofolat üretimini inhibe etmek, timin sentezini engeller ve dolayısıyla DNA replikasyonunu engeller. İnsanlar folik asit sentezlemeyip gerekli folik asiti diyet ile aldığından, iki bileşik de bakteriyel metabolizmayı selektif olarak inhibe eder (10). Trimetoprim-sülfametoksazol, normalde 1:5 veya 1:19 oranında üretilen trimetoprim ve sülfametoksazolden oluşan bakteriyostatik bir ajandır (27). Tetrahidrofolat sentez ve inhibisyon basamakları Şekil 2’de yer almaktadır.

Dihidrofolat redüktaz (DHFR), *folA* geni (*folH*, *dhfr* veya *dhf*) tarafından; dihidropteroat sentaz (DHPS) enzimi, *folP* geni tarafından kodlanmaktadır (27).

Trimetoprim’e direnç, DHFR’yi kodlayan genlerin değişmesi (*dfrA* genlerinin varyantları) ile trimetoprim ve DHFR arasında afinite değişikliği yoluyla meydana gelmektedir (10,70). *dfr* genleri, sırasıyla *dfrA* ve *dfrB*’yi içeren A ve B aileleri şeklinde gruplanmaktadır. *dfrA* genlerinin beş varyantı (*dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA7*, *dfrA12* ve *dfrA17*), trimetoprim direncinin yayılmasına aracılık eden integron tarafından taşınan genlerdir (70). DHFR’de meydana gelen bu mutasyonlar, doğal substratların afinitesini etkilemeden trimetoprim direncine yol açmaktadır (10).

Sülfametoksazol direnci ise; plazmit kaynaklı *sul1* ve *sul2* geni ve/veya DHPS’yi kodlayan kromozomal *folP* geninde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (70,71). *sul2* geni genellikle streptomisin direnç genleri *strA* ve *strB* ile bağlantılıdır ve birlikteliği gözlenebilmektedir (71).

H. influenzae’da esas olarak trimetoprim direncinin *dfrA1*, sülfametoksazol direncinin *folP* genlerinden kaynaklandığı ve *folP*’ye ek olarak *sul2* varlığının direnç seviyelerini artırdığı düşünülmektedir (70). *folA* ve *folP* genlerinde mutasyon olmadan *sul2* varlığı olan SXT duyarlı suş raporlanmıştır (46).

Ayrıca, timidin oksotrofinin *H. influenzae*’da SXT direnciyle ilgili olduğu gösterilmiştir. Timidinin urasile dönüştürülmesi timidilat sentaz enzimi ile gerçekleştirilir. Enzimi kodlayan gen, *thyA* ve enzimin kofaktörü, tetrahidrofolattır. Enfekte dokularda gösterildiği gibi, harici timidin mevcutsa, SXT ile tedavi sırasında

thyA'da meydana gelen mutasyonlar ile timidin oksotrofisi kazanılarak direnç oluşabilmektedir (27,82).

2.5.5. Tetrasiklin Direnci

Tetrasiklinler, ribozomun 30S alt ünitesine bağlanıp aminoasil tRNA'nın ribozoma bağlanmasını engelleyerek protein sentezini durduran bakteriyostatik antibiyotiklerdir (29,72).

Haemophilus türlerinde tetrasiklin direncinde; *tetB*, *tetK* ve *tetM* genleri saptanmıştır. *tetB* ve *tetK* eflüks pompası kodlayarak; *tetM* ise ribozomal koruma proteinlerinin üretimi yoluyla bakterilerde dirence sebep olmaktadır (83). *H. influenzae* ve *H. parainfluenzae*'da tetrasiklin direnci, genellikle konjugatif plazmitler üzerinde bulunan *tetB* geni tarafından kodlanmaktadır (10). Ayrıca *tetM* geni, makrolid direnç genleri ile birlikte *tetM*-MEGA elementinde bulunabilmektedir (46,84).

2.5.6. Kloramfenikol Direnci

Ribozomun 50S alt ünitesinin peptidil transferaz bölgesine bağlanıp, transpeptidasyonu ve peptid zinciri uzamasını bozan bakteriyostatik bir antibiyotiktir (29). Kemik iliğini baskılayıp aplastik anemiye yol açabildiği için kullanımı sınırlıdır (72).

H. influenzae'daki kloramfenikol direnci genellikle *cat* geni tarafından kodlanan kloramfenikol asetiltransferazın (CAT) üretimi ile ilişkilidir. *cat* geni, konjugatif plazmitler üzerinde taşınmakta ve bu plazmitler sıklıkla tetrasiklin ve ampisiline karşı direnci kodlayan genleri de taşımaktadır. Bu konjugatif plazmitler ayrıca kromozoma dahil olabilir (10).

2.6. Korunma

2.6.1. Doğal Bağışıklık

Doğumdan sonraki ilk üç ay maternal kazanılan PRP antikorları olabileceğinden, bu süre zarfında bebeklerde *H. influenzae* enfeksiyonu nadirdir (7,15). Ancak antikor seviyesi doğumdan sonra düşmeye başlamakta ve yaklaşık 18 ila 24 aylıkken en alt düzeye ulaşmaktadır. Aşılanmamış bir çocukta *H. influenzae* tip b menenjitinin en yüksek yaş insidansı bu yaş aralığında görülmektedir. Bağışıklama yapılmasa bile,

doğal kazanılmış antikorlar nedeniyle, altı yaştan sonra sistemik hastalık görülmesi olağan dışıdır (7).

2.6.2. Kemoprofilaksi

İnvaziv *H. influenzae* tip b enfeksiyonlu hastalarla yakın temasta olan; gebeler hariç bütün erişkinler, 48 aydan küçük çocuklar ve immüno Kompromize çocuklara rifampin ile profilaksi önerilir (16).

2.6.3. Aktif Bağışıklama

İlk klinik kullanıma giren Hib aşısı 1985 yılında ruhsatlandırılmıştır ve kapsüller polisakkarit içermektedir. Daha sonra aşının etkinliğini artırmak için konjuge aşılar geliştirilmiştir (85). Hib konjuge aşıları ilk olarak 1987'nin sonunda ruhsatlandırılmıştır ve daha yüksek antikor titreleri ortaya çıkardıkları ve küçük bebeklerde etkili oldukları için polisakkarit aşılardan yerini almıştır. Konjuge aşılardaki polisakkarit, protein taşıyıcılara kovalent olarak bağlanmıştır ve bu işlem onları T lenfosit bağımsız antijenlerden T lenfosit bağımlı antijenlere dönüştürmeyi sağlamaktadır (7).

Konjuge aşılarda PRP'yi bağlamak için; tetanoz toksoidi (PRP-T), difteri toksoidi (PRP-D), *N. meningitidis* serogrup B dış membran protein kompleksi (PRP-OMPC) ve mutant bir *Corynebacterium diphtheriae* suşundan elde edilen toksik olmayan bir difteri toksini (PRP-HbOC) proteinleri kullanılmıştır (2). Taşıyıcı proteinlere konjuge PRP'den oluşan aşılar, PRP'ye karşı antikorları indükleyerek koruma sağlamaktadır. Konjuge aşılardan kullanılması ile hem invaziv hastalık hem de nazofaringeal kolonizasyon azalmaktadır (7).

Bebeklerde kullanım için ruhsatlandırılmış mevcut iki konjuge aşı vardır (7). Bu aşılardan kombine şekilde polivalan aşılardan da bulunmaktadır (2). Konjuge monovalan aşılardan Tablo 12'de verilmiştir.

Tablo 12. Konjuge monovalan *Haemophilus influenzae* tip b aşıları (7,20,86)

Aşı	Ticari isim	Taşıyıcı protein	Rutin Aşı Takvimi
PRP-OMP	PedvaxHIB	OMPC	2-4 ay ve 12-15. Ayda rapel
PRP-T	ActHIB Hiberix	Tetanoz toksoidi	2-4-6 ay ve 12-15. ayda rapel

OMPC, *Neisseria meningitidis* serogrup B dış membran protein kompleksi.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmaya Alınan *Haemophilus spp.* İzolatları

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı Bakteriyoloji Ünitesinde Haziran 2020-Aralık 2021 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen 96 *Haemophilus* kökeni çalışmaya dahil edildi. Hastaların aynı hastalık epizodundaki tekrarlayan örnekleri çalışmaya dahil edilmedi.

3.2. Klinik Örneklerden *Haemophilus spp.* İzolasyonu, Saklanması ve Stokların Canlandırılması

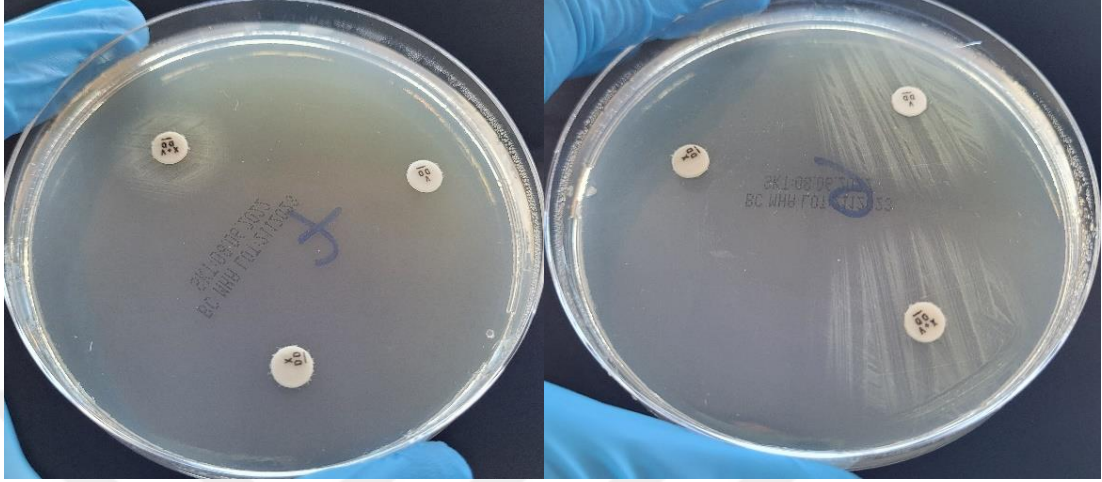
Klinik örnekler Gram boyama ile değerlendirildi ve kültür için %5 koyun kanlı agar (BD BBL™, ABD), MacConkey agar (BD BBL™, ABD) ve çikolata agara (BD BBL™, ABD) ekildi. Gram boyama ile 10x objektifte >25 polimorfonükleer lökosit ve <10 yassı epitel hücresi görülen (pürülan kriteri pozitif) solunum yolu örnekleri çalışmaya dahil edildi. 37°C’de, CO₂’li ortamda (BD GasPak™, ABD), 24-48 saatlik inkübasyon sonrası kanlı agarda üremeyip çikolata agarda üreme gösteren koloniler; Gram boyanma özellikleri, koloni morfolojisi, X ve V faktör gereksinimlerine göre değerlendirildi. Saf kültür halinde elde edilen mikroorganizmalar, tekrar çalışılncaya kadar %10 gliserollü skim milk (BD BBL™, ABD) içerisinde -80°C’de muhafaza edildi.

3.3. Bakterilerin Tanımlanması

3.3.1. X ve V Faktörleri ile Tanımlama

Çikolata agarda üremiş saf kültürlerden 3 mL SF içerisine yoğun inokulum hazırlandı. Homojen hale getirmek için vortekslendi. Süspansiyon içerisine steril bir eküvyon batırılarak Mueller Hinton II Agar (BD BBL™, ABD) üzerine yaygın ekim yapıldı. X, V ve XV diskleri (Oxoid™, UK) aralarında en az 3.5 cm mesafe olacak

şekilde petriye yerleştirildi. Plağın kapağı kapatılıp ters çevrilerek %5 CO₂'li ortamda, 35 °C'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası değerlendirme yapıldı.



Şekil 3. *Haemophilus* türlerinin X ve V faktör ile tanımlanması

(sol-*H. influenzae*, sağ-*H. parainfluenzae*)

3.3.2. MALDI-TOF MS ile Tanımlama

- 1) Örnek hazırlama yöntemi olarak 'Genişletilmiş Direkt Transfer Yöntemi' kullanıldı. Bu yöntem aşağıdaki işlemler yapılarak gerçekleştirildi.
- 2) Çikolata agarda üremiş olan taze kolonilerden ince bir tabaka halinde target spotuna sürüldü.
- 3) Örneğin üzerine, 1 µl formik asit çözeltisinden (%70'lik) damlatıldı.
- 4) Oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
- 5) Kuruduktan sonra üzerine 1 µl α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) matriks çözeltisi (2.5 mg HCCA ve 225 µl Organik Çözücü) damlatıldı.
- 6) Oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.
- 7) Hazırlanan spotlar analiz için MALDI Biotyper® sirius (Bruker Daltonics, Almanya) cihazına yüklendi.
- 8) Tanımlama skoru 1.70 üstü çıkan sonuçlar kabul edildi. 1.70 altı skor olanlar ve uyumsuz sonuçlar tekrarlandı.

3.3.3. *H. influenzae* Suşlarının Moleküler Yöntem ile Doğrulanması

H. influenzae suşlarının doğrulanması için, BioSpeedy *H. influenzae* Real-Time PCR Tespit Kiti (Bioeksen, Türkiye) kullanıldı. Ayrıca direnç geni çalışılan kökenlerde, mikroorganizmaya spesifik QRDR ve *ftsI* genlerinin amplifikasyonundan faydalanıldı.

3.3.3.1. DNA İzolasyonu

Çalışmada, -80°C'de %10 gliserollü skim milk besiyerinde saklanan bakteri stokları çikolata agar üzerinde canlandırıldı. Saf kültürlerden GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific™, ABD) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda DNA izolasyonu yapıldı.

1. Üreyen kolonilerden %0.85'lik serum fizyolik (SF) içerisinde ~ 6,6 McFarland (2×10^9 bakteri hücresi/mL) bakteri süspansiyonu hazırlandı.
2. Hazırlanan süspansiyondan 1 mL mikrosantrifüj tüpüne alındı. 5000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı.
3. Pellet 180 µL Digestion Solution içerisinde tekrar süspansiyon edildi.
4. 20 µL Proteinaz K eklendi. Homojen bir karışım elde etmek için pipetleyerek karıştırıldı.
5. Arada vorteksleyerek 56 °C'de ~30 dakika inkübe edildi.
6. 20 µL RNase A eklendi. Vortekslendi ve oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi.
7. 200 µL Lysis Solution eklendi. Homojen bir karışım elde edilene kadar ~15 saniye vortekslendi.
8. 400 µL %50 etanol eklendi ve vortekslendi.
9. Hazırlanan lizat, bir toplama tüpüne yerleştirilmiş GeneJET Genomic DNA Purification Column içerisine aktarıldı. 6000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı. GeneJET Genomic DNA Purification Column yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
10. 500 µL Wash Buffer I (etanol eklenmiş) eklendi. 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpünün içindeki atık sıvı atıldı ve pürifikasyon kolonu toplama tüpüne geri yerleştirildi.

11. 500 µL Wash Buffer II (etanol eklenmiş) eklendi. Maksimum hızda ($\geq 12000 \times g$) 3 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı. GeneJET Genomic DNA Purification Column steril bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
12. 150 µL Elution Buffer eklendi. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. $8000 \times g$ 'de 1 dakika santrifüj edildi.
13. Pürifikasyon kolonu atıldı. Elde edilen DNA kullanılabilecek kadar -20°C 'de saklandı.

3.3.3.2. *H. influenzae* Tespiti için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

H. influenzae'ların doğrulanması için BioSpeedy *H. influenzae* Real-Time PCR Tespit Kiti (Bioeksen, Türkiye) kullanıldı. PCR reaksiyonlarının gerçekleştirilmesi için üretici talimatları doğrultusunda Rotor-Gene®Q (Qiagen, Hollanda) sistemi kullanıldı.

- 1) X ve V faktör gereksinimi olan suşlar *H. influenzae*/*H. haemolyticus* ayrımı açısından Tablo 13'te gösterilen PCR karışımı hazırlanarak tarandı.

Tablo 13. *H. influenzae* Real-Time PCR Tespit Kiti için kullanılan PCR karışımı.

Komponent	Volüm (µL)
2X qPCR Mix	5
Hinflu Oligo Mix	2,5
Kalıp Nükleik Asit	2,5
İnternal kontrol	1
Total reaksiyon hacmi	11

- 2) Hazırlanan reaksiyon karışımı Tablo 14'te tarif edilen koşullarda amplifiye edildi.

Tablo 14. *H. influenzae* Real-Time PCR Tespit Kiti için uygulanan PCR protokolü

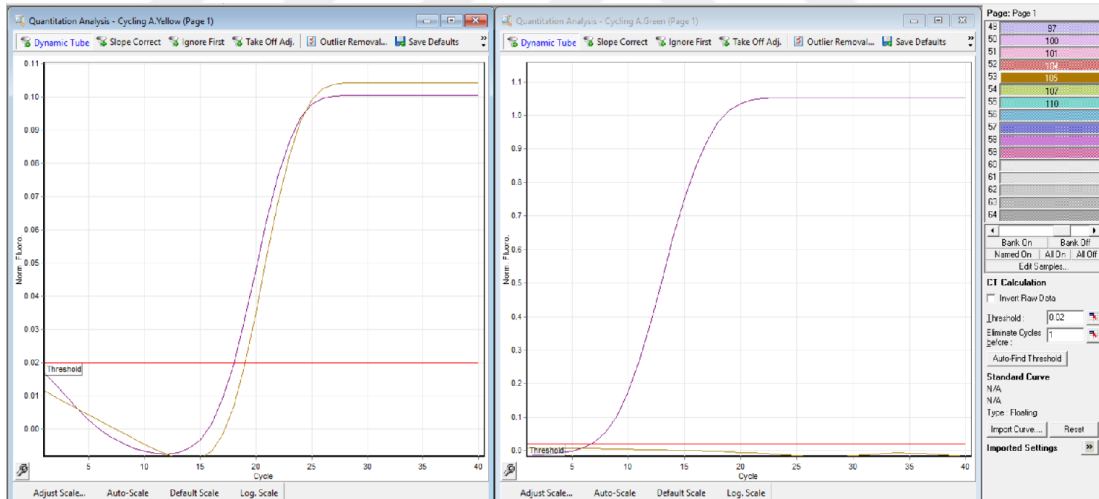
Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
95	300 saniye	1
95	10 saniye	40
55	30 saniye	
FAM / HEX Okuma		

- 3) *H. influenzae* Real-Time PCR Tespit Kitinin yorumlanması için Rotor-Gene®Q cihazı; “Dynamic Tube” etkin, “Slope Correct” pasif, “Outlier Removal” 0, eşik seviyesi 0,02 olarak ayarlandı. Her siklusta PC (pozitif reaktif kontrolü), NTC (Negatif kontrol eklenerek, kontaminasyon kontrolü), NRC (Kalıp DNA eklenmeden, kontaminasyon kontrolü) çalışıldı.

Tablo 15. *H. influenzae* Real-Time PCR Tespit Kiti için yorumlama kriterleri

	FAM (<i>H. influenzae</i>)	HEX (IC)	Yorum
PC	$Ct \leq 38$		Geçerli
NTC	Ct yok		Geçerli
NRC	Ct yok		Geçerli
Hasta örneği	$Ct \leq 38$	$Ct \leq 34$	Pozitif
Hasta örneği	$Ct > 38$	$Ct \leq 34$	Negatif

IC, internal kontrol; PC, pozitif reaktif kontrolü; NTC, negatif template kontrolü; NRC, negatif reaksiyon kontrolü.



Şekil 4. *H. influenzae* Real-Time PCR Tespit Kiti

1 no’lu örnek (mor eğri): *H. influenzae*; 105 no’lu örnek (sarı eğri): *H. influenzae* değil (*H. haemolyticus*)

3.4. *H. influenzae* Suşlarının Tip b Antiserum ile Serotiplendirilmesi

H. influenzae olarak tanımlanan kökenler Difco™ Haemophilus Influenzae Antiserum (BD, ABD) ile serotip b açısından test edildi. Temiz bir lam üzerine, bir damla

antiserum ve bir öze dolusu çikolata agarda üremiş olan kolonilerden aktarılıp iyice karıştırıldı. Lam bir dakika boyunca döndürüldü ve aglütinasyon değeriendirildi.

4+ %100 aglütinasyon (arka plan net- hafif puslu)

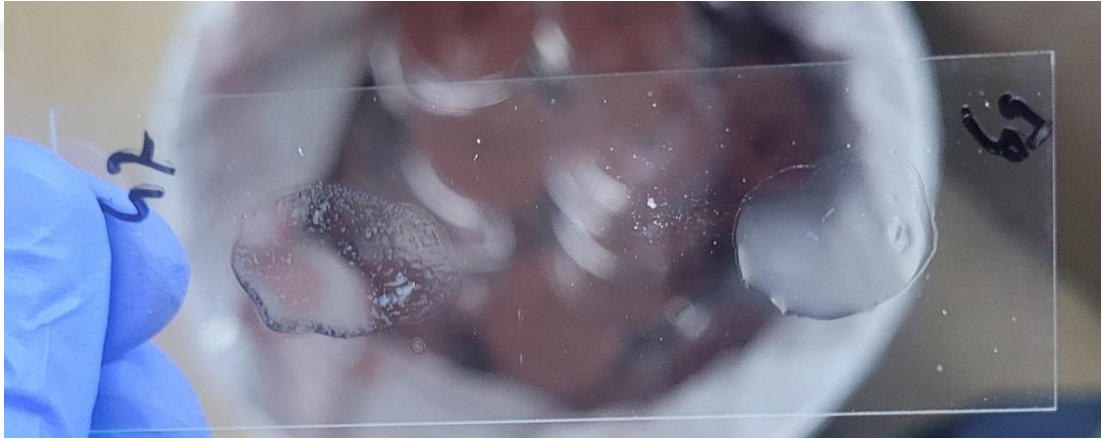
3+ %75 aglütinasyon (arka plan net- hafif bulanık)

2+ %50 aglütinasyon (arka plan net- orta seviyede bulanık)

1+ %25 aglütinasyon (arka plan net- bulanık)

- Aglütinasyon yok

1 dakika içinde 3+ veya daha büyük aglütinasyon pozitif sonuç olarak kabul edildi.



Şekil 5. Tip b antiserum ile *H. influenzae* tip b araştırılması

(sol-pozitif, sağ-negatif)

3.5. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

Kökenlerin beta laktamaz üretimi nitrosefin hidrolizi ile araştırıldı. Antibiyotik duyarlılık profillerini belirlemek amacıyla disk difüzyon yöntemiyle benzilpenisilin, ampisilin, amoksisilin klavulanat, sefaklor, seftriakson, sefotaksim, sefepim, meropenem, azitromisin, klaritromisin, nalidiksik asit, siprofloksasin, levofloksasin, moksifloksasin, trimetoprim-sülfametoksazol, tetrasiklin, rifampisin, kloramfenikol antibiyotikleri çalışıldı. Bunun yanında minimum inhibitör konsantrasyonlarının (MİK) değeriilerinin belirlenmesi için; sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle ampisilin, amoksisilin klavulanat, klaritromisin, siprofloksasin, tetrasiklin ve gradiyent strip test yöntemi ile trimetoprim-sülfametoksazol çalışıldı.

Disk difüzyon testi ile sıvı mikrodilüsyon/gradiyent strip test sonuçları arasında uyumsuzluk olan kökenler için testler aynı inokulum kullanılarak eş zamanlı olarak tekrarlandı.

3.5.1. Beta Laktamaz Varlığının Gösterilmesi

Kökenlerin beta laktamaz üretimi Cefinase (BD BBL™, ABD) diski kullanılarak araştırıldı. Disk, lam üzerine yerleştirilip bir damla saf suyla nemlendirildi. Steril bir öze ile koloniler alındı ve disk yüzeyine sürüldü. Beş dakika bekletildi. Diskin üzerinde sarıdan kırmızıya renk değişimi pozitif reaksiyon, renk değişimi olmaması negatif reaksiyon olarak değerlendirildi.

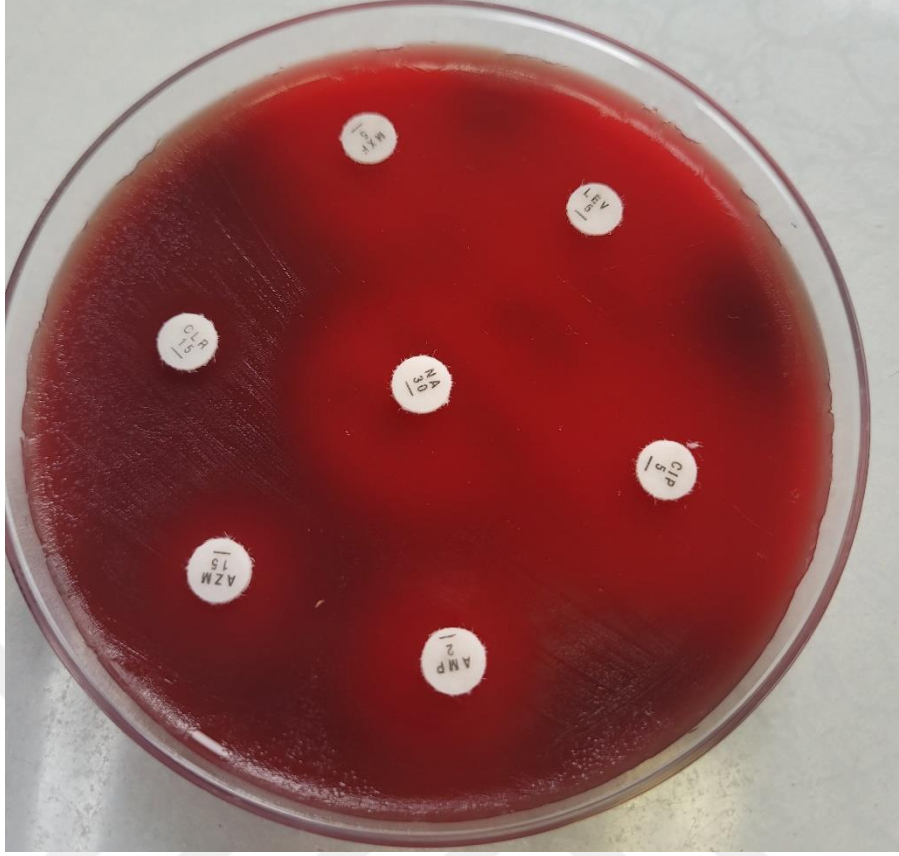


Şekil 6. Sefinaz diski ile beta laktamaz araştırılması

(sol-pozitif, sağ-negatif)

3.5.2. Disk Difüzyon Testi

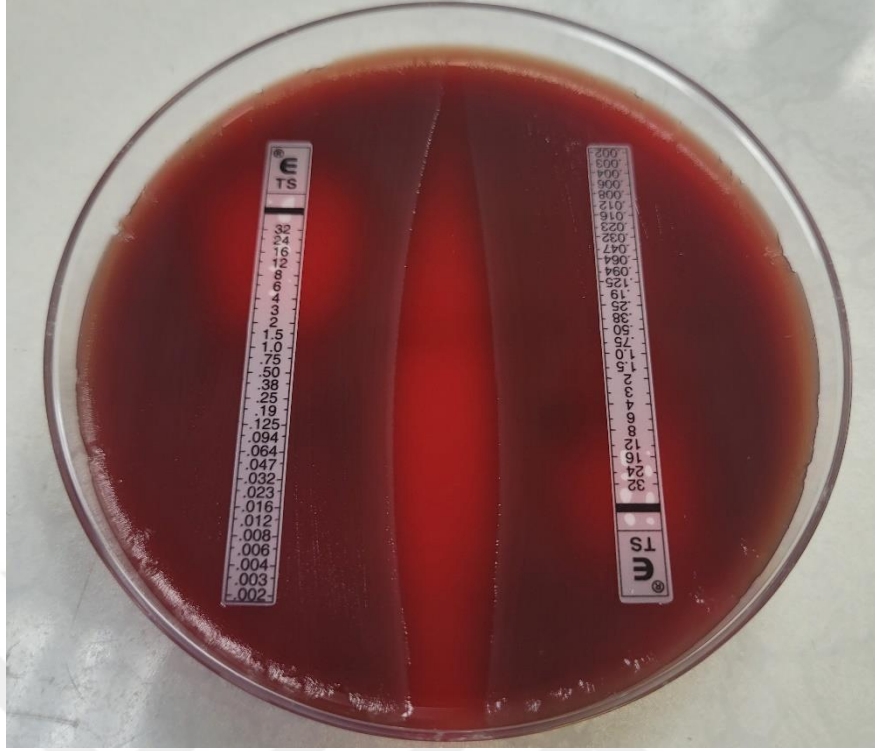
Test edilecek bakteriden 0,5 McFarland süspansiyon hazırlanıp Mueller Hinton Fastidious Agar (MH-F) (BD, ABD) üzerine yaygın ekim yapıldı. Antibiyotik diskleri yerleştirildi. %5 CO₂'li ortamda 35±1°C'de 18±2 saat inkübe edildi.



Şekil 7. Disk difüzyon testi

3.5.3. Gradyent Strip Test

Test edilecek bakteriden 0,5 McFarland süspansiyon hazırlanıp Mueller Hinton Fastidious Agar (MH-F) (BD, ABD) üzerine yaygın ekim yapıldı. Trimetoprim-sülfametoksazole (SXT) ait olan gradiyent strip test (E-test Biomeriux, Fransa) yerleştirildi. %5 CO₂'li ortamda 35±1°C'de 18±2 saat inkübe edildi.



Şekil 8. Gradient strip test

3.5.4. Sıvı Mikrodilüsyon Testi

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi EUCAST önerileri doğrultusunda katyon ayarlı Mueller-Hinton Fastidious sıvı besiyeri içinde antibiyotiklerin iki kat dilüsyonları hazırlanarak yapıldı. Son inokulum konsantrasyonu 5×10^5 CFU/mL olacak şekilde bakteri süspansiyonu inoküle edildi. %5 CO₂'li ortamda $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 'de 18 ± 2 saat inkübasyon sonrası gözle görülür üremenin durduğu en düşük antibiyotik konsantrasyonu minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) olarak belirlendi.

3.5.4.1. %50 Hemolizli At Kanı Stok Çözeltilisinin Hazırlanması

1. Defibrine at kanı eşit miktar deiyonize suyla aseptik olarak sulandırıldı.
2. Kan bir gece -20°C 'de dondurulup çözüldü. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.
3. Santrifüj edildi.
4. %50 hemolizli at kanı stok çözeltisi bölünerek -20°C 'de saklandı. Gereklikçe çözülerek kullanıldı.

3.5.4.2. β -Nicotinamide adenine dinucleotide (β -NAD) Stok Çözeltisinin Hazırlanması

1. Steril deiyonize su içerisinde konsantrasyonu 20 mg/mL olacak şekilde β -NAD (Sigma-Aldrich, ABD) çözündürüldü.
2. Çözelti 0.2 μ m membran filtreden geçirildi.
3. β -NAD stok çözeltisi bölünerek -20°C'de saklandı. Gereklikçe çözülerek kullanıldı.

3.5.4.3. MH-F Sıvı Besiyerinin Hazırlanması

1. Katyon ayarlı Mueller Hinton Broth (MHB) (BD BBL™, ABD) üretici talimatına göre distile suyla sulandırılıp otoklavlandı. Eklenecek at kanı miktarı kadar distile su az eklendi.
2. Besiyeri 42-45°C'ye soğuyunca litre başına 100 ml %50 hemolizli at kanı ve 1 ml β -NAD stok çözeltisi olacak şekilde besiyerine aseptik koşullarda eklendi ve iyice karıştırıldı.
3. Hazırlanan MH-F besiyeri +4°C'de saklandı.

3.5.4.4. Antibiyotik Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

1. Kullanılan antibiyotik tozları ve potensleri Tablo 16'da verilmiştir.

Tablo 16. Çalışmada kullanılan antibiyotik tozları ve potensleri

Antibiyotikler	Potens (μ g/mg)
Ampisilin (Sigma-Aldrich, ABD)	960
Amoksisilin (Sigma-Aldrich, ABD)	≥ 900
Klavulanik asit (Sigma-Aldrich, ABD)	-
Klaritromisin (Sigma-Aldrich, ABD)	1000
Siprofloksasin (Sigma-Aldric, ABD)	980
Tetrasiklin (Sigma-Aldrich, ABD)	1000

2. Antibiyotiklerin stok solüsyonları aşağıdaki formüle göre hazırlandı.

$$\text{Hacim (mL)} = \frac{\text{Ağırlık (mg)} \times \text{Potens (}\mu\text{g/mg)}}{\text{Konsantrasyon (}\mu\text{g/mL)}}$$

3. Antibiyotiklerin stok solüsyonunun hazırlanmasında ve dilüsyonunda kullanılan çözücü ve sulandırıcılar Tablo 17’de verilmiştir.

Tablo 17. Antibiyotik tozlarının çözücü ve sulandırıcıları

Antibiyotikler	Çözücü	Sulandırıcı
Ampisilin	Fosfat tamponu, pH 8.0, 0.1 mol/L	Müller Hinton Broth
Amoksisilin	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L	Müller Hinton Broth
Klavulanik asit	Fosfat tamponu, pH 6.0, 0.1 mol/L	Müller Hinton Broth
Klaritromisin	Metanol	Müller Hinton Broth
Siprofloksasin	Steril distile su	Müller Hinton Broth
Tetrasiklin	Steril distile su	Müller Hinton Broth

4. Ampisilin 1280 µg/mL, amoksisilin klavulanat 1280 µg/mL, siprofloksasin 20 µg/mL, klaritromisin 2560 µg/mL ve tetrasiklin 1280 µg/mL konsantrasyonda olacak şekilde stok solüsyonlar hazırlandı.
5. Hazırlanan stok solüsyon 1/10 oranda MHB ile sulandırıldı. Nihai konsantrasyonları ampisilin için 128 µg/mL, amoksisilin klavulanat için 128 µg/mL, siprofloksasin için 2 µg/mL, klaritromisin için 256 µg/mL ve tetrasiklin için 128 µg/mL’ye ulaştı.

3.5.4.5. Bakteri İnokulumu Hazırlanması

1. 24 saat inkübasyon sonrası çikolata agarda üremiş kolonilerden 0,5 McFarland standart bulanıklıkta bakteri süspansiyonu hazırlandı. (2×10^8 CFU/ml)
2. 9,9 ml SF içerisine 100 µL bakteri süspansiyonundan eklendi. (2×10^6 CFU/ml)
3. Hazırlanan bu süspansiyondan 4,5 mL MHB içerisine 0,5 mL eklendi. (2×10^5 CFU/mL)

3.5.4.6. Testin Yapılışı

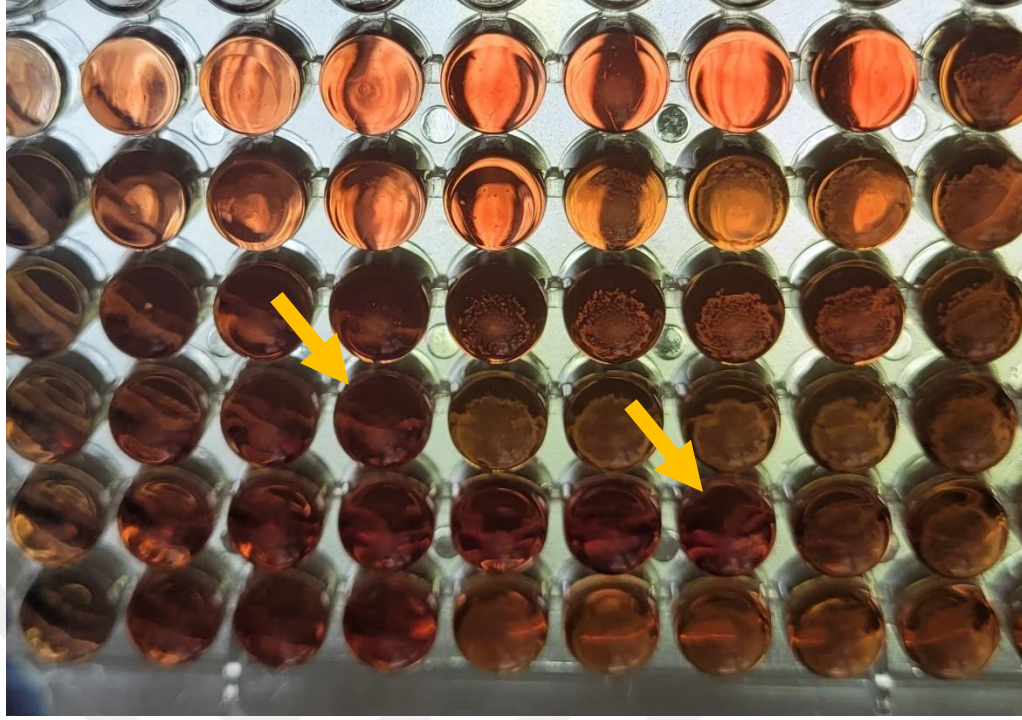
1. Steril U tabanlı 96 kuyucuklu mikropalaklar kullanıldı.
2. Tüm kuyucuklara 100 µL MH-F besiyeri eklendi.
3. İlk kuyucuğa 100 µL antibiyotik stok solüsyonu eklendi.

4. 1. kuyucuktan 10. kuyucuğa kadar antibiyotiğin seri dilüsyonu yapıldı.
5. Bakteri inokulumundan 11. kuyucuk hariç tüm kuyucuklara 100 µL eklendi.
6. Her bir izolat için, son kuyucuk inokulum kontrolü (pozitif kontrol, üreme kontrolü) ve 11. kuyucuk besiyerinin sterilite kontrolü (negatif kontrol) olarak kullanıldı.
7. *H. influenzae* ATCC® 49247 suşu kalite kontrol amaçlı kullanıldı.
8. Plaklar 35°C’de 16-20 saat inkübe edildi.
9. Üremenin görülmediği en düşük konsantrasyon, o antibiyotik için MİK olarak kaydedildi. (Şekil 9)
10. Mikroplakta bulunan antibiyotikler ve dilüsyon aralıkları Tablo 18’de verilmiştir.

Tablo 18. Mikroplakta bulunan antibiyotikler ve dilüsyon aralıkları (µg/mL)

Kuyucuk												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AMP	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	NC	PC
AMC	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	NC	PC
CIP	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,015	0,008	0,004	0,002	0,001	NC	PC
CLR	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	NC	PC
TET	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	NC	PC

AMP:Ampisilin, AMC: Amoksisilin klavulanat, CIP: Siprofloksasin, CLR: Klaritromisin, TET: Tetrasiklin, PC: Pozitif kontrol (Üreme kontrolü), NC: Negatif kontrol (Besiyeri kontrolü)



Şekil 9. Sıvı mikrodilüsyon testi

Sarı renkli ok ile gösterilen üremenin olmadığı ilk kuyucuk MİK kabul edildi.

3.5.5. Değerlendirme ve Yorum

Antibiyotik duyarlılık testleri değerlendirilirken EUCAST ve CLSI rehberlerinden yararlanıldı. Çalışmada kullanılan kalite kontrol suşları ve klinik sınır değerler için kullanılan rehberler Tablo 19 ve Tablo 20’de gösterilmiştir.

Tablo 19. Çalışmada kullanılan kalite kontrol suşları

	Antibiyotik adı	Standart Kontrol Suşu	Yorum
Disk difüzyon testi	Ampisilin (2µg)	<i>E. faecalis</i> ATCC®29212	EUCAST QC Tables v. 12.0
	Sefaklor	<i>S. pneumoniae</i> ATCC®49619	CLSI M100-32
	Diğer Diskler	<i>H. influenzae</i> ATCC®49247	CLSI M100-32
Sıvı mikrodilüsyon testi	Hepsi	<i>H. influenzae</i> ATCC®49247	CLSI M100-32
Gradyent strip test	Trimetoprim-sülfametoksazol	<i>H. influenzae</i> ATCC®49247	CLSI M100-32

Tablo 20. Klinik sınır değerler için kullanılan rehberler

	Antibiyotik adı	Yorum
Disk difüzyon testi	Sefaklor	CLSI M100-32
	Klaritromisin	CLSI M100-32
	Azitromisin	CLSI M100-32
	Diğer diskler	EUCAST v.12.0
Sıvı mikrodilüsyon testi	Klaritromisin	CLSI M100-32
	Diğer antibiyotikler	EUCAST v.12.0
Gradyent strip test	Trimetoprim-sülfametoksazol	EUCAST v.12.0

3.6.Moleküler Yöntemler ile Direnç Genlerinin Araştırılması

Dirençli bulunan suşlarda beta laktam grubu antibiyotiklere, kinolonlara ve trimetoprim-sülfametoksazole direnç mekanizmaları araştırıldı.

3.6.1. DNA İzolasyonu

3.3.3.1. numaralı bölümde anlatıldığı gibi GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific™, ABD) ile izole edilip -20°C’de saklanan DNA’lar, direnç genlerinin araştırılması için PCR reaksiyonlarında kalıp DNA olarak kullanıldı.

3.6.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

3.6.2.1. Çalışmada Kullanılan Primer Dizileri

H. influenzae (*H. haemolyticus*) ve *H. parainfluenzae* için *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* gen bölgeleri ve *bla*_{TEM}, *bla*_{ROB}, *ftsI*, *sul1*, *sul2* gen bölgelerinin PCR ile araştırılmasında kullanılan liyofilize haldeki primerler (Metabion, Almanya) kullanım öncesinde nükleaz içermeyen steril dH₂O ile sulandırıldı. Kullanılan primer dizileri Tablo 21’de gösterilmiştir.

Tablo 21. Çalışmada kullanılan primer dizileri

Gen	Primer	Baz dizisi (5'-3')	Gendeki pozisyonu	Amplikon büyüklüğü (bp)
<i>bla_{TEM}</i>	TEM-f	ACCAGTCACAGAAAAGCATC	312-331	327
	TEM-r	TTATCCGCCTCCATCCAGTC	619-638	
<i>bla_{ROB}</i>	ROB-f	TCCCGAAACCCAAAAATACG	360-379	338
	ROB-r	GATTGCCTGTTGCGTTATTG	678-697	
<i>ftsI</i>	Hi ftsI-f	GTTGMACATATCTCYGATGAG	712-732	1051
	Hi ftsI-r	CAGCYGMTTCAGCATCTTGC	1743-1762	
<i>gyrA</i>	Hi gyrA-f	CCGCCGCGTRYTVTTCT	138-154	375
	Hi gyrA-r	CCATTTGCTAAMAGHGY	496-512	
<i>gyrB</i>	Hi gyrB-f	GGAAAATCCWRCAGATGC	1095-1112	445
	Hi gyrB-r	AAGCAA YGTACGDATGTG	1522-1539	
<i>parC</i>	Hi parC-f	TGGTTTAAAACCYGTTCA	120-137	370
	Hi parC-r	AGCRGGTAAATATTGYGG	472-489	
<i>parE</i>	Hi parE-f	GAACGCTTATCATCACGCCA	1003-1022	471
	Hi parE-r	AGCATCBGCDAGAATRCASA	1454-1473	
<i>gyrA</i>	Hp gyrA-f	TCGACGTGTGCTTTTCTCCAT	138-158	405
	Hp gyrA-r	GTTGCCATCCCYACCGCRATACC	520-542	
<i>gyrB</i>	Hp gyrB-f	CCMGCWCTKTCRGARCTTTAY	1258-1278	446
	Hp gyrB-r	CCATCWARYGCAAGCATTAAYTC	1681-1703	
<i>parC</i>	Hp parC-f	TCTGAAYTKGGBTTAAATGCY	160-180	563
	Hp parC-r	ACCACGRCCDGTTCRTACAT	703-722	
<i>parE</i>	Hp parE-f	TAGTSAGYGGYCCTGYTYTAC	1172-1192	347
	Hp parE-r	AAAGAGBGRCRCARAGTARRGT	1498-1518	
<i>sul1</i>	sul1-f	CGGCGTGGGCTACCTGAACG	372-391	433
	sul1-r	GCCGATCGCGTGAAGTTCCG	785-804	
<i>sul2</i>	sul2-f	GCGCTCAAGGCAGATGGCATT	220-240	285
	sul2-r	GCGTTTGATACCGGCACCCGT	484-504	

TEM primeri; TEM β -laktamazı kodlayan *bla* gen parçası çoğaltıldı (87).

ROB primeri; ROB β -laktamazı kodlayan *bla* gen parçası çoğaltıldı (87).

Hi ftsI primeri; dejenere hale getirildi, *H. influenzae*'nın *ftsI* geni çoğaltıldı ve gendeki mutasyonları saptamak için dizi analizi yapıldı (87).

Hi gyrA, Hi gyrB, Hi parC, Hi parE primerleri; dejenere hale getirildi, *H. influenzae*'nin gyrA, gyrB, parC, parE gen parçaları çoğaltıldı ve kinolon direncine yol açan mutasyonları saptamak için dizi analizi yapıldı (60–62).

Hp gyrA, Hp gyrB, Hp parC, Hp parE primerleri; dejenere hale getirildi, *H. parainfluenzae*'nin gyrA, gyrB, parC, parE gen parçaları çoğaltıldı ve kinolon direncine yol açan mutasyonları saptamak için dizi analizi yapıldı (47,67,88).

sul1, sul2 primerleri; sülfonamid direncine yol açan sul1 ve sul2 direnç genleri çoğaltıldı (89).

3.6.2.2. PCR Karışımı ve Amplifikasyon Koşulları

PCR için Hot Start PCR Master Mix (2X) (NucleoGene, Türkiye) karışımı ve Labcycler (SensoQuest, Almanya) cihazı kullanıldı. Reaksiyon karışımları PCR kabini içerisinde, soğuk bloklar kullanılarak hazırlandı.

PCR reaksiyonlarında pozitif kontrol olarak kullanmak üzere; TEM suşu Prof. Dr. Bülent Bozdoğan'dan sağlandı. ROB suşu (*E. coli* pMON401) ise; Prof. Dr. Osman Birol Özgümüş'ten (Dr. George A. Jacoby'den Prof. Dr. Osman Birol Özgümüş'e) sağlanmış olup gen bölgelerini içerdiği dizi analizi ile doğrulanmış kökenlerdi. sul1 ve sul2 için pozitif kontrol kökenleri, bu çalışmada çalışılan örneklerden dizi analizine gönderilerek elde edildi. *H. influenzae* QRDR genleri için *H. influenzae* ATCC®49247 suşu, *H. parainfluenzae* QRDR genleri için bu çalışmadaki *H. parainfluenzae* suşlarından seçilerek pozitif kontroller sağlandı. Negatif kontrol olarak ise reaksiyon karışımlarının hazırlanmasında kullanılan dH₂O kullanıldı.

- 1) Dirençli bulunan suşlarda ilgili direnç genleri Tablo 22 ve 23'te gösterilen PCR karışımları hazırlanarak araştırıldı.

Tablo 22. *sul1* ve *sul2* için kullanılan PCR karışımı

Komponent	Volüm (µL)	
Master Mix	25	
Primerler (10 pmol/µL)	sul1-F	1
	sul1-R	1
	sul2-F	1
	sul2-R	1
DNA	5	
Nükleaz içermeyen steril dH ₂ O	16	
Total reaksiyon hacmi	50	

Tablo 23. *bla*_{TEM}, *bla*_{ROB}, *ftsI*, *gyrA*, *gyrB*, *parC* ve *parE* için kullanılan PCR karışımı

Komponent	Volüm (µL)	
Master Mix	12,5	
Primerler (10 pmol/µL)	Primer-F	0,5
	Primer-R	0,5
DNA	3	
Nükleaz içermeyen steril dH ₂ O	8,5	
Total reaksiyon hacmi	25	

- Hazırlanan reaksiyon karışımı Tablo 24'te tarif edilen koşullarda amplifiye edildi. Zayıf bant gözlenen durumlarda, PCR ürünü aynı protokolle tekrar çalışıldı. *sul1* ve *sul2* için izolatların hepsinde PCR reaksiyonu iki kez gerçekleştirildi.

Tablo 24. Direnç genlerinin amplifikasyonu için uygulanan PCR protokolü

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95	3 dakika	1
Denatürasyon	95	30 saniye	37
Bağlanma	Tm*	45 saniye	
Uzama	72	1 dakika**	
Son uzama	72	7 dakika	1
Bekleme	4	∞	1

*Bağlanma sıcaklığı; TEM:55, ROB:55, Hi fts:53, Hi gyrA:38, Hi gyrB:51, Hi parC:48, Hi parE:51, Hp gyrA:60, Hp gyrB:47, Hp parC:46, Hp parE:50, sul1 ve sul2:63°C yapıldı.

**Hi fts için 70 saniye yapıldı.

3.6.3. Agaroz Jel Elektroforezi

- 1) Agaroz jel elektroforezi için %1,5'luk jel hazırlandı. Bu amaçla 100 mL 1× Tris-borik asit-EDTA (TBE) tamponu (89 mM Tris, 89 mM borik asit, 2 mM EDTA, pH 8.3) içerisinde 1,5 gram agaroz (Sigma, ABD) ısıtılarak çözündürüldü.
- 2) Agarın 55°C'ye kadar soğuması beklendikten sonra, içerisine etidyum bromür solüsyonundan 10 µL eklenerek karışması sağlandı.
- 3) Akışkan haldeki sıcak jel, taraklı tepsiye dökülerek katılaşması bekledi.
- 4) Katılaştıktan sonra yatay elektroforez tankına (Bio-Rad, ABD) tepsi ile yerleştirildi. Jelin üzerini kaplayacak şekilde 1× TBE tamponu döküldü ve jelin içindeki tarak çıkarıldı.
- 5) Moleküler ağırlık belirleyicisi olarak ilk kuyucuğa 5 µL 100bp DNA Ladder (TransGen Biotech, Çin) yüklendi.
- 6) PCR ürünlerinden 5 µL alınıp, 3 µL 6X Loading Buffer (A.B.T.™, Türkiye) ile karıştırılıp geri kalan kuyucuklara yüklendi.
- 7) Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra güç kaynağının elektrotları tanka bağlandı ve 150 V lineer elektrik akımında 30 dakika boyunca elektroforez işlemi gerçekleştirildi.
- 8) Elektroforez işleminden sonra, jel görüntüleme cihazında (ChemiDoc MP, Biorad, ABD) incelendi.

3.6.4. Dizi Analizi

DNA saflaştırma ve Sanger dizi analizi BM Laboratuvarı, Ankara’da yapıldı. PCR ürünleri; *ftsI* için ileri ve geri primerler kullanılarak çift yön, *gyrA*, *gyrB*, *parC* ve *parE* için ileri primer kullanılarak tek yönlü dizi analizi gerçekleştirildi. Ayrıca *sul1* ve *sul2* için PCR ile pozitif bant gözlenen birer suş ve çalışma kökenlerinden *bla_{TEM}* PCR ile zayıf bant gözlenen üç suşun PCR ürünleri ileri primer kullanılarak tek yönlü dizi analizi yapıldı.

3.6.4.1. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

1. PCR ürünü saflaştırma işlemi için HighPrep™ PCR Clean-up System kiti (MAGBIO, ABD) kullanıldı. Bunun için aşağıdaki işlemler gerçekleştirildi.
2. PCR ürünleri plaklara aktarıldı.
3. Üzerine PCR reaksiyonu volümünün 1.8 katı olacak şekilde 1.8X HighPrep PCR reaktifi eklenip karıştırıldı.
4. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.
5. Plak, manyetik ayırma cihazının üzerine yerleştirildi. 2-3 dakika sonra süpernatant atıldı.
6. Her kuyucuğa 200 µl %70 etanol eklendi ve oda sıcaklığında 30 saniye inkübe edildi. Süpernatant atıldı.
7. Tekrar 200 µl %70 etanol eklendi ve oda sıcaklığında 30 saniye inkübe edildi. Süpernatant atıldı.
8. Oda sıcaklığında 3-5 dakika inkübe edildi.
9. Plak manyetik ayırma cihazından çıkarıldı.
10. Her kuyuya 40 µl elüsyon tamponu eklendi ve 5 kez pipetaj yapıldı.
11. Plak manyetik ayırma cihazının üzerine geri yerleştirildi. 1 dakika veya manyetik boncuklar solüsyondan ayrılana kadar beklendi.
12. Eluat (temizlenmiş süpernatant) yeni bir plağa aktarıldı.

3.6.4.2. Sekans PCR

1. Saflaştırılmış PCR ürünleri Hi-Di™ Formamide içinde yeniden süspanse edildi.
2. Saflaştırılmış PCR ürünlerinin döngüsel dizileme reaksiyonunda BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, ABD) kullanıldı.

3. Kullanılan reaktiflerin hacimleri Tablo 25’te gösterilmiştir.

Tablo 25. Sekans PCR’da kullanılan reaktifler ve hacimleri

Komponent	Volüm (µL)
BigDye® Terminator 3.1 Ready Reaction Mix	4
Buffer	2
Primer (3.2 µM)	2
Nükleaz içermeyen steril dH2O	10
DNA	2
Toplam	20

4. Hazırlanan reaksiyon karışımı Tablo 26’da tarif edilen koşullarda ABI 3730XL (Applied Biosystems, ABD) cihazında amplifiye edildi.

Tablo 26. Sekans PCR protokolü

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Başlangıç denatürasyonu	96	1 dakika	1
Denatürasyon	96	10 saniye	25
Bağlanma	50	5 saniye	
Uzama	60	4 dakika	
Bekleme	4	∞	1

3.6.4.3. Sekans PCR sonrası saflaştırma

1. Her hasta için kuyucuklara; ‘Sam tm solution’ 45 µL ve X terminatör 10 µL eklendi, karıştırıcıda 1800 rpm’da 20 dk çalkalandı.
2. Plak 1000 g’de 2 dk santrifüj edildi.
3. Saflaştırılmış örnekler, kapiller sistemli otomatik dizi analizi cihazı olan ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABD) cihazında sekanslandı.

3.6.4.4. Değerlendirme

Elde edilen diziler; *H. influenzae* ve *H. haemolyticus* suşları için *H. influenzae* Rd KW20, *H. parainfluenzae* suşları için *H. parainfluenzae* T3T1 ile karşılaştırılarak

mutasyonlar araştırıldı. Bu amaçla Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) 1.1 programı (www.megasoftware.net) kullanıldı.

sul1 ve *sul2* için elde edilen diziler, NCBI (National Center for Biotechnology Information) veri tabanında bulunan dizilerle BLAST® sekans analiz aracı kullanılarak değerlendirildi (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).



4. BULGULAR

4.1. *Haemophilus spp.* İzolatları

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı Bakteriyoloji Ünitesinde Haziran 2020-Aralık 2021 tarihleri arasında izole edilen 95 hastaya ait 96 *Haemophilus* kökeni çalışmaya alındı. Bir hastadan farklı epizodlara ait ve farklı duyarlılık profillerine sahip iki suş çalışmaya dahil edildi.

Tür dağılımına bakıldığı zaman kökenlerin %51'i *H. influenzae*, %44.7'si *H. parainfluenzae*, %4.1'i *H. haemolyticus*'tu. Numune dağılımı incelendiğinde; tüm örnekler içerisinde *Haemophilus* kökenlerinin en fazla izole edildiği örnek grubunun solunum yolu örnekleri (%94.7) oluşturmaktaydı. Hastaların çoğunu erkek cinsiyetin (%68.7) ve yetişkin yaş grubunun (%89.5) oluşturduğu görüldü. Hastaların yarısı yatan hastaydı (%50), yatan hastaların çoğunluğu yoğun bakım ünitelerinde yatmaktaydı (%29.1) ve büyük çoğunluğunun ek hastalığı mevcuttu (%90.6). Klinik örneklerle ve hastalara ait bilgiler Tablo 27'de verilmiştir.

Tablo 27. *Haemophilus* kökenlerinin izole edildiği hastalar ve örneklerin dağılımı

	<i>H. influenzae</i>	<i>H. parainfluenzae</i>	<i>H. haemolyticus</i>	Toplam sayı (%)
Klinik Numune	49	43	4	96
Balgam	22	30	4	56 (58.3)
ETA	12	5	-	17 (17.7)
BAL	8	5	-	13 (13.5)
NTA	4	1	-	5 (5.2)
Yara	1	2	-	3 (3.1)
Plasenta	1	-	-	1 (1)
Göz akıntısı	1	-	-	1 (1)

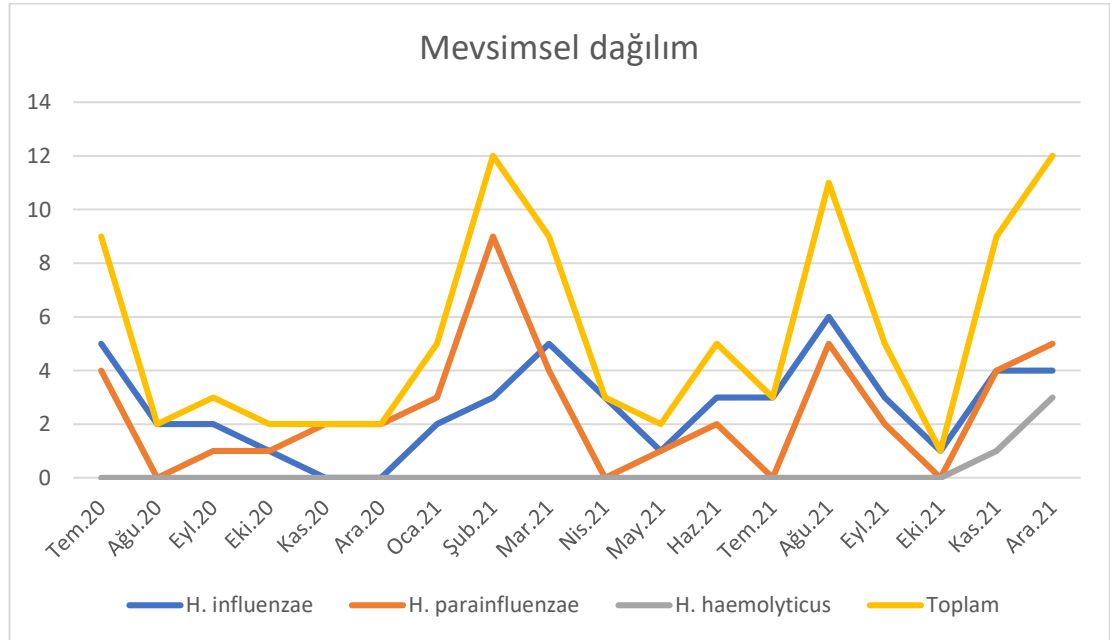
Cinsiyet				
Kadın	11	16	3	30 (31.2)
Erkek	38	27	1	66 (68.7)
Yaş Grubu				
0-6 ay	1	0	0	1 (1.0)
6 ay-18 yaş	5	4	0	9 (9.3)
18-39	7	6	1	14 (14.5)
40-49	5	10	0	15 (15.6)
50-59	10	9	0	19 (19.7)
60-64	5	2	1	8 (8.3)
≥65 yaş	16	12	2	30 (31.2)
Klinikler				
Yatan Hasta	22	25	1	48 (50.0)
Servis	5	15	-	20 (20.8)
Göğüs hastalıkları	-	5	-	5 (5.2)
Perinatoloji	1	1	-	2 (2)
Enfeksiyon	-	2	-	2 (2)
Diğer*	4	7		11 (11.4)
YBU	17	10	1	28 (29.1)
Dahiliye	4	3	1	8 (8.3)
Anestezi	3	2	-	5 (5.2)
Beyin cerrahi	3	2	-	5 (5.2)
Nöroloji	4	-	-	4 (4.1)
Göğüs hastalıkları	2	-	-	2 (2)
Diğer*	2	2	-	4 (4.1)
Poliklinik	25	19	3	47 (48.9)
Göğüs hastalıkları	15	14	2	31 (32.2)
Pediatric göğüs hastalıkları	4	2	-	6 (6.2)
Hematoloji KİT	5	1	-	6 (6.2)
Diğer*	1	2	1	4 (4.1)
Dış merkez	1	-	-	1 (1)
Ek Hastalık	44	39	4	87 (90.6)
HT	15	13	2	30 (31.2)
DM	6	13	1	20 (20.8)

KOAH	9	9	2	20 (20.8)
Bronşektazi	6	6	0	12 (12.5)
Hematolojik CA	5	3	1	9 (9.3)
KBY	4	3	1	8 (8.3)
Akciğer CA	5	3	0	8 (8.3)
Astım	2	5	0	7 (7.2)
İmmün yetmezlik hastalığı	5	2	0	7 (7.2)
Otoimmün hastalık	1	5	1	7 (7.2)
Kistik fibrozis	1	2	0	3 (3.1)
Ek Hastalık Yok	5	4	0	9 (9.3)

*Bir hasta olan klinikler diğer olarak alındı.

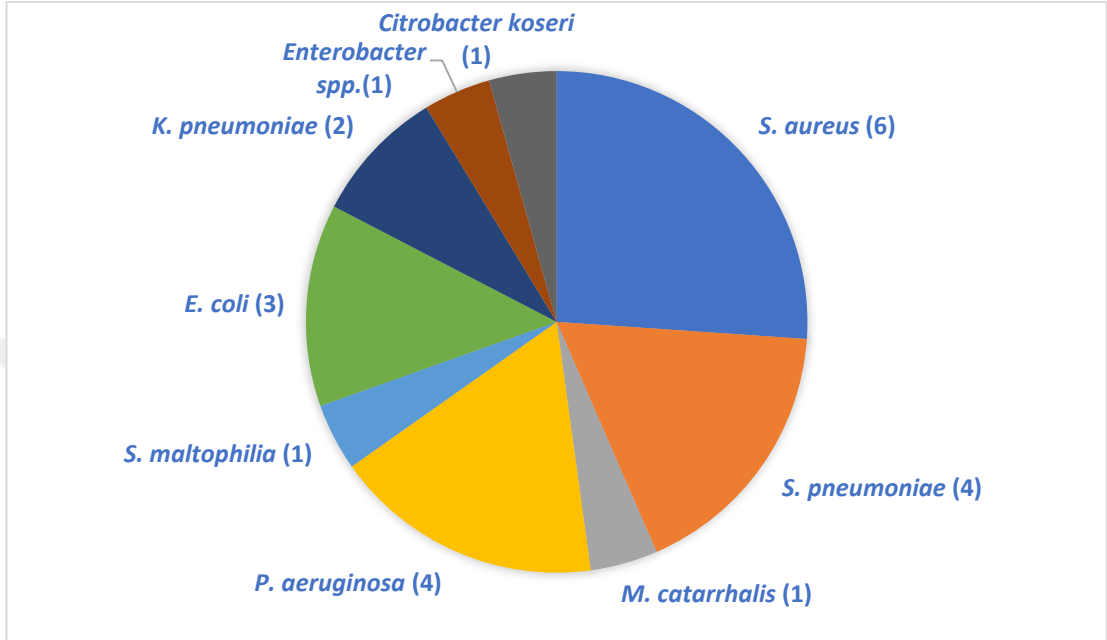
ETA, endotrakeal aspirat; BAL, bronkoalveolar lavaj; NTA, nazotrakeal aspirat; KİT, kemil iliği transplantasyonu; YBU, yoğun bakım ünitesi; HT, hipertansiyon; DM, diyabetes mellitus; KOAH, kronik obstrüktif akciğer hastalığı; CA, kanser; KBY, kronik böbrek yetmezliği.

Haemophilus kökenlerinin izolasyonunun mevsimsel dağılımına bakıldığı zaman; özellikle kış aylarında artış gösterdiği ve Şubat-Mart, Ağustos, Kasım-Aralık aylarında izole edilen suş sayılarının pik yaptığı gözlemlendi. İzole edilen suşların mevsimsel dağılımı Şekil 10'da gösterilmiştir.



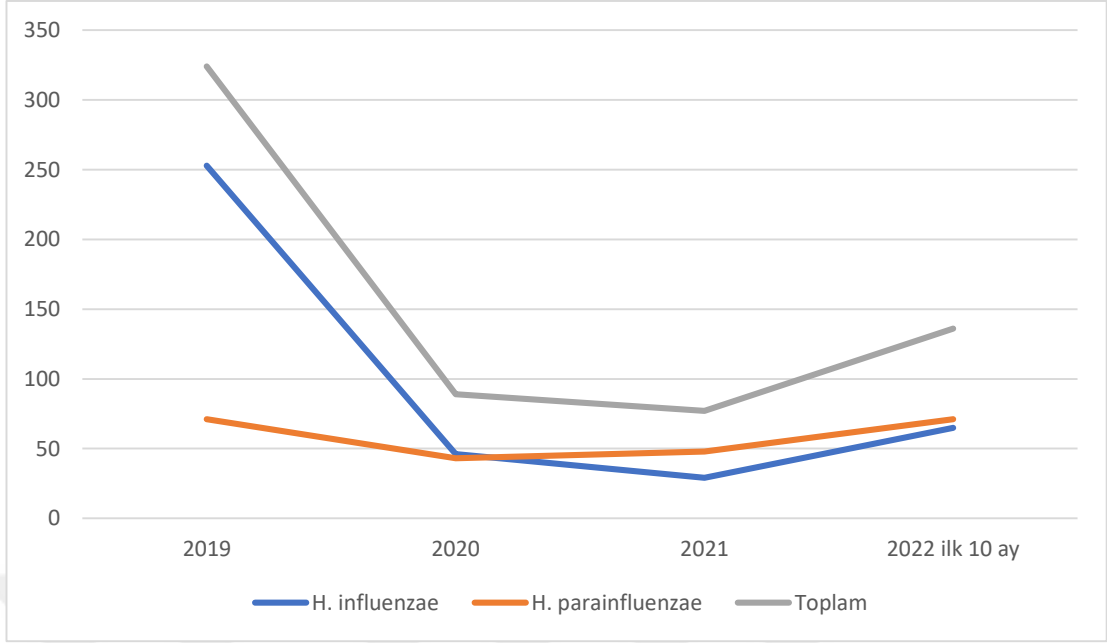
Şekil 10. *Haemophilus* kökenlerinin mevsimsel dağılımı

Haemophilus suşlarının izole edildiği numunelerin 20'si (%20.8) polimikrobiyalı. Bunların dördünde üç etken izole edildi. Bir hastada tüberküloz birlikteliği vardı. COVID-19 birlikteliği hiçbir hastada yoktu. Polimikrobiyal örneklerdeki mikroorganizma dağılımı Şekil 11'de verilmiştir.



Şekil 11. Polimikrobiyal numunelerdeki etkenleri dağılımı

Çalışma tasarlanırken önceki yıllarda Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı Bakteriyoloji Ünitesinde üretilen *Haemophilus* kökenlerinin izolasyon sayıları ve antibiyotik duyarlılık profilleri dikkate alındı. Ancak Türkiye’de ilk COVID-19 vakası 2020 Mart ayında görüldükten sonra gelen solunum yolu örnekleri ve izole edilen *Haemophilus* kökenlerinde ciddi bir azalma gözlemlendi. Yeterli izolat sayısına ulaşamadığı için çalışmaya 2020 Haziran sonundan 2021 Aralık sonuna kadar olan sürede izole edilen *Haemophilus* kökenleri dahil edildi. Ocak 2019-Ekim 2022 tarihleri arasında izole edilen *Haemophilus* kökenlerinin değişimi Şekil 12’de gösterilmiştir.



Şekil 12. Erciyes Üniversitesi Hastanesi Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda izole edilen *Haemophilus* kökenlerinin yıllar içerisinde değişimi

4.2. Tanımlama Sonuçları

Tüm isolatlar, XV faktör gereksinimi ve MALDI-TOF MS ile tanımlandı. X ve V faktör gereksinimi olan suşlar, *H. influenzae*/*H. haemolyticus* ayrımı yapılması için *H. influenzae* Real-Time PCR Tespit Kiti ile çalışıldı. PCR testi altın standart yöntem olarak kabul edildi.

H. influenzae olarak tanımlanan 49 suşun; MALDI-TOF MS ile dördü (%8.1), XV testi ile ikisi (%4) tür düzeyinde yanlış tanımlandı. *H. haemolyticus* olarak tanımlanan dört suş; XV, MALDITOF-MS ve PCR ile uyumlu olarak tanımlandı. *H. parainfluenzae* olarak tanımlanan 43 suş ise; XV ve MALDI-TOF MS ile uyumlu olarak tanımlandı, bu suşların PCR ile tanımlaması yapılmadı. Bu yöntemlerle elde edilen tanımlama sonuçları Tablo 28'de gösterilmiştir.

Tablo 28. XV Testi, MALDI-TOF MS ve *H. influenzae* Real-Time PCR Tespit Kiti'nden elde edilen sonuçlar ve suşların tanımlanması

MALDI-TOF MS					
	PCR	XV	Tanımlama	Skor	Yorum
Suş sayısı					
<i>H. influenzae</i> (n=49)					
40				≥2.00	Uyumlu (n=43)
3	+	X+V	<i>H. influenzae</i>	1.70-1.99	
0				<1.70	
2				≥2.00	MALDI-TOF MS
1	+	X+V	<i>H. parainfluenzae</i>	1.70-1.99	uyumsuz
1				<1.70	(n=4)
1				≥2.00	XV uyumsuz (n=2)
1	+	V	<i>H. influenzae</i>	1.70-1.99	
0				<1.70	
<i>H. haemolyticus</i> (n=4)					
2				≥2.00	Uyumlu (n=4)
1	-	X+V	<i>H. haemolyticus</i>	1.70-1.99	
1				<1.70	
<i>H. parainfluenzae</i> (n=43)					
30				≥2.00	Uyumlu (n=43)
12	x	V	<i>H. parainfluenzae</i>	1.70-1.99	
1				<1.70	

4.3. *H. influenzae* Suşlarının Tip b Antiserum ile Serotiplendirilmesi

H. influenzae olarak tanımlanan 49 izolattın 12'si (%24.4) antiserum ile tip b olarak bulundu. Hastalara ve numunelere ait bilgiler Tablo 29'da yer almaktadır.

Tablo 29. Antiserum ile Hib bulunan kökenler ve izole edildiği hasta bilgileri

Örnek numarası	Klinik numune	Yaş	Cinsiyet	Ek bilgi
1	ETA	62	E	SVH + YBU hastası
12	Balgam	55	K	Geçirilmiş SVH + astım + OSAS+ KBY + HT + Poliklinik hastası
16	ETA	65	E	SVH + YBU hastası
35	BAL	64	E	AC CA + KOAH + KAH + Poliklinik hastası
41	Balgam	17	K	Bronşektazi + <i>H. influenzae</i> kolonizasyonu + Poliklinik hastası
47	Balgam	71	K	HT + orofaringeal ve özefageal SCC + Servis hastası
50	Balgam	57	E	HT + Multipl myelom + KİT + Poliklinik hastası
54	ETA	51	E	KAH + YBU hastası
60	ETA	73	E	HT + Myastenia gravis + YBU hastası
74	Balgam	57	E	50 numaralı hasta Poliklinik hastası
101	Balgam	7	E	Kistik fibrozis + Poliklinik hastası
110	Göz akıntısı	0	E	Preseptal selülit + Poliklinik hastası

ETA, endotrakeal aspirat; BAL, bronkoalveolar lavaj; SVH, serebrovasküler hastalık; YBU, yoğun bakım ünitesi; OSAS, obstrüktif uyku apnesi sendromu; KBY, kronik böbrek yetmezliği; HT, hipertansiyon; AC CA, akciğer kanseri; KOAH, kronik obstrüktif akciğer hastalığı; KAH, koroner arter hastalığı; KİT, kemik iliği transplantasyonu.

4.4. Beta Laktamaz Varlığının Gösterilmesi

Tüm izolatlarda sefinaz diski ile beta laktamaz üretimi araştırıldı. Dört *H. influenzae*, beş *H. parainfluenzae* olmak üzere toplam dokuz izolatta (%9,3) beta laktamaz üretimi saptandı.

4.5. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Sonuçları

Çalışma kapsamında test edilen 96 *Haemophilus* izolatının disk difüzyon testine göre; %46.8'i ampisiline, %96.8'i amoksisilin klavulanata, %76'sı siprofloksasin, %77'si trimetoprim-sülfametoksazole, %61.4'ü klaritromisine, %91.6'sı tetrasikline, %84.3'ü rifampisine ve %91.6'sı kloramfenikole duyarlı bulundu. Sıvı mikrodilüsyon testine göre; %67.7'si ampisiline, %96.8'si amoksisilin klavulanata, %79.1'i siprofloksasine, %78.1'i klaritromisine ve %92.7'si tetrasikline duyarlı bulundu. Gradyent strip test sonucuna göre ise; %73.9'u trimetoprim-sülfametoksazole duyarlı bulundu.

Üç veya daha fazla antibiyotik grubuna dirençli olan kökenler çoklu ilaç dirençli olarak (MDR) kabul edildi. MDR oranları tüm kökenlerde, *H. influenzae*, *H. parainfluenzae* ve *H. haemolyticus* kökenleri için sırasıyla; %32.2, %18.3, %44.1 ve %75 olarak bulundu.

Disk difüzyon testi ile sıvı mikrodilüsyon/gradyent strip test sonuçları genel olarak uyumlu olmakla birlikte, ampisilin ve klaritromisine duyarlılık sonuçlarında yöntemler arası farklılıklar gözlemlendi. Disk difüzyon testi ile 51 suş, sıvı mikrodilüsyon testi ile 31 suş ampisilin dirençli bulundu. Mikrodilüsyon testi ile dirençli bulunan suşların hepsi disk difüzyon testi ile dirençli olarak saptandı.

Antibiyotik duyarlılık testi sonuçları Tablo 30 ve Tablo 31'de, MİK50, MİK90 değerleri ve MİK aralıkları ise Tablo 32'de gösterilmiştir.

Tablo 30. Disk difüzyon testine göre duyarlılık sonuçları

	<i>H. influenzae</i>			<i>H. parainfluenzae</i>			<i>H. haemolyticus</i>		
	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)
BP	36.7	-	63.2	9.3	-	90.6	-	-	100
AMP	55.1	-	44.8	37.2	-	62.7	50	-	50
AMC	100	-	-	93.0	-	6.9	100	-	-
CEC	61.2	2.0	36.7	79.0	4.6	16.2	100	-	-
CRO	77.5	-	22.4	39.5	-	60.4	25	-	75
CTX	79.5	-	20.4	44.1	-	55.8	50	-	50
FEP	83.6	-	16.3	48.8	-	51.1	25	-	75
MEM	100	-	-	90.6	-	9.3	100	-	-
NAL	83.6	-	16.3	65.1	-	34.8	75	-	25
MOX	81.6	-	18.3	44.1	-	55.8	50	-	50
LEV	83.6	-	16.3	65.1	-	34.8	75	-	25
CIP	83.6	-	16.3	65.1	-	34.8	75	-	25
SXT	69.3	2.0	28.5	83.7	2.3	13.9	100	-	-
AZT	95.9	-	4.0	86.0	-	13.9	100	-	-
CLR	75.5	18.3	6.1	51.1	6.9	41.8	-	75	25
TET	100	-	-	81.3	-	18.6	100	-	-
RIF	97.9	-	2.0	72.0	-	27.9	50	-	50
C	97.9	-	2.0	86.0	-	13.9	75	-	25

Tablo 31. Sıvı mikrodilüsyon/gradyent strip teste göre duyarlılık sonuçları

	<i>H. influenzae</i>			<i>H. parainfluenzae</i>			<i>H. haemolyticus</i>		
	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)
AMP	71.4	-	28.5	60.4	-	39.5	100	-	-
AMC	97.9	-	2.0	95.3	-	4.6	100	-	-
CIP	87.7	-	12.2	69.7	-	30.2	75	-	25
SXT	65.3	2.0	32.6	81.3	4.6	13.9	100	-	-
CLR	85.7	10.2	4.0	67.4	20.9	11.6	100	-	-
TET	100	-	-	83.7	-	16.2	100	-	-

AMP, ampisilin; AMC, amoksisilin klavulanat; CIP, siprofloksasin; SXT, trimetoprim-sülfametoksazol; CLR, klaritromisin; TET, tetrasiklin.

Tablo 32. MİK50, MİK90 ve MİK aralığı

	<i>H. influenzae</i>			<i>H. parainfluenzae</i>		
	MİK50	MİK90	MİK aralığı	MİK50	MİK90	MİK aralığı
AMP	0,5	4	0,125->32	1	>32	≤0,06->32
AMC	0,5	2	≤0,06-4	0,5	2	0,125-16
CIP	0,004	0,125	0,002->0,5	0,004	>0,5	0,002->0,5
SXT	0,094	>32	0,004->32	0,016	>32	≤0,002->32
CLR	4	16	1-32	8	32	0,25->64
TET	0,5	1	≤0,06-2	1	16	0,25->64

AMP, ampisilin; AMC, amoksisilin klavulanat; CIP, siprofloksasin; SXT, trimetoprim-sülfametoksazol; CLR, klaritromisin; TET, tetrasiklin.

Hib ve Hib dışı *H. influenzae* izolatlarının duyarlılıkları karşılaştırıldığı zaman; Hib dışı izolatlarda çoğu antibiyotiğe direnç oranı daha yüksek olarak bulundu. Farklı olarak; amoksisilin klavulanat dirençli bir izolat Hib kökeniydi ve sefotaksim, sefepim ve kinolon direnç oranı Hib kökenlerinde daha fazla olarak saptandı. Hib ve Hib dışı *H. influenzae* izolatlarının duyarlılıklarının karşılaştırılması Tablo 33'te verilmiştir.

Tablo 33. Hib ve Hib dışı *H. influenzae* izolatlarının duyarlılıklarının karşılaştırılması

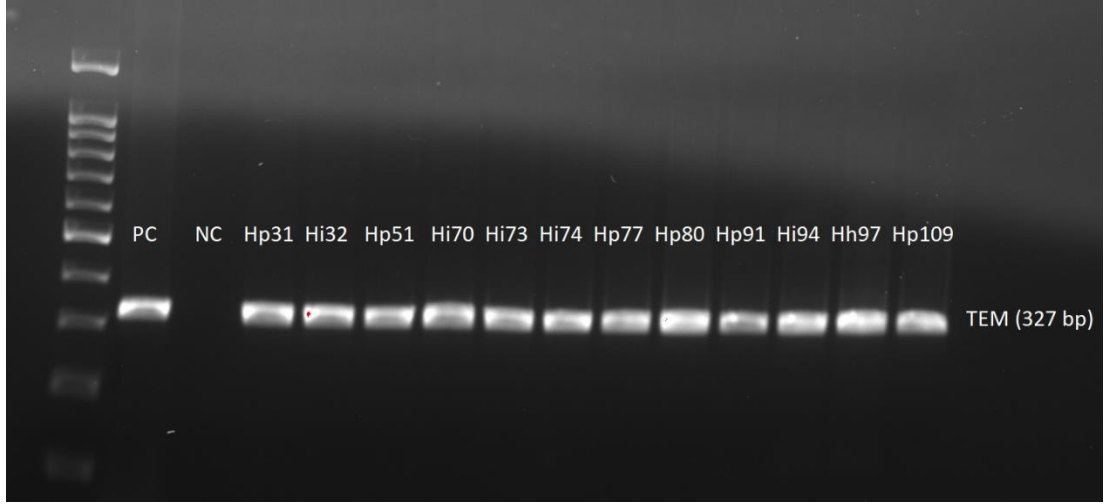
	Hib (n=12)			Hib dışı <i>H. influenzae</i> (n=37)		
	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)
BP	41.6	-	58.3	35.1	-	64.8
AMP DD	66.6	-	33.3	51.3	-	48.6
AMP MD	75.0	-	25.0	70.2	-	29.7
AMC DD	100	-	-	100	-	-
AMC MD	91.6	-	8.3	100	-	-
CEC	66.6	-	33.3	59.4	2.7	37.8
CRO	83.3	-	16.6	75.6	-	24.3
CTX	75.0	-	25.0	81.0	-	18.9
FEP	83.3	-	16.6	83.7	-	16.2
MEM	100	-	-	100	-	-
NAL	75.0	-	25.0	86.4	-	13.5
MOX	75.0	-	25.0	83.7	-	16.2
LEV	75.0	-	25.0	86.4	-	13.5

CIP DD	75.0	-	25.0	86.4	-	13.5
CIP MD	75.0	-	25.0	91.8	-	8.1
SXT DD	75.0	-	25.0	67.5	2.7	29.7
SXT E-test	75.0	-	25.0	62.1	2.7	35.1
AZT	100	-	-	94.5	-	5.4
CLR DD	83.3	16.6	-	72.9	18.9	8.1
CLR MD	100	-	-	81.0	13.5	5.4
TET DD	100	-	-	100	-	-
TET MD	100	-	-	100	-	-
RIF	100	-	-	97.2	-	2.7
C	100	-	-	97.2	-	2.7

4.6. Beta Laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmalarının Belirlenmesi

4.6.1. *bla*_{TEM} ve *bla*_{ROB} Direnç Genlerinin Varlığı

Disk difüzyon testi veya sıvı mikrodilüsyon testi ile ampisiline dirençli bulunan 51 suş (22 *H. influenzae*, 27 *H. parainfluenzae*, 2 *H. haemolyticus*) *bla*_{TEM} ve *bla*_{ROB} genlerinin varlığı açısından PCR ile tarandı. Bu izolatların 12'sinde (5 *H. influenzae*, 6 *H. parainfluenzae*, 1 *H. haemolyticus*) *bla*_{TEM} genine ait primerler ile 327 bp büyüklüğünde bant saptandı. Nitrosefin hidrolizi pozitif saptanan dokuz izolatın tamamında *bla*_{TEM} geni pozitif bulundu. Ayrıca; ampisiline dirençli, nitrosefin hidrolizi negatif olan üç izolatta (Hp80, Hi94, Hh97) zayıf bant görüldü. PCR ürünleri aynı protokol ile bir kez daha çalışıldı ve belirgin bantlar gözlendi. Bu üç izolat, ileri düzey inceleme için dizi analizi yapıldı. *bla*_{TEM} geni pozitif bulunan 12 izolata ait jel görüntüsü Şekil 13'te verilmiştir. İzolatların hiçbirinde PCR ile *bla*_{ROB} genine ait bant görülmedi.



Şekil 13. PCR ile *bla*_{TEM} geni pozitif saptanan izolatlara ait jel görüntüsü

PC: Pozitif kontrol, NC: Negatif kontrol

4.6.2. *bla*_{TEM} Genlerinin Dizi Analizi Sonuçları

Nitrosefin hidrolizi pozitif bulunan BLPAR suşlarının (n=9) MİK'i ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ ve disk çapı 6 mm idi. Diğer üç izolatın nitrosefin hidrolizi ve direnç düzeyleri farklıydı. Bu izolatların bu çalışmada amplifiye edilen 327 bp'lik kısmın dizi analizi TEM-1 geni dizisi ile aynı bulundu. İzolatlara ait bilgiler ve dizi analizi sonuçları Tablo 34'te verilmiştir.

Tablo 34. *bla*_{TEM} geni pozitif BLPAR ve BLPACR suşlar

	Nitrosefin	AMP (mm)	AMP MİK ($\mu\text{g/mL}$)	TEM PCR	TEM dizi analizi
Hp 80	-	14	1	Zayıf +	*
Hi 94	-	13	1	Zayıf +	*
Hh 97	-	16	0,5	Zayıf +	*
Diğer**	+	6	≥ 16	+	Yapılmadı

AMP, ampisilin.

*Bu çalışmada kullanılan primerler ile amplifiye edilen 327 bp'lik dizi TEM-1 ile aynı bulundu.

**Diğer *bla*_{TEM} geni pozitif olan kökenler.

4.6.3. *ftsI* Gen Mutasyonları

4.6.3.1. *H. influenzae*

Ampisilin dirençli 22 *H. influenzae*'nin beşinde *bla*_{TEM} geni pozitif olarak bulundu. Bu beş izolatın biri amoksisilin klavulanat dirençli olduğu için BLPACR, diğer dördü ise BLPAR olarak sınıflandırıldı. Geri kalan 17 izolat BLNAR olarak sınıflandırıldı. BLNAR ve BLPACR suşlarına *ftsI* gen amplifikasyonu için PCR yapıldı. İki suş amplifiye edilemedi. Geri kalan 16 izolatın PCR ürünleri dizi analizi yapıldı. Mutasyonlar *H. influenzae* Rd KW20 suşu ile karşılaştırıldı.

BLNAR kökenlerin hepsi zayıf BLNAR (grup I ve II), BLPACR kökeni BLPACR grup I olarak bulundu. Ampisilin MİK'leri; 1-8 µg/mL aralığındaydı. Dizi analizi sonucu saptanan mutasyonlar ve BLNAR, BLPACR sınıflandırması Tablo 35'te yer almaktadır.

Tablo 35. *H. influenzae* kökenlerinde saptanan *ftsI* gen mutasyonları ve BLNAR/BLPACR sınıflaması

Rd	Aminoasit pozisyonları																BLNAR
	350	357	368	377	385	389	437	490	502	511	517	526	530	532	547	554	
	D	S	A	M	S	L	A	G	A	V	R	N	A	T	V	A	
10	N						S					K			I	T	Ila
11	N						S					K			I	T	Ila
24								E				K	S				Ila
25								E		A		K			I		Ila
26	N								V			K			I		Ilb
35	N								V			K			I		Ilb
49												K	S		I		Ila
50	N								T			K			I		Ilc
61	N			I					V			K			I		Ilb
72	N			I				E	V			K			I		Ilb
79	N								T			K			I		Ilc
82			T						T			K					Ilc
100	N							E				K	S				Ila
107									V		H						I
110	N	N		I	T						H			S	I		I
BLPACR																	
74								E				K	S				I

Dizi analizi yapılamayan iki izolat tabloda yer almamaktadır.

4.6.3.2. *H. parainfluenzae* ve *H. haemolyticus*

H. parainfluenzae için *ftsI* genini çoğaltmaya yönelik primer tasarlandı ama hazırlanan primer çalışmadı. *H. parainfluenzae* ve *H. haemolyticus* için *ftsI* genleri amplifiye edilemedi.

4.7. Beta Laktam Antibiyotiklere Dirençte Fenotipik ve Genotipik Test Sonuçlarının Yorumlanması

4.7.1. Fenotip ve Genotip Sonuçlarına Göre Sınıflandırma

Ampisiline dirençli tüm suşlarda *bla*_{TEM} ve *bla*_{ROB} genleri araştırıldı. Ama *ftsI* gen mutasyonları sadece *H. influenzae* suşlarında bakıldı. Bu sebeple, *H. influenzae*'nin fenotipik ve genotipik testleri tam olarak yapılmış oldu. *H. influenzae* için ampisilin disk difüzyon testi/sıvı mikrodilüsyon testi ile moleküler test sonuçlarının karşılaştırılması ve sınıflandırma Tablo 36'da verilmiştir.

Tablo 36. *H. influenzae* kökenlerinin beta laktam antibiyotikler açısından fenotipik ve genotipik test sonuçları ve sınıflandırılması

Suş sayısı	Nitrosefin	AMP DD/MD	AMC DD/MD	TEM	<i>ftsI</i>	Sınıflandırma: n (%)	
27	-	S/S	S/S	-	x	BLNAS: 27 (55.1)	
3	+	R/R	S/S	+	x	BLPAR: 4 (8.1)	
1	-	R/S	S/S	+ (zayıf)	x		
1	-	R/S	S/S	-	R517H	BLNAR I: 2	BLNAR :17 (34.6)
1	-	R/R	S/S	-			
3	-	R/S	S/S	-	N526K	BLNAR IIa: 6	
3	-	R/R	S/S	-		BLNAR IIb: 4	
2	-	R/S	S/S	-	N526K +A502V	BLNAR IIc: 3	
2	-	R/R	S/S	-		BLNAR ?	
1	-	R/S	S/S	-	N526K +A502T		
2	-	R/R	S/S	-			
2	-	R/R	S/S	-	?		
1	+	R/R	S/R	+	R517H/ N526K	BLPACR I :1 (2.0)	

DD, Disk difüzyon testi; MD, Sıvı mikrodilüsyon testi; +, Pozitif; -, Negatif; x, Yapılmadı; ?, Yapılmadı; S, Duyarlı; R, Dirençli;

H. parainfluenzae ve *H. haemolyticus* için sırasıyla BLNAS, BLPAR, BLNAR, BLPACR oranları; %37.2 (n=16), %13.9 (n=6), %41.8 (n=18), %6.9 (n=3) ve %50 (n=2), %25 (n=1), %25 (n=1), %0 (n=0) bulundu.

4.7.2. *H. influenzae*'da Ampisilin Açısından Disk Difüzyon Testi ve Sıvı Mikrodilüsyonun Karşılaştırılması

MİK değeri ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ olan suşların hepsi disk difüzyonla dirençli olarak bulundu ve TEM pozitif (gBLPAR). MİK'i 2-8 $\mu\text{g/mL}$ olan suşlar disk difüzyonla da dirençli bulundu ve *ftsI* gen mutasyonları saptandı (gBLNAR) (İki izolatın dizi analizi yapılamadı). MİK'i 1 olan suşların 2'si disk difüzyonla duyarlı bulunurken, 8'i disk difüzyonla dirençli, yani iki yöntem ile uyumsuz olarak bulundu. Uyumsuz bulunan bu 8 izolatta moleküler olarak direnç genleri gösterildi. Bunların içinde bir köken *bla*_{TEM} PCR ile zayıf pozitif bant gözlenen gBLPAR grubundaydı; diğerleri gBLNAR idi. Disk difüzyon testi ve mikrodilüsyon ile ampisilin sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 37'de yapılmıştır.

Tablo 37. *H. influenzae*'da ampisilin için disk difüzyon testi ve sıvı mikrodilüsyonun karşılaştırılması

R	6					2	1	1		1	1	2	
	7												
	8												
	9												
	10												
	11						2						
	12						1						
	13					3	2						
	14						1	1	1				
	15					2							
	16												
	17					1							
S	18				1	1	2						
	19				4								
	20			1	4	3							
	21			2	4								
	22				4								
	23				1								
		<=0.06	0.06	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	>32
S							R						
Sıvı mikrodilüsyon testi (µg/mL)													

Tablodaki sayılar suş sayılarını göstermektedir.

İki yöntemin uyumsuz olduğu sonuçlar gri renkte gösterilmiştir. Bunların içinde bir örnek gBLPAR, diğerleri gBLNAR olarak sınıflandırıldı.

4.7.3. Beta Laktam Grupları ile Sefalosporinlere Direnç Oranlarının Karşılaştırılması

Beta laktam sınıflamasının sefalosporinlerle ilişkisi değerlendirildiğinde; BLPACR suşlarında tüm sefalosporinlere direnç en yüksek oranda bulundu. *H. influenzae* için; BLNAR suşlarında sefaklor direnci BLPAR'a göre daha yüksek oranda bulundu. Beta laktam sınıfına göre sefalosporinlere duyarlılık oranları Tablo 38'd verilmiştir.

Tablo 38. Beta laktam sınıfına göre sefalosporinlere duyarlılık oranları

Suşlar (n)	CEC			CRO		CTX		FEP	
	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)	S (%)	R (%)
<i>H. influenzae</i>									
BLNAS (27)	96.2	-	3.7	88.8	11.1	88.8	11.1	88.1	11.1
BLNAR (17)	11.7	5.8	82.3	70.5	29.4	70.5	29.4	76.4	23.5
BLPAR (4)	50.0	-	50.0	50.0	50.0	75.0	25.0	75.0	25.0
BLPACR (1)	-	-	100	-	100	-	100	100	-
<i>H. parainfluenzae</i>									
BLNAS (16)	100	-	-	62.5	37.5	75.0	25.0	75.0	25.0
BLNAR (18)	77.7	-	22.2	33.3	66.6	33.3	66.6	38.8	61.1
BLPAR (6)	66.6	16.6	16.6	16.6	83.3	16.6	83.3	33.3	66.6
BLPACR (3)	-	33.3	66.6	-	100	-	100	-	100
<i>H. haemolyticus</i>									
BLNAS (2)	100	-	-	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
BLNAR (1)	100	-	-	-	100	100	-	-	100
BLPAR (1)	100	-	-	-	100	-	100	-	100
BLPACR (0)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Total									
BLNAS (45)	97.7	-	2.2	77.7	22.2	82.2	17.7	82.2	17.7
BLNAR (36)	47.2	2.7	50.0	50.0	50.0	52.7	47.2	55.5	44.4
BLPAR (11)	63.6	9.0	27.2	27.2	72.7	36.3	63.6	45.4	54.5
BLPACR (4)	-	25.0	75.0	-	100	-	100	25.0	75.0

4.8. Kinolonlara Direnç Mekanizmalarının Belirlenmesi

4.8.1. QRDR Gen Mutasyonları

Disk difüzyon ve/veya sıvı mikrodilüsyon ile siprofloksasine dirençli bulunan *Haemophilus* kökenlerinin QRDR genleri amplifiye edildi ve dizi analizi yapıldı. Tablo 39'da antibiyotik duyarlılık testi (ADT) sonuçları ve QRDR gen mutasyonları

gösterilmiştir. Tabloda yer almakta olan ADT yöntemleri arasında uyumsuzluk bulunan üç suş (Hi25, Hp33, Hp106) çalışılan diğer kinolon grubu antibiyotiklerin hepsine (nalidiksik asit, moksifloksasin, levofloksasin) disk difüzyon testi ile dirençli olarak bulundu.

Tablo 39. Kinolon dirençli bulunan kökenlere ait antibiyotik duyarlılık testi sonuçları ve QRDR genlerinde bulunan mutasyonlar

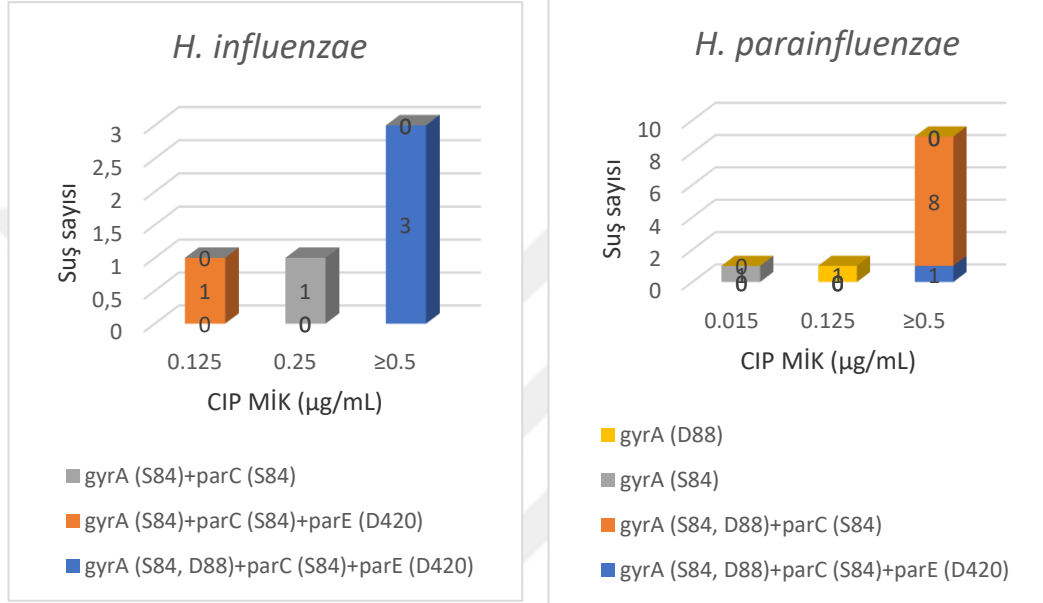
İzolat numaraları	CIP Disk	CIP MİK (µg/mL) /Yorum	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>
<i>H. influenzae</i>						
16	R	≥0.5 / R	S84L, D88G	-	S84I, N138S	D420N
24	R	0.25 / R	S84L	A400V	S84I	-
25	R	0.03 / S	-	M499I	-	-
35	R	0.5 / R	E142K	-	-	-
50	R	≥0.5 / R	S84L, D88G	-	S84I, N138S	D420N
55	R	0.125 / R	S84L	-	S84I, N138S, G141E	D420N, R379L, K384Q, Q435H
79	R	≥0.5 / R	S84L, D88G	-	S84I, N138S	D420N
<i>H. parainfluenzae</i>						
23	R	0.25 / R	-	-	S138T, M198L, V205A	A451S, S452P
33	R	0.015 / S	S84A	E556K, M557L	S138T, V205A	G457A
38	R	≥0.5 / R	S84F, D88Y	-	S84F, S138T, M198L, V205A	-
39	R	≥0.5 / R	S84F, D88Y	-	S84F, S138T, M198L, V205A	-
46	R	≥0.5 / R	S84F, D88G	T474S	G82A, S84F, V205A	-
51	R	≥0.5 / R	S84F, D88Y, N145D	-	S84Y, S138T, M198L, V205A	-
64	R	≥0.5 / R	S84F, D88Y	-	S84Y, S138T, M198L, V205A	G457A
77	R	0.125 / R	-	E556K	-	-
78	R	≥0.5 / R	S84F, D88Y	-	S84Y, S138T, M198L, V205A	-
80	R	≥0.5 / R	S84F, D88Y, E153K	-	S84F, V205A	D420N
86	R	0.125 / R	D88Y	-	V205A	-
98	R	≥0.5 / R	S84F, D88Y	-	S84F, S138T, M198L, V205A	-
106	R	0.008 / S	-	-	M198L, V205A	-
108	R	≥0.5 / R	S84F, D88Y	-	S84Y, S138T, M198L, V205A	-
109	R	0.5 / R	-	-	S138T, M198L, V205A	-
<i>H. haemolyticus</i>						
104	R	≥0.5 / R	-	-	N138S	-

-, mutasyon bulunmamıştır.

Kinolonlarda MİK artışı ile en çok ilişkilendirilen mutasyonlar altı çizili olarak verilmiştir. Mutasyonlar *H. influenzae* ve *H. haemolyticus* için *H. influenzae* Rd KW20 suşu ile; *H. parainfluenzae* için T3T1 suşu ile karşılaştırılmıştır.

4.8.2. QRDR Mutasyonları ile Siprofloksasin MİK'leri Arasındaki İlişki

Bu çalışmada; daha önceki çalışmalarda MİK artışı ile ilişkilendirilen mutasyonlardan *gyrA*-S84, D88, *parC*-S84 ve *parE*-D420 mutasyonları bulundu. Bu mutasyonların sayısının artması ile MİK değerinin arttığı gözlemlendi. Bu suşlarda bulunan mutasyonlar ile siprofloksasin MİK değerlerinin karşılaştırılması Şekil 14'te yer almaktadır.



Şekil 14. *gyrA*-S84, D88; *parC*-S84 ve *parE*-D420 mutasyonu bulunan suşlarda mutasyon sayısı ile siprofloksasin MİK'i arasındaki ilişki

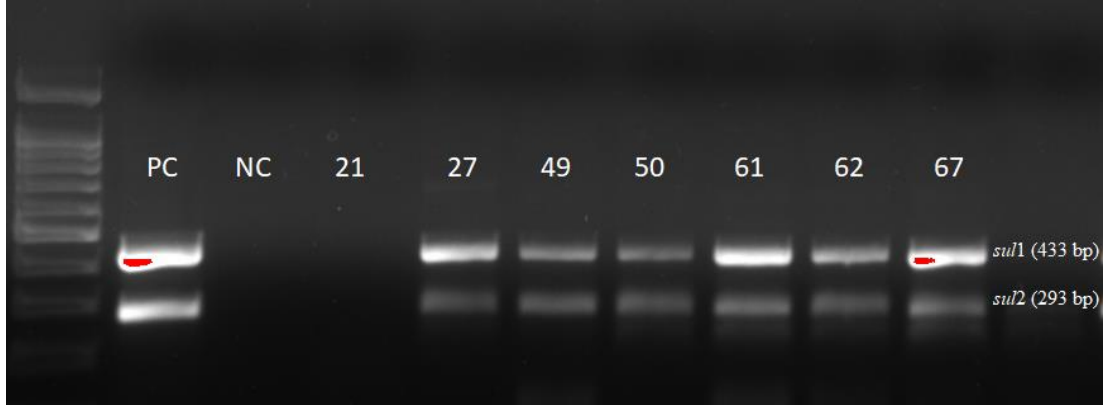
4.9. *sul1* ve *sul2* Direnç Genlerinin Varlığı

Disk difüzyon testi ve/veya gradiyent strip test ile trimetoprim-sülfametoksazol dirençli/orta duyarlı bulunan 25 suшта *sul1* ve *sul2* genleri PCR ile tarandı. Toplam 22 suшта *sul1*+*sul2* ve bir suшта sadece *sul1* geni saptandı, bir suшта ise iki gen de saptanmadı. Bu izolatların antibiyotik duyarlılık sonuçları ve bulunan direnç genleri Tablo 40'ta, bazı suşlara ait jel görüntüsü Şekil 15'te verilmiştir.

Tablo 40. Trimetoprim-sülfametoksazol dirençli bulunan kökenlere ait antibiyotik duyarlılık testi sonuçları ve *sul1*, *sul2* PCR sonuçları

İzolât numarası	SXT DD	SXT MİK (µg/mL)	SXT MD	<i>sul1</i>	<i>sul2</i>
Hi 11	I	1	I	+	-
Hi 12	R	1,5	R	+	+
Hi 14	S	2	R	+	+
Hi 16	R	8	R	+	+
Hp 21	R	>32	R	-	-
Hp 23	R	>32	R	+	+
Hi 24	R	>32	R	+	+
Hi 25	R	8	R	+	+
Hi 26	S	4	R	+	+
Hp 33	I	0,75	I	+	+
Hi 49	R	4	R	+	+
Hi 50	R	4	R	+	+
Hi 61	R	4	R	+	+
Hi 62	R	>32	R	+	+
Hi 63	S	1	I	-	-
Hi 67	R	8	R	+	+
Hi 73	R	>32	R	+	+
Hp 76	R	2	R	+	+
Hi 79	R	8	R	+	+
Hi 82	R	>32	R	+	+
Hp 86	R	>32	R	+	+
Hp 91	R	>32	R	+	+
Hi 100	R	>32	R	+	+
Hp 106	R	>32	R	+	+
Hi 107	R	>32	R	+	+

DD, disk difüzyon testi; MD, sıvı mikrodilüsyon testi; +, pozitif; -, negatif; S, duyarlı; R, dirençli.



Şekil 15. *sul1* ve *sul2* çalışılan bazı suşlara ait jel görüntüsü

PC, pozitif kontrol; NC, negatif kontrol.

5. TARTIŞMA

Haemophilus spp.; hem yetişkinlerde hem de çocuklarda otitis media, sinüzit, pnömoni, menenjit ve bakteriyemi gibi invaziv ve ciddi enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Bu kökenlerde antibiyotik direnci yıllar içerisinde artmaktadır.

Bu çalışmaya Haziran 2020-Aralık 2021 tarihleri arasında 1,5 yıllık sürede Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda izole edilen 96 *Haemophilus* kökeni dahil edildi. 2020 Mart ayında Türkiye'de ilk COVID-19 vakasının görülmesinin ardından, ülkede pandemi önlemleri (maske-mesafe önlemleri, sokağa çıkma yasağı) alınması ile birlikte solunum yolu etkenlerinin bulaşının, hastaneye başvuruların ve laboratuvara gelen solunum yolu örnekleri azalmasının sonucu olarak izole edilen *Haemophilus* kökenlerinin sayısında azalma ve tür dağılımında değişim gözlemlendi. Ayrıca *Haemophilus spp.* toplum kökenli pnömoninin sık bilinen bir sebebi iken, bu çalışmada hastaların %50'si yatan hasta (%29.1 YBU hastası), ileri yaşta ve ek hastalığı sahip olan hastalardı. Çalışma sonuçları, COVID-19 pandemisi sırasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda izole edilen *Haemophilus* kökenlerini yansıtmaktadır.

Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (ECDC) 2018 raporuna göre (90) invaziv *H. influenzae* enfeksiyonu erkeklerde daha fazla görülmektedir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda erkeklerde görülme sıklığı %47-67.8 arasında değişmekteydi (19,87,91). Bu çalışmada da benzer şekilde *Haemophilus spp.* erkek hastalardan daha fazla (%68.7) izole edildi.

ECDC'ye göre (90) invaziv *H. influenzae* vakalarının aylara göre dağılımı mevsimsel bir model izlemektedir, en yüksek olgu sayısı kış aylarında rapor edilmektedir. Vakalar Eylül ayına kadar düşmekte, sonrasında artarak aralık ayında pik noktaya ulaşmaktadır. Benzer şekilde bu çalışmada 2021 yılı kış aylarında vakalar artış

gösterdi, Şubat ve Aralık aylarında pik yaptı. Bunların dışında ağustos ayında da bir pik gözlemlendi.

Gary ve ark. (92) yaptıkları çalışmada Müller Hinton Agar'da XV testi ile 187 *H. influenzae* klinik izolatının 133'ü (%71.1) doğru bir şekilde tanımlanmıştır. Dealler ve ark. (93) balgam kültürlerinden izole edilen 252 *Haemophilus* şüpheli kolonide, XV testi ile %93,6 duyarlılık bulmuşlardır. Tebbutt ve ark. (94) Columbia Agar'da XV testi ile *H. influenzae* suşlarının %6'sının *H. parainfluenzae* olarak yanlış tanımlandığını bildirmişlerdir. Bu çalışmalarda yanlış tanımlama/tanımlayamamaların sebebi olarak; *H. influenzae*'nin besiyeri üzerinde zayıf üremesi, diğer bakterilerle kontaminasyon, bakteriyel inokulum veya bazal besiyerinde eser miktarda hemin bulunması nedeniyle V faktörü içeren şeritler çevresinde üreme olması gibi sorunlar olabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada ise, 49 *H. influenzae* kökeninin 2'si (%4) MHA'da hem X+V hem de V diskleri çevresinde üredi. Geri kalan 47'si (%95.9) sadece X+V diski çevresinde üreyerek doğru tanımlandı. Yanlış tanımlamanın, besiyeri ya da inokulum içerisinde hemin bulunması nedeniyle olduğu düşünüldü. Sadece X+V diski çevresinde üremelerin güvenilir olduğu ve *H. influenzae* (veya *H. haemolyticus*) olarak tanımlanabileceği ama X+V ve V faktör çevresinde olan üremelerin çalışma sırasında ortama hemin dahil olabildiğinden dolayı yanlış tanımlamaya yol açabileceği sonucuna varıldı.

Bruin ve ark. (95) 244 *H. influenzae* ve 33 *H. haemolyticus* ile yaptıkları çalışmada altın standart yöntem olarak MLST kullanıldığında, MALDI-TOF MS'nin uyumunu %99.6 bulmuşlardır. Sadece bir *H. haemolyticus* izolatını, MALDI-TOF MS *H. influenzae* olarak tanımlamıştır. Pickering ve ark. (25) MALDI-TOF MS ile *H. influenzae*-*H. haemolyticus* ayrımı büyük ölçüde laboratuvarlarda kullanılan veritabanlarına bağlı olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada MALDI-TOF MS ile 4 *H. haemolyticus* kökeninin hepsi doğru tanımlandı. Güncel veritabanları ile *H. influenzae*/*H. haemolyticus* ayrımını MALDI-TOF MS ile doğru bir şekilde yapılabilceği sonucuna varıldı.

ECDC verilerine göre (90) invaziv hastalıklarda *H. influenzae* kökenlerinin serotiplere göre dağılımı NTHi>Hif>Hib>Hie>diğer şeklinde bildirilmiş ve Hib oranı %7 olarak verilmiştir. Şenol ve ark. (96) 2000 yılında Hib oranını %33.3 bulmuştur.

Kırca (19) konvansiyonel serotiplendirme ile kökenlerin %78,9'unu NTHi, % 6,8'ini Hib olarak tanımlamış; konvansiyonel ve moleküler testler arasındaki uyumun ise %74.5 olduğu bildirmiştir. Bu çalışmada, 49 *H. influenzae* kökeninde konvansiyonel serotiplendirme ile Hib oranı %24.4 olarak bulundu. Moleküler serotiplendirme yapılamadı.

Sader ve ark. (97) 2015–2017 yılları arasında Avrupa, Asya ve Latin Amerika'da 1172 *H. influenzae* ve 23 *H. parainfluenzae* ile yaptıkları çalışmada *H. influenzae* kökenlerinde ampisiline %27.6, amoksisilin klavulanata %9.1, seftriaksona %2.3, levofloksasine %1.5, tetrasikline %1.4 direnç saptamış, meropenem direnci bulmamışlardır. *H. parainfluenzae* kökenlerinde ise; ampisiline, amoksisilin klavulanata ve meropeneme direnç saptamamış, seftriaksona, tetrasikline ve levofloksasine %4.3 direnç bildirmişlerdir. Şenol ve ark. (96) 2000 yılında İzmir Göğüs Hastalıkları Hastanesi'nde *H. influenzae* kökenlerinde ampisiline %46, sefaklor %12, seftriaksona %2, eritromisine %48, kloramfenikole %13, tetrasikline %31, trimetoprim-sülfametoksazole %36, siprofloksasine %16 direnç bulmuşlardır. Gür ve ark. (98) Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda 2018-2019 yılları arasında izole edilen 480 *H. influenzae* kökeninde ampisiline %16,2 amoksisilin klavulanata %4,8, sefuroksime %3,7, siprofloksasine %1, tetrasikline %6,2, trimetoprim-sülfametoksazole %30,4, rifampine %0.2 direnç saptamış, piperasilin tazobaktama, sefotaksime, seftazidime, seftriaksona ve meropeneme direnç bulmamışlardır. Kırca (19) *H. influenzae* için duyarlı olmama oranları; ampisiline %19.5, sefotaksime %2, klaritromisine %24.7, kloramfenikole %4.7, tetrasikline %53.3, trimetoprim-sülfametoksazole %31.9, siprofloksasin/moksifloksasine %5.2 olarak bildirmiştir. Kuvat (91) 2009-2011 yılları arasında İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi'nden klinik örneklerden izole edilen 235 *H. influenzae* kökeninde direnç oranlarını; ampisiline %11, sefaklor %4.2, meropeneme %0.8, nalidiksik aside %0.4, trimetoprim-sülfametoksazole %24.2, klaritromisine %3.4, kloramfenikole %0.8 olarak bulmuş ve amoksisilin klavulanat, seftriakson, sefotaksim, azitromisin, siprofloksasin, levofloksasine dirençli suş saptamamıştır.

Bu çalışmanın yapıldığı merkez olan Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda Kılıç ve ark. (99) 2011-2012 yılları arasında 92 *H.*

influenzae izole etmiş ve bu kökenlerde ampisiline %4,3, amoksisilin klavulanata %1,1, trimetoprim-sülfametoksazole %22,8 direnç bulmuştur. Aynı merkezde 2019 yılında izole edilen *Haemophilus spp.*'nin direnç oranları; amoksisilin klavulanata %1,2, seftriaksona %23,7, trimetoprim-sülfametoksazole %33,7, kinolona %18,3 idi (yayınlanmamış veriler).

Çalışma kapsamında test edilen 96 *Haemophilus* izolatının disk difüzyon testine göre duyarlı olmama (I+R) oranları; ampisiline %53,1, amoksisilin klavulanata %3,1, sefakloram %29,1, seftriaksona %41,6, sefotaksim %37,5, sefepime %34,3, meropenem %4,1, moksifloksasine %36,4, levofloksasine ve siprofloksasine %23,9, trimetoprim-sülfametoksazole %20,8, azitromisine %8,3, klaritromisine %38,5, tetrasikline %8,3, rifampisine %15,6 ve kloramfenikole %8,3 olarak bulundu. Bu çalışma sonuçları hem diğer merkezlerle ve hem de aynı hastanenin önceki yıllarından elde edilen verilerle kıyaslandığında; genellikle bu çalışma kökenlerinde trimetoprim-sülfametoksazol dışındaki antibiyotiklere direnç daha yüksek oranda gözlemlendi. Kırca (19) tetrasiklin direncini daha yüksek oranda bulmuştu. Antibiyotik direnç oranları; ileri yaş ve yatan hastaların fazla olması, bu hastalarda ek hastalıkların ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımının fazla olmasına bağlandı. Ayrıca CDC verilerine göre (100) Mart-Ekim 2020 arasında COVID-19 ile hastaneye kaldırılan hastaların neredeyse %80'i antibiyotik tedavisi aldı. Ayaktan hastalarda antibiyotik kullanımı düşerken hastaneye yatırılan hastalarda azitromisin ve seftriakson kullanımı fazlaydı. Bu durumun da antibiyotik direnci üzerinde etkisi olabileceği düşünüldü.

Reig ve ark. (101) ampisilin dirençli 110 *H. influenzae* ile yaptıkları çalışmada 110 suş incelemiş; bunların 105'inde nitrosefin hidrolizi (duyarlılığı %97,2) saptamış, 108'inde hibridizasyon yöntemi ile TEM-1 geni tanımlamışlardır. Enzim üretimi düşük olduğunda nitrosefin hidrolizinin bunu tespit edememesine (yalancı negatif) rağmen beta laktamaz üretimi için güvenilir bir test olduğunu raporlamışlardır. Andrzejczuk ve ark. (36) *H. parainfluenzae* kökenlerinde PCR ile karşılaştırılarak nitrosefin testinin %52,25 duyarlılığı olduğunu bulmuşlardır. Tinguely ve ark. (42) *bla*_{TEM-1} taşıyan bir *H. parainfluenzae*'nin nitrosefin testine göre (hem sefinaz diski hem de nitrosefine karşı hidrolitik aktivite ile) beta laktamaz negatif bulmuşlardır. Bu çalışmada *bla*_{TEM} geni pozitif bulunan 12 *Haemophilus* kökeninin 3'ünde

nitrosefin hidrolizi negatif olarak bulundu. Sefinaz diskinin duyarlılığı %75 olarak bulundu. Bu sonuçlar, nitrosefin hidrolizi negatif izolatların beta laktamaz üreticisi olabileceğini ve nitrosefin hidrolizi baz alınarak tedavi başlanmaması gerektiğini göstermektedir.

H. influenzae'da beta laktam antibiyotiklere direnç çoğunlukla β -laktamazların varlığından kaynaklanmaktadır. BLNAR suşları özellikle Japonya ve Fransa'da yaygın olarak saptanmaktadır (102). *H. influenzae*'larda TEM-1 ve ROB-1 beta laktamazlarının küresel dağılımını belirlemek amacıyla yapılan PROTEKT çalışmasının ilk 4 yılında (1999–2003) beta laktamaz pozitifliği genel olarak %15 olup, ülkelere göre büyük farklılıklar göstermiştir (birkaç ülkede <%5, Tayvan'da %67,9). TEM-1 ve ROB-1 prevalansları sırasıyla %93.7 ve %4.6 olup, neredeyse tüm ROB-1 izolatları Kuzey Amerika'da bulunmuştu. Türkiye'de beta laktamaz oranı %5.4 olup, hepsi *bla*_{TEM-1} olarak tanımlanmıştı (35). Türkiye verileri incelendiğinde Kuvat (91) %8 BLPAR (*bla*_{TEM-1+}), %2.9 BLNAR.olarak; Gür ve ark. (98) % 7.9 BLNAR, % 8.3'ü BLPAR, % 1.9'u ise BLPACR olarak; Okulu (87) %19.6 zayıf BLNAR, %1.7 BLPAR (*bla*_{TEM-1+}) olarak tanımlamıştır. Bu çalışmada kökenler beta laktam antibiyotiklere direnç mekanizmalarına göre değerlendirildiğinde; *H. influenzae* için %34.6 BLNAR, %8.1 BLPAR, %2 BLPACR; *H. parainfluenzae* için %41.8 BLNAR, %13.9 BLPAR, %6.9 BLPACR ve *H. haemolyticus* için %25 BLPAR ve %25 BLNAR olarak bulundu. Okulu'nun (87) verilerine benzer şekilde *H. influenzae* ve *H. parainfluenzae* kökenlerinde beta laktam antibiyotiklere ana direnç mekanizması *ftsI* gen mutasyonları sonucu oluşan PBP3 değişimleriydi ve diğer çalışmalara benzer şekilde beta laktamaz üreten kökenlerin hepsinde *bla*_{TEM-1} geni saptandı.

Søndergaard ve ark. (28) TEM-1 ve ROB-1 beta laktamazların ampisilin ve diğer aminopenisilinlere karşı yüksek düzeyde direnç sağladığını, ancak bunların üçüncü kuşak sefalosporinleri önemli düzeyde parçalayamadıklarını bildirmişlerdir. TEM-15 beta-laktamaz üretiminin, hem *H. influenzae* hem de *H. parainfluenzae*'da sefotaksim direncine yol açtığını ve nitrosefin hidrolizi açısından, TEM-15'in TEM-1'e kıyasla daha az verimli bir enzim olduğunu göstermişlerdir. Tristram ve ark. (103) genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar (ESBL) TEM-3, TEM-4 ve TEM-5'in laboratuvarı Rd suşunda sefotaksim direnci sağladığı göstermiştir. Tristram ve ark.

(10) TEM tipi ESBL'nin *H. influenzae*'da ortaya çıkmış olabileceğini, ancak metodoloji ve yorumlama kriterleri ile ilgili sorunlar nedeniyle tespit edilmemiş olmalarının mümkün olduğunu ve BLNAR veya BLPACR suşu olarak yorumlanmış olabileceklerini düşünmüşlerdir. Klinik *H. parainfluenzae* kökenlerinde TEM-15 saptanmıştır ama *H. influenzae* suşlarında ESBL TEM genleri tanımlanmamıştır. Bu çalışmada *bla*_{TEM} geni saptanan 12 suşun 3'ünün profili farklıydı (nitrosefin hidrolizi negatif, ampisilin için düşük MİK değeri ve TEM PCR ile zayıf bant). Bu üç kökenin ikisi sefotaksime dirençliydi. PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler ile TEM tipini ayırt etmek mümkün olmamaktaydı. Bu kökenlerde TEM geninin, TEM-1 dışı bir beta laktamaz olabileceği veya zayıf ekspresyona sahip TEM-1 geni olabileceği düşünüldü. Son yıllarda, *H. parainfluenzae* kökenlerinde TEM-1 dışı TEM genleri tanımlandığı için, diğer *Haemophilus* türlerinde de bu tanımlamanın yapılabilmesi amacıyla saptanan TEM genlerinin TEM-1 olarak kabul edilmemesi ve dizi analizi ile tipinin ayırt edilmesi gerektiği sonucuna varıldı.

EUCAST '*Haemophilus influenzae* calibration of zone diameter breakpoints to MIC values v.7.0' dokümanına göre BLNAS, BLPAR, BLPACR suşlarının ADT sonuçları; disk difüzyon testi ve sıvı mikrodilüsyon ile uyumlu bulunurken, BLNAR suşlarında klinik sınır değere yakın MİK'e sahip izolatlar arasında uyumsuzluklar raporlanmıştır. EUCAST epidemiyolojik sınır değer (ECOFF) dağılım veritabanı (104) incelendiğinde ise; *H. influenzae* kökenlerinde ampisilin ECOFF MİK değeri 1 µg/mL olarak, güven aralığı ise 0.5-1 µg/mL arasında verilmiştir. Bu çalışmada; *H. influenzae* için ampisilin disk difüzyon/mikrodilüsyon sonuçları ve direnç mekanizmaları değerlendirildiği zaman bu verilerle uyumlu sonuçlar bulundu. Ampisilin MİK değeri ≥ 2 ve ≤ 0.5 µg/mL olan suşlarda ADT yöntemleri ve direnç mekanizmaları arasında tam uyum varken MİK'i 1 µg/mL (duyarlı) olan kökenler disk difüzyon testine göre duyarlı ve dirençli kökenleri barındırıyordu. İki yöntemle uyumsuz saptanan 8 kökende moleküler olarak direnç genleri (1'i BLPAR, 7'si BLNAR) saptandı. Buna göre; disk difüzyon testinin direnci daha iyi saptadığı, BLNAR ve zayıf eksprese olan *bla*_{TEM} genine sahip BLPAR kökenleri de saptayabildiği sonucuna varıldı. EUCAST tarafından mikrodilüsyon için belirlenmiş olan klinik sınır değer (1 µg/mL) duyarlı-dirençli ayrımını yapmakta sınırlı kaldığı

ve 1 µg/mL aralığının teknik belirsizlik alanı (ATU) içerisinde değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varıldı.

Tristram ve ark. (10) sefaklor direncinin bir BLNAR suşu için ampisilin direncinden daha iyi bir gösterge olabileceği, sefuroksimin BLNAR suşlarını taramada kullanıldığı ile ilgili bilgiler vermişlerdir. Bu çalışmada beta laktam sınıflamasının sefalosporinlerle ilişkisi değerlendirildiğinde; BLPACR suşlarında tüm sefalosporinlere direnç en yüksek oranda bulundu. *H. influenzae* için; gBLNAR suşlarında sefaklor direnci %88.2 idi. Bu çalışmada tarama olarak ampisilin kullanılmış olup; sefaklor, ampisilinin saptadığı BLNAR suşlarının bazılarını yakalayamamıştır. Sefaklor direnci *H. influenzae*'da gBLNAR suşları için iyi bir gösterge olmakla birlikte, ampisilin direncinin beta laktam antibiyotiklere direncin taramasında daha iyi bir gösterge olduğu sonucuna varıldı.

Matic ve ark. (105) ampisilin ve amoksisilin klavulanat dirençli iki BLPACR ve iki BLNAR suşundan *ftsI* gen ürünlerini *H. influenzae* Rd suşlarına transforme ettiklerinde transformantlarda yüksek amoksisilin klavulanat MİK'i gözlemişlerdir. Bu sebeple aynı mutasyona sahip BLNAR/BLPACR suşları arasında, BLPACR suşundaki amoksisilin/klavulanat direncinin PBP3 mutasyonlarından kaynaklandığı sonucuna varmışlardır. Tristram ve ark. (10) BLPACR suşları, aynı PBP3 mutasyonlarına sahip BLNAR suşları ile karşılaştırıldığında, çok daha yüksek ampisilin MİK'lerine (0,5-64 µg/ml) sahip olup amoksisilin klavulanat ve sefalosporin MİK'lerinin aynı olduğunu ve beta laktamazın dirence katkısının ampisilin ile sınırlı olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmada *H. influenzae* kökenleri arasında bir BLPACR suşu (Hi74) tanımlandı. Ampisiline (MİK: >32 µg/mL), amoksisilin klavulanata, sefaklora, seftriaksona, sefotaksime dirençli; sefepim ve meropeneme duyarlı olarak bulundu. Aynı *ftsI* mutasyonuna sahip BLNAR suşu (Hi24) ise; ampisiline (MİK: 2 µg/mL) ve sefaklora dirençli olup seftriaksona, sefotaksime, sefepime ve meropeneme duyarlıydı. BLPACR suşu, aynı mutasyonlu BLNAR'dan farklı olarak; ampisilin MİK değeri daha yüksek olmakla birlikte, aynı zamanda amoksisilin klavulanata ve üçüncü kuşak sefalosporinlere de dirençliydi.

Nalidiksik asit, siprofloksasin ve levofloksasine duyarlı 7 kökende (1 *H. influenzae*, 6 *H. parainfluenzae*) tek başına moksifloksasin direnci saptandı (Disk difüzyon testleri yapılırken, kalite kontrol suşları her çalışmaya dahil edildi ve bu kökenler tekrar test edildiğinde de aynı sonuçlar elde edildi). Literatür araştırıldığında daha önce tek başına moksifloksasin direnci saptanmamıştır. Çalışmada saptanan kökenlerin sıvı mikrodilüsyon testi ile doğrulanması ve direnç genlerinin araştırılması gerekmektedir.

Georgiou ve ark. (8) “*gyrA*-S84/Y, D88N/Y ve *parC*-S84I, E88K” mutasyonlarının; Cherkaoui ve ark. (59) “*gyrA*-S84, D88, *parC*-S84 ve *parE*-D420” mutasyonlarının; Puig ve ark. (9) “*gyrA*-S84, D88 ve/veya *parC*-S84, E88” mutasyonlarının; Shoji ve ark. (61) “*gyrA*-S84, D88 ve *parC*-G82, S84, E88” mutasyonlarının; Davies ve ark. (62) “*gyrA*-S84, D88 ve *parC*-D83, S84, E88” mutasyonlarının MİK’le ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.

Puig ve ark. (9) *H. influenzae* için *gyrA*’da tek mutasyon veya *gyrA*+*parC*’de mutasyon olan suşların siprofloksasin MİK’lerini 0.12-2 µg/ml; *gyrA*+*parC*+*parE*’de 3-4 mutasyon olanların 8-16 µg/ml olarak bulmuşlardır. Shoji ve ark. (61) 1-2 mutasyon olanlarda siprofloksasin/levofloksasin MİK’lerini 0.12-2 µg/ml, 3-4 mutasyon olanlarda 4-16 µg/ml olarak bulmuşlardır. Davies ve ark. (62) ise düşük seviyeli direncin *gyrA*’da (Ser84 veya Asp88) bir mutasyonla ilişkili olduğunu, yüksek seviyeli direncin *parC*’de (Asp83, Ser84 veya Glu88) ek bir mutasyonla ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada suşlar, daha önceki çalışmalarda MİK artışı ile ilişkilendirilen *gyrA*-S84, D88, *parC*-G82, D83, S84, E88 ve *parE*-D420 mutasyonlarının varlığı ve bu mutasyonların sayısının siprofloksasin MİK’ine olan etkileri açısından değerlendirildi. *H. influenzae* suşlarında dört mutasyon ≥ 0.5 µg/mL, üç mutasyon 0.125 µg/mL, iki mutasyon 0.25 µg/mL; *H. parainfluenzae* suşlarında ise 3-4 mutasyon ≥ 0.5 µg/mL, 1 mutasyon varlığı 0.015-0.125 µg/mL MİK ile sonuçlandı. Mutasyon sayısı daha fazla olan suşlarda MİK değerinin daha yüksek olduğu gözlemlendi.

Hi35 suşunda *gyrA*-E142K, Hi25 suşunda *gyrB*-M499I ve Hp77 suşunda *gyrB*-E556K bu kökenlerde saptanan tek mutasyondur. Shoji ve ark. (61) E142K mutasyonunu daha önce duyarlı suşlarda da göstermiş, E556K ve M499I mutasyonu

ise daha önce tanımlanmamıştır. Bilindiği kadarıyla bu çalışmada *H. influenzae*'da *gyrB*-M499I, *parC*-G141E, *parE*-R379L, K384Q, Q435H mutasyonları; *H. parainfluenzae*'da *gyrA*-N145D, E153K, *gyrB*-E556K, M557L, T474S, *parC*-G82A, *parE*- S452P mutasyonları ilk kez tanımlandı. Bununla birlikte bu mutasyonların dirençteki rollerinin kanıtlanması için diğer kinolon direnç mekanizmalarının mevcut olmadığının gösterilmesi ve genetik transformasyon deneylerinin yapılmasının gerekliliği söz konusudur.

Enne ve ark. (71) 2002 yılında *H. influenzae*'da sülfonamid direnç mekanizmalarını ilk kez tanımlamıştır ve klinik izolatların sekizinde *sul2* genini göstermişlerdir. İlerleyen yıllarda Mohd-Zain ve ark. (70) *H. influenzae*'da, Sierra ve ark. (46) *H. parainfluenzae*'da, Diricks ve ark. (4) *H. haemolyticus*'ta *sul2* geni varlığını tanımlamışlardır. *sul2* geninin dirence katkısı net olmamakla birlikte, dirençte esas mekanizma olmayıp, var olan direnç seviyesini artırdığı düşünülmektedir. Diğer direnç mekanizmaları olmadan tek başına varlığı duyarlı suşlarda da raporlanmıştır (46,70). Bu çalışmada SXT dirençli *Haemophilus* kökenlerinde *sul1* ve *sul2* genleri araştırıldığında; bir *H. influenzae*'da *sul1*, 16 *H. influenzae* ve 6 *H. parainfluenzae*'da *sul1*+*sul2* saptandı. Dirençli kökenlerde ek olarak *folA* ve *folP* gen mutasyonları ve duyarlı suşlarda *sul* genlerinin varlığı araştırılmadığı için, genlerin dirence olan katkıları ile ilgili yorum yapmak mümkün olmayacaktır. Ancak literatür araştırıldığında *Haemophilus* kökenlerinde *sul1* geni ve *sul1*+*sul2* genlerinin birlikteliği ilk kez bu çalışmada saptandı. Bu yönüyle SXT direncinde *sul* genlerinin rolü ile ilişkisini değerlendiren çalışma sayısının artırılması gerekliliği sonucuna varıldı.

6. SONUÇLAR

1. Çalışma kökenleri COVID-19 pandemisi sırasında izole edilen *Haemophilus spp.*'yi temsil etmektedir. Bu nedenle izole edilen köken sayısı, hasta ve tür dağılımı, antibiyotik duyarlılık oranları aynı merkezin pandemi öncesi sonuçlarından farklı olarak gözlemlendi.
2. XV faktör gereksinimi ile *H. influenzae* olarak tanımlanan kökenlerin bir kısmı *H. haemolyticus* olabilmektedir. MALDI-TOF MS, rutin laboratuvarlarda bu ayırımı yapılabilmesi için uygun bir yöntem olarak görülmektedir. *H. haemolyticus* kökenlerinin enfeksiyon hastalıklarında etken olarak rolünün değerlendirilmesi gerekmektedir.
3. Hib oranı konvansiyonel yöntemlerle %24.4 olarak bulundu. Moleküler serotiplendirme yapılamaması bu çalışmanın kısıtlılıklarıdır.
4. Çalışma kapsamında test edilen 96 *Haemophilus* izolatının disk difüzyon testine göre duyarlı olmama (I+R) oranları; ampisiline %53.1, amoksisilin klavulanata %3.1, sefaklor %29.1, seftriaksona %41.6, sefotaksime %37.5, sefepime %34.3, meropenem %4.1, moksifloksasine %36.4, levofloksasine ve siprofloksasine %23.9, trimetoprim-sülfametoksazol %20.8, azitromisine %8.3, klaritromisine %38.5, tetrasikline %8.3, rifampisine %15.6 ve kloramfenikole %8.3 olarak bulundu. Bu çalışma sonuçları hem diğer merkezlerle ve hem de aynı hastanenin önceki yıllarından elde edilen verilerle kıyaslandığında; genellikle bu çalışma kökenlerinde trimetoprim-sülfametoksazol dışındaki antibiyotiklere direnç daha yüksek oranda gözlemlendi. Bu durum; ileri yaş ve yatan hastaların fazla olması, bu hastalarda ek hastalıkların ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanımının fazla olmasına bağlandı.

5. Beta laktamaz tespitinde; nitrosefin hidrolizinin moleküler ile karşılaştırıldığında duyarlılığı %75 olarak bulundu. Beta laktamaz fenotipik yöntemler ile saptanamayabilmektedir, moleküler yöntemler ile tanımlanması gerekmektedir. Sefinaz diski sonucuna göre tedavi başlanmaması gerektiği, duyarlılık test sonuçlarına ihtiyaç duyulduğu sonucuna varıldı.
6. *H. influenzae* için ampisilin direncini saptamada MİK 1 µg/mL değerinin, duyarlı ve dirençli kökenleri barındırdığı, teknik belirsiz alan olarak değerlendirilmesi gerektiği sonucuna varıldı.
7. Bu çalışmada beta laktam antibiyotiklere ana direnç mekanizması olarak *ftsI* gen mutasyonları sonucu oluşan PBP3 değişiklikleri saptandı. Daha az olarak TEM tipi beta laktamazlar saptandı. ROB tipi beta laktamaz saptanmadı.
8. Bu çalışmada *ftsI* gen mutasyonları sadece *H. influenzae* kökenleri için araştırılabilirdi. *H. parainfluenzae* ve *H. haemolyticus* kökenleri için BLNAR ve BLPACR sınıflamaları sadece fenotipik olarak yapıldı. Bu durum, çalışmanın kısıtlılıklarındandır.
9. Daha önceki çalışmalarda MİK artışı ile ilişkilendirilen *gyrA*-S84, D88, *parC*-G82, D83, S84, E88 ve *parE*-D420 mutasyonlarının sayısı ile MİK değerinin doğru orantılı olarak arttığı gözlemlendi.
10. *H. influenzae*'da *gyrA*-E142K, *gyrB*-M499I ve *H. parainfluenzae*'da *gyrB*-E556K bu kökenlerde saptanan tek mutasyondur. Dirençteki rollerinin netleşmesi için; bu kökenlerde diğer direnç mekanizmalarının olmadığına gösterilmesi, genetik transformasyon deneyleri ile direnç oluşturdıklarının gösterilmesi ve daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.
11. Bilindiği kadarıyla bu çalışmada *H. influenzae*'da *gyrB*-M499I, *parC*-G141E, *parE*-R379L, K384Q, Q435H mutasyonları; *H. parainfluenzae*'da *gyrA*-N145D, E153K, *gyrB*-E556K, M557L, T474S, *parC*-G82A, *parE*-S452P mutasyonları ilk kez tanımlandı. Bu mutasyonların dirençteki rollerinin belirlenmesi için daha fazla kanıtı ihtiyacı bulunmaktadır.
12. *Haemophilus* kökenlerinde *sul1* geni ve *sul1+sul2* genlerinin birlikteliği ilk kez bu çalışmada saptandı. Bu yönüyle SXT direncinde *sul* genlerinin rolü ile ilişkisini değerlendiren çalışma sayısının artırılması gerekliliği sonucuna varıldı.

KAYNAKLAR

1. A. Lebedoer N, V. Doern G. *Haemophilus*. In: H. Jorgensen J, A. Pfaller M, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 11th ed. 2015. p. 667–84.
2. Torun MM, Bektöre B, Kaleli İ, Özyeğen Aslan S, Ögünç D, Dündar D, et al. Zor Üreyen Çeşitli Gram-Negatif Basiller. In: Başustaoğlu A, Us AD, editors. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Mikrobiology*. 7th ed. Hipokrat Kitabevi; 2017. p. 473–88.
3. Kilian M. *Haemophilus*. In: Garrity GM, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. Springer link; 2005. p. 883–904.
4. Diricks M, Kohl TA, Käding N, Leshchinskiy V, Hauswaldt S, Jiménez Vázquez O, et al. Whole genome sequencing-based classification of human-related *Haemophilus* species and detection of antimicrobial resistance genes. *Genome Med*. 2022;14(1):1–15.
5. Nørskov-Lauritsen N. Classification, identification, and clinical significance of *Haemophilus* and *Aggregatibacter* species with host specificity for humans. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(2):214–40.
6. González-Díaz A, Tubau F, Pinto M, Sierra Y, Cubero M, Càmarà J, et al. Identification of polysaccharide capsules among extensively drug-resistant genitourinary *Haemophilus parainfluenzae* isolates. *Sci Rep*. 2019;9(1):1–8.
7. Murphy TF. *Haemophilus Species* (Including *H. influenzae* and Chancroid). In: E. Bennett J, Dolin R, J. Blaser M, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practise of Infectious Diseases*. 8th ed. Elsevier Saunders; 2015.
8. Georgiou M, Muñoz R, Román F, Cantón R, Gómez-Lus R, Campos J, et al.

- Ciprofloxacin-resistant *Haemophilus influenzae* strains possess mutations in analogous positions of GyrA and ParC. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(7):1741–4.
9. Puig C, Tirado-Vélez JM, Calatayud L, Tubau F, Garmendia J, Ardanuy C, et al. Molecular characterization of fluoroquinolone resistance in nontypeable *Haemophilus influenzae* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(1):461–6.
 10. Tristram S, Jacobs MR, Appelbaum PC. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(2):368–89.
 11. Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, Chiba N, Hasegawa K, Takeuchi Y, et al. Association of Amino Acid Substitutions in Penicillin-Binding Protein 3 with β -Lactam Resistance in β -Lactamase-Negative Ampicillin-Resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrobial Agents Chemother.* 2001;45(6):1693–9.
 12. Eyler JM. The state of science, microbiology, and vaccines circa 1918. *Public Health Rep.* 2010;125(SUPPL. 3):27–36.
 13. Tognotti E. Scientific triumphalism and learning from facts: Bacteriology and the “Spanish flu” challenge of 1918. *Soc Hist Med.* 2003;16(1):97–110.
 14. Gülcü S, Arslan S. Çocuklarda Aşı Uygulamaları : Güncel Bir Gözden Geçirme. *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi.* 2018;8(1):34–43.
 15. *Haemophilus, Bordetella, Brucella, and Francisella.* In: Jawetz, Melnick, & Adelberg’s Medical Microbiology. 27th ed. 2016. p. 263–6.
 16. Mamal Torun M. Bakteri Enfeksiyonları. In: Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, editors. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 3rd ed. Nobel Tıp Kitabevleri; 2008. p. 2243–9.
 17. Abotsi RE, Govinden U, Essack SY. Mechanisms of antibiotic resistance in *Haemophilus parainfluenzae*. *South African J Infect Dis.* 2017;32(3):111–4.
 18. Torun MM. *Haemophilus* Türleri. In: Kiraz N, editor. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ders Kitabı. İstanbul Üniversitesi Basım ve Yayınevi; 2011. p. 971–87.
 19. Gökçe K. “*Haemophilus influenzae*’larda Tiplendirme Yöntemleri ve Önemi”.

- Yüksek lisans tezi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, Kayseri, 2021.
20. Centers for Disease Control and Prevention. Erişim Tarihi 06.10.2022. <https://www.cdc.gov/hi-disease/>.
 21. Rao VK, Krasan GP, Hendrixson DR, Y SD, St JW, Iii G. Molecular determinants of the pathogenesis of disease due to non-typable *Haemophilus influenzae*. *FEMS Microbiology Reviews*. 1999;23.
 22. Pinto M, González-Díaz A, Machado MP, Duarte S, Vieira L, Carriço JA, et al. Insights into the population structure and pan-genome of *Haemophilus influenzae*. *Infect Genet Evol*. 2019;67:126–35.
 23. Franco-acosta A, Espadafor-lópez B, Rosales-castillo A, Navarro-mari JM. Emergence of genital infections due to *Haemophilus pittmaniae* and *Haemophilus sputorum*. *Infect Dis Now*. 2022;52:227–9.
 24. Reports C, Boucher MB, Bedotto M, Couderc C, Gomez C, Reynaud-gaubert M, et al. *Haemophilus pittmaniae* respiratory infection in a patient with siderosis : a case report. *Journal of Medical Case Reports*. 2012;2–5.
 25. Pickering J, Richmond PC, Kirkham LAS. Molecular tools for differentiation of non-typeable *Haemophilus influenzae* from *Haemophilus haemolyticus*. *Front Microbiol*. 2014;5:664.
 26. Potts CC, Topaz N, Rodriguez-Rivera LD, Hu F, Chang HY, Whaley MJ, et al. Genomic characterization of *Haemophilus influenzae*: A focus on the capsule locus. *BMC Genomics*. 2019;20(1):1–9.
 27. Sierra Y, Tubau F, González-Díaz A, Carrera-Salinas A, Moleres J, Bajanca-Lavado P, et al. Assessment of trimethoprim-sulfamethoxazole susceptibility testing methods for fastidious *Haemophilus spp*. *Clin Microbiol Infect*. 2020;26(7):944.e1-944.e7.
 28. Søndergaard A, Nørskov-Lauritsen N. Contribution of PBP3 Substitutions and TEM-1, TEM-15, and ROB-1 Beta-Lactamases to Cefotaxime Resistance in *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus parainfluenzae*. *Microb Drug Resist*. 2016;22(4):247–52.
 29. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M, editors. Enfeksiyon Hastalıklarında Tedavi. In: Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Sistemlere Göre

- Enfeksiyonlar 1. 3rd ed. Nobel Tıp Kitabevleri; 2008. p. 219–448.
30. Zwama M, Yamaguchi A, Nishino K. Phylogenetic and functional characterisation of the *Haemophilus influenzae* multidrug efflux pump AcrB. *Commun Biol.* 2019;2(1):1–11.
 31. Trepod CM, Mott JE. Identification of the *Haemophilus influenzae* *tolC* Gene by Susceptibility Profiles of Insertionally Inactivated Efflux Pump Mutants. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(4):1416–8.
 32. Dastidar V, Mao W, Lomovskaya O, Zgurskaya HI. Drug-induced conformational changes in multidrug efflux transporter AcrB from *Haemophilus influenzae*. *J Bacteriol.* 2007;189(15):5550–8.
 33. Sanchez L, Pan W, Vinas M, Nikaido H. The *acrAB* homolog of *Haemophilus influenzae* codes for a functional multidrug efflux pump. *J Bacteriol.* 1997;179(21):6855–7.
 34. Xu XJ, Su XZ, Morita Y, Kuroda T, Mizushima T, Tsuchiya T. Molecular Cloning and Characterization of the HmrM Multidrug Efflux Pump from *Haemophilus influenzae* Rd. *Microbiol Immunol.* 2003;47(12):937–43.
 35. Farrell DJ, Morrissey I, Bakker S, Buckridge S, Felmingham D. Global distribution of TEM-1 and ROB-1 β -lactamases in *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother.* 2005;56(4):773–6.
 36. Andrzejczuk S, Kosikowska U, Chwiejczak E, Stępień-Pyśniak D, Malm A. Prevalence of resistance to β -Lactam antibiotics and *bla* genes among commensal *Haemophilus parainfluenzae* isolates from respiratory microbiota in Poland. *Microorganisms.* 2019;7(10).
 37. García-cobos S, Arroyo M, Campos J, Pérez-vázquez M, Aracil B, Cercenado E, et al. Novel mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics in *Haemophilus parainfluenzae*: β -lactamase-negative ampicillin resistance and inhibitor-resistant TEM β -lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(5):1054–9.
 38. Puig C, Grau I, Marti S, Tubau F, Calatayud L, Pallares R, et al. Clinical and molecular epidemiology of *Haemophilus influenzae* causing invasive disease in adult patients. *PLoS One.* 2014;9(11).
 39. Han MS, Jung HJ, Lee HJ, Choi EH. Increasing Prevalence of Group III

- Penicillin-Binding to Beta-Lactams Among Nontypeable *Haemophilus*. *Microbial Drug Resistance*. 2019;25(4).
40. Tchatchouang S, Nzouankeu A, Hong E, Terrade A, Denizon M, Deghmane AE, et al. Analysis of *Haemophilus* species in patients with respiratory tract infections in Yaoundé, Cameroon. *Int J Infect Dis*. 2020;100:12–20.
 41. Faccone D, Lopez-ruitti P, Vazquez M, Guerriero L, Lucero C, Galletti P, et al. Molecular characterization of a clinical *Haemophilus parainfluenzae* isolate with cefotaxime resistance and decreased susceptibility to fluoroquinolones. *Infection, Genetics and Evolution*. 2016;44:507–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.003>
 42. Tinguely R, Seiffert SN, Furrer H, Perreten V, Droz S, Endimiani A. Emergence of extensively drug-resistant *Haemophilus parainfluenzae* in Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(6):2867–9.
 43. Marti S, Puig C, de la Campa AG, Tirado-Velez JM, Tubau F, Domenech A, et al. Identification of *Haemophilus haemolyticus* in clinical samples and characterization of their mechanisms of antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(1):80–4.
 44. Roberts MC, Soge OO, No DB. Characterization of macrolide resistance genes in *Haemophilus influenzae* isolated from children with cystic fibrosis. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(1):100–4.
 45. Seyama S, Wajima T, Suzuki M, Ushio M, Fujii T, Noguchi N. Emergence and molecular characterization of *Haemophilus influenzae* harbouring *mef(A)*-authors' response. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(6):1846–1846.
 46. Sierra Y, Gonza A, Carrera-salinas A, Va DA, Ayats J, Ardanuy C, et al. Genome-wide analysis of urogenital and respiratory multidrug-resistant *Haemophilus parainfluenzae*. *J Antimicrob Chemother*. 2021; 1741–51.
 47. Abotsi RE, Govinden U, Moodley K, Essack S. Fluoroquinolone, Macrolide, and Ketolide Resistance in *Haemophilus parainfluenzae* from South Africa. *Microb Drug Resist*. 2017;23(6):667–73.
 48. Bogdanovich T, Bozdogan B, Appelbaum PC. Effect of efflux on telithromycin and macrolide susceptibility in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(3):893–8.

49. Atkinson CT, Kunde DA, Tristram SG. Acquired macrolide resistance genes in *Haemophilus influenzae*? *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(8):2234–6.
50. Peric M, Bozdogan B, Galderisi C, Krissinger D, Rager T, Appelbaum PC. Inability of L22 ribosomal protein alteration to increase macrolide MICs in the absence of efflux mechanism in *Haemophilus influenzae* HMC-S. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54(2):393–400.
51. Hegstad K, Mylvaganam H, Janice J, Josefsen E, Sivertsen A, Skaare D. Role of Horizontal Gene Transfer in the Development of Multidrug Resistance in *Haemophilus influenzae*. *mSphere.* 2020;5(1):1–13.
52. Soge OO, Roberts MC. *tet(M)*-carrying *Haemophilus influenzae* as a potential reservoir for mobile antibiotic resistance genes. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(7):1642–3.
53. Tanaka E, Wajima T, Noguchi N. Earlier generation quinolones can be useful in identifying *Haemophilus influenzae* strains with low susceptibility to quinolone isolated from paediatric patients. *J Med Microbiol.* 2019;68(8):1227–32.
54. Pérez-Vázquez M, Román F, Aracil B, Cantón R, Campos J. In Vitro Activities of Garenoxacin (BMS-284756) against *Haemophilus influenzae* Isolates with Different Fluoroquinolone Susceptibilities. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(11):3539–41.
55. Takeuchi N, Ohkusu M, Hoshino T, Yamamoto S, Segawa S, Murata S, et al. Emergence of *Haemophilus influenzae* with low susceptibility to quinolones isolated from pediatric patients in Japan. *J Infect Chemother.* 2021;27(7):1020–6.
56. Brenwald NP, Andrews JM, Jevons G, Wise R. Detection of ciprofloxacin resistance in *Haemophilus influenzae* using nalidixic acid and BSAC methodology [3]. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51(5):1311–2.
57. Gannon MCK. “Antimicrobial resistance in *Haemophilus species*”. Doktora tezi, Hong Kong Üviversitesi, 2006.
58. 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(3):781–4.

59. Cherkaoui A, Gaïa N, Baud D, Leo S, Fischer A, Ruppe E, et al. Molecular characterization of fluoroquinolones, macrolides, and imipenem resistance in *Haemophilus influenzae*: analysis of the mutations in QRDRs and assessment of the extent of the AcrAB-TolC-mediated resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2018;37(11):2201–10.
60. Chen D, Wen S, Feng D, Xu R, Liu J, Peters BM, et al. Microbial virulence, molecular epidemiology and pathogenic factors of fluoroquinolone-resistant *Haemophilus influenzae* infections in Guangzhou, China 11 Medical and Health Sciences 1108 Medical Microbiology. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2018;17(1):1–9.
61. Shoji H, Shirakura T, Fukuchi K, Takuma T, Hanaki H, Tanaka K, et al. A molecular analysis of quinolone-resistant *Haemophilus influenzae*: Validation of the mutations in Quinolone Resistance-Determining Regions. *J Infect Chemother*. 2014;20(4):250–5.
62. Davies TA, Kelly LM, Hoellman DB, Ednie LM, Clark CL, Bajaksouzian S, et al. Activities and postantibiotic effects of gemifloxacin compared to those of 11 other agents against *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(3):633–9.
63. 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. *J Clin Microbiol*. 2004;42(3):1185–91.
64. Yokota SI, 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(1):361–5.
65. Cardines R, Daprai L, Giufrè M, Torresani E, Garlaschi ML, Cerquetti M. Genital carriage of the genus *Haemophilus* in pregnancy: Species distribution and antibiotic susceptibility. *J Med Microbiol*. 2015;64(7):724–30.
66. Rodríguez-Martínez JM, López-Hernández I, Pascual Á. Molecular characterization of high-level fluoroquinolone resistance in a clinical isolate of *Haemophilus parainfluenzae*. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(3):673–5.
67. López-Hernández I, Machuca J, Díaz De Alba P, Sarvisé C, Gómez F,

- Rodríguez-Martínez JM, et al. Molecular Characterization of Fluoroquinolone-Resistant *Haemophilus parainfluenzae* Clinical Isolates in Spain. *Microb Drug Resist*. 2017;23(8):935–9.
68. Law DKS, Shuel M, Bekal S, Bryce E, Tsang RSW. Genetic detection of quinolone resistance in *Haemophilus parainfluenzae*: Mutations in the quinolone resistance-determining regions of *gyrA* and *parC*. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2010;21(1):20–3.
 69. Kim IS, Lee NY, Kim S, Ki CS, Kim SH. Reduced levofloxacin susceptibility in clinical respiratory isolates of *Haemophilus influenzae* is not yet associated with mutations in the dna gyrase and topoisomerase II genes in Korea. *Yonsei Med J*. 2011;52(1):188–91.
 70. Mohd-Zain Z, Kamsani NH, Ahmad N. Molecular insights of co-trimoxazole resistance genes in *Haemophilus influenzae* isolated in Malaysia. *Trop Biomed*. 2013;30(4):584–90.
 71. Enne VI, King A, Livermore DM, Hall LMC. Sulfonamide resistance in *Haemophilus influenzae* mediated by acquisition of *sul2* or a short insertion in chromosomal *folP*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(6):1934–9.
 72. Kaygusuz A, Töreci K. Antibiyotikler. In: Kiraz N, editor. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ders Kitabı- Cilt 2. İstanbul Üniversitesi Basım ve Yayınevi; 2011. p. 615–60.
 73. MP Bajanca Lavado, I Casin, MV Vaz Pato. Beta-lactamase-producing *Haemophilus influenzae* isolated in Portugal, 1989-1992. *Pathol Biol (Paris)*. 1994;42(5):481–6.
 74. Tristram SG, Pitout MJ, Forward K, Campbell S, Nichols S, Davidson RJ. Characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing isolates of *Haemophilus parainfluenzae*. *J Antimicrob Chemother*. 2008;61(3):509–14.
 75. Dabernat H, Delmas C, Seguy M, Pelissier R, Faucon G, Bennamani S, et al. Diversity of β -Lactam Resistance-Confering Amino Acid Substitutions in Penicillin-Binding Protein 3 of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(7):2208–18.
 76. Hasegawa K, Chiba N, Kobayashi R, Murayama SY, Iwata S, Sunakawa K, et al. Rapidly Increasing Prevalence of β -Lactamase-Nonproducing, Ampicillin-

- Resistant *Haemophilus influenzae* Type b in Patients with Meningitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(5):1509–14.
77. Atkinson CT, Kunde DA, Tristram SG. Expression of acquired macrolide resistance genes in *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(12):3298–301.
 78. Seyama S, Wajima T, Suzuki M, Ushio M, Fujii T, Noguchi N. Emergence and molecular characterization of *Haemophilus influenzae* harbouring *mef(A)*. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(3):948–9.
 79. Peric M, Bozdogan B, Jacobs MR, Appelbaum PC. Effects of an efflux mechanism and ribosomal mutations on macrolide susceptibility of *Haemophilus influenzae* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(3):1017–22.
 80. Roberts MC, No DB, Soge OO. Comment on: Acquired macrolide resistance genes in *Haemophilus influenzae*? *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(12):3408–9.
 81. Controlling the Growth of Microbes. In: Burton. p. 156–61.
 82. Rodríguez-Arce I, Martí S, Euba B, Fernández-Calvet A, Moleres J, López-López N, et al. Inactivation of the thymidylate synthase *thyA* in non-typeable *Haemophilus influenzae* modulates antibiotic resistance and has a strong impact on its interplay with the host airways. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7.
 83. Washington Üniversitesi. “Nomenclature for Tetracycline Genes”. Erişim Tarihi 20.07.2022. <https://faculty.washington.edu/marilynr>.
 84. Endimiani A, Allemann A, Wüthrich D, Lupo A, Hilty M. First report of the macrolide efflux genetic assembly (MEGA) element in *Haemophilus parainfluenzae*. *Int J Antimicrob Agents.* 2017;49(2):265–6.
 85. Adi E. Z, Mustafa H. L, Elrashdy M. R. Circulating innate and adaptive immunity against anti-*Haemophilus influenzae* type b. *Hum Antibodies.* 2019;27(3):201–12.
 86. Hib Vaccines: Past, Present, and Future Perspectives. *Journal of Immunology Research.* 2016.
 87. Okulu Y. “*Haemophilus influenzae* Kökenlerinde Antibiyotiklere Direnç

- Oranı ve Ampisilin Direncinin Genotipik Olarak Belirlenmesi”. Tıpta uzmanlık tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Aydın, Türkiye, 2011.
88. Guo L, Zhang J, Xu C, Zhao Y, Ren T, Zhang B, et al. Molecular characterization of fluoroquinolone resistance in *Haemophilus parasuis* isolated from pigs in South China. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(3):539–42.
 89. Parkan ÖM. “Klinik *Stenotrophomonas maltophilia* izolatlarının antimikrobiyal duyarlılığı ve moleküler epidemiyolojisi”. Tıpta uzmanlık tezi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kayseri, Türkiye, 2019.
 90. European Centre for Disease Prevention and Control. *Haemophilus influenzae*: Annual Epidemiological Report for 2018. *Surveill Rep*. 2020;(2119):1–8.
 91. Kuvat N. *Haemophilus influenzae* suşlarında antibiyotik direnci ve direncin moleküler analizi. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi; 2011.
 92. Doern G V., Chapin KC. Laboratory identification of *Haemophilus influenzae*: Effects of basal media on the results of the satellitism test and evaluation of the RapID NH system. *J Clin Microbiol*. 1984;20(3):599–601.
 93. Dealler SF, Foweraker J, Lawson P, Fortune S. Provisional identification of *Haemophilus influenzae* from sputum cultures within 1 h by rapid enzyme tests. *J Med Microbiol*. 1991;35(1):49–52.
 94. Tebbutt GM. Evaluation of some methods for the laboratory identification of *Haemophilus influenzae*. *J Clin Pathol*. 1983;36(9):991–5.
 95. Bruin JP, Kostrzewa M, Van Der Ende A, Badoux P, Jansen R, Boers SA, et al. Identification of *Haemophilus influenzae* and *Haemophilus haemolyticus* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33(2):279–84.
 96. Şenol G, Eriş FN. Akciğer Enfeksiyonlarında *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* ve *Streptococcus pneumoniae* Suşlarının İzolasyon Oranları ve Antibiyotiklere Direnci. *Toraks Derg*. 2000;1:46–50.
 97. Sader HS, Flamm RK, Streit JM, Carvalhaes CG, Mendes RE. Antimicrobial activity of ceftaroline and comparator agents tested against organisms isolated

- from patients with community-acquired bacterial pneumonia in Europe, Asia, and Latin America. *Int J Infect Dis*. 2018;77:82–6.
98. Gür H, Hazirolan G. Investigation of Antibiotic Susceptibility Profiles and Beta-Lactamase Activity of *Haemophilus influenzae* Isolates. *Ankem Dergisi*. 2020;34(1):18–24.
 99. Kılıç H, Akyol S, Parkan ÖM, Dinç G, Sav H, Aydemir G. Molecular characterization and antibiotic susceptibility of *Haemophilus influenzae* clinical isolates. *Infez Med*. 2017;25(1):27–32.
 100. <https://www.cdc.gov/drugresistance/covid19.html>.
 101. Reig R, Hermida M, Fontanals D, Lite J, Martí C, Morera MA, et al. Characterization of *Haemophilus influenzae*'s resistance to ampicillin. *Med Clin*. 1991;96(19):727–9.
 102. Bozdogan B, Tristram S, Appelbaum PC. Combination of altered PBPs and expression of cloned extended-spectrum β -lactamases confers cefotaxime resistance in *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57(4):747–9.
 103. Tristram SG. Effect of extended-spectrum β -lactamases on the susceptibility of *Haemophilus influenzae* to cephalosporins. *J Antimicrob Chemother*. 2003;51:39–43.
 104. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Erişim Tarihi 16.09.2022. <https://mic.eucast.org/>.
 105. Matic V, Bozdogan B, Jacobs MR, Ubukata K, Appelbaum PC. Contribution of β -lactamase and PBP amino acid substitutions to amoxicillin/clavulanate resistance in β -lactamase-positive, amoxicillin/clavulanate-resistant *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52(6):1018–21.

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Arş. Gör. Dr. Hatice Hanım YURTTAKAL'a ait "Klinik örneklerden izole edilen *Haemophilus* türlerinin antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi ve moleküler karakterizasyonu" adlı çalışma, jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih: 06.12.2022

İmza

Başkan: Doç. Dr. Pınar SAĞIROĞLU (Danışman)	
Üye: Prof. Dr. A. Nedret KOÇ	
Üye: Prof. Dr. M. Altay ATALAY	