



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

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *HAEMOPHILUS*
INFLUENZAE SUŞLARININ İN VİTRO ANTİBİYOTİK
DUYARLILIKLARININ EUCAST VE CLSI KRİTERLERİ
DOĞRULTUSUNDA DEĞERLENDİRİLMESİ VE BETA-
LAKTAM DİRENCİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ**

Dr. Aylin İrem OCAKLI

UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA

2023

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

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *HAEMOPHILUS*
INFLUENZAE SUŞLARININ İN VİTRO ANTİBİYOTİK
DUYARLILIKLARININ EUCAST VE CLSI KRİTERLERİ
DOĞRULTUSUNDA DEĞERLENDİRİLMESİ VE BETA-
LAKTAM DİRENCİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ**

Dr. Aylin İrem OCAKLI

UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Burçin ŞENER

ANKARA

2023

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince; bilgisi, deneyimi ve sevgisi ile daima yanımda olan ve bana yol gösteren, öğrencisi olmaktan her zaman onur duyduğum danışman hocam Sayın Prof. Dr. Burçin ŞENER'e,

Asistanlığım boyunca bilgi ve deneyimleri ile bana ışık tutan, daha çok çalışmak için ilham veren, benden desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Banu SANCAK'a,

Eğitimim süresince bilgi birikimime sağladıkları her türlü katkıları ve emekleri için Hacettepe Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda görevli olan tüm hocalarıma,

Tez sürecimdeki destekleri için Dr. Ekin KIRBAŞ, Dr. Neşe İNAL ve Dr. Adem ÖZDEMİR'e ve birlikte çalışmaktan keyif aldığım tüm asistan arkadaşlarıma,

Tez çalışmalarım boyunca tüm sorularımı yanıtlayan, İsveç EUCAST Geliştirme Laboratuvarı'nda görev yapan Doç. Dr. Onur KARATUNA'ya

Asistanlığım boyunca değerli teknik desteği için Nejla KILIÇ'a, beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm teknik personelimize ve merkez laboratuvar ekibine,

Tez süresince benzer konudaki deneyimlerini benden esirgemeyen Uzm. Dr. Hatice Hanım YURTTAKAL'a

TSA-2021-18999 numaralı bu projeye destek veren Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Koordinasyon Birimi'ne,

Sadece bu süreçte değil daima yanımda olan canım annem Sevdiye SOMUN'a, babam Kemal SOMUN'a, ablalarım Gökben YILMAZ ve Gökçe ODABAŞI'na, eşimin ailesi annem Fethiye OCAKLI'ya ve babam Hayrettin OCAKLI'ya ve akademik çalışmalarım beni daima motive eden, en büyük destekçim, sevgili eşim Fatih Çağrı OCAKLI'ya tüm kalbimle teşekkür ederim.

ÖZET

Ocaklı Aylin İrem, Klinik örneklerden izole edilen *Haemophilus influenzae* suşlarının in vitro antibiyotik duyarlılıklarının EUCAST ve CLSI kriterleri doğrultusunda değerlendirilmesi ve beta-laktam direncinin moleküler analizi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2023. İnvazif ve invazif olmayan enfeksiyonlardan sorumlu olan *Haemophilus influenzae* izolatlarının antibiyotik direnci özellikle beta-laktam grubu antibiyotikler başta olmak üzere tüm dünyada giderek artmaktadır. Bu çalışmada *H. influenzae* izolatlarının in vitro antibiyotik duyarlılık profillerinin EUCAST ve CLSI kriterleri doğrultusunda değerlendirilmesi, beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı gelişen direnç mekanizmalarının moleküler düzeyde incelenmesi, EUCAST ve CLSI kriterlerine göre elde edilen sonuçların altta yatan direnç mekanizması ile ilişkisinin irdelenmesi amaçlandı. Çalışmaya Ocak 2018-Haziran 2022 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Merkez Bakteriyoloji Laboratuvarında kan ve solunum yolu örneklerinden izole edilen 150 adet *H. influenzae* izolatu dahil edildi. İzolatların tanımlanması MALDI-TOF MS ile yapıldı. Ampisilin, amoksisilin-klavulanik asit, meropenem, sefotaksim, sefuroksim, tetrasiklin, trimetoprim-sülfametoksazole duyarlılık durumu disk difüzyon yöntemiyle belirlendi. Ampisilin ve sefotaksim için MİK değerleri ise sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle belirlendi. EUCAST önerileri doğrultusunda, florokinolonlara yönelik nalidiksik asit tarama testi uygulandı ve beta-laktam direnç mekanizmalarının saptanması için önerilen akış şeması gereğince benzilpenisilin G tarama testi yapıldı. Duyarlılık test sonuçları EUCAST rehberine göre değerlendirildi. Ayrıca izolatların CLSI kriterleri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi kullanılarak elde edilen duyarlılık sonuçları Laboratuvar Bilgi Yönetim Sistemi verileri üzerinden alındı. İzolatların beta-laktamaz aktivitesi kromojenik nitrosetin diskiyle saptandı. Beta-laktamaz pozitif izolatlarda *bla*_{TEM-1} ve *bla*_{ROB-1} genlerinin varlığı konvansiyonel PZR yöntemiyle araştırıldı. Beta-laktamaz negatif ampisilin dirençli (BLNAR) ve beta-laktamaz pozitif amoksisilin klavulanik asit dirençli (BLPACR) olarak belirlenen izolatlarda *ftsI* geninin PZR ürünlerine dizi analizi yapılarak beta-laktam direncine yol açan mutasyonlar saptandı. Çalışmaya 102 balgam, 24 bronkoalveolar lavaj, 13 derin trakeal aspirasyon ve 11 kan örneği dahil edildi. Disk difüzyon yöntemiyle EUCAST kriterleri doğrultusunda, izolatların %58,7'si

benzilpenisilin G'ye, %35,3'ü ampisiline, %32,7'si amoksisilin-klavulanik aside, %38,9'u sefuroksime, %1,3'ü sefotaksime, %1,3'ü meropeneme, %6,7'si nalidiksik aside, %2'si tetrasikline, %37,6'sı trimetoprim-sülfametoksazole dirençli bulundu. Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle EUCAST kriterleri doğrultusunda, izolatların %24,3'ü ampisiline, %4,7'si sefotaksime dirençli bulundu. EUCAST ve CLSI sonuçları karşılaştırıldığında; ampisilin ve amoksisilin-klavulanik asit için direnç oranı EUCAST'e göre yapılan antibiyotik duyarlılık testlerinde daha yüksek bulunurken, tetrasiklin ve trimetoprim-sülfametoksazol için direnç oranının CLSI'a göre yapılan duyarlılık testlerinde daha yüksek olduğu görüldü. Sefalosporinler açısından sefotaksim duyarlılık sonuçları benzerken, sefuroksim için direnç oranı EUCAST'e göre yapılan antibiyotik duyarlılık testlerinde dikkat çekici bir oranda daha yüksek bulundu. Meropenem için iki kılavuz arasındaki duyarlılık sonuçları benzerdi. Nitrosefin diskiyle 18 izolat beta-laktamaz pozitif olarak saptandı ve tümünde *bla*_{TEM-1} geni pozitif olarak bulundu. İzolatların 35'i (%23,3) BLNAR, 16'sı (%10,7) BLPACR olarak belirlendi. Bu 51 izolatın 49'una yapılan *ftsI* geninin dizi analizi sonucunda dört izolatta bir mutasyon saptanmadı ve genotipik sınıflandırmaya dahil edilmedi. Dizi analizinde 18 pozisyonda toplamda 19 aminoasit yer değişikliği saptandı ve en sık görülen mutasyonlar D350N, M377I, G490E, A502V ve N526K olarak belirlendi. *ftsI* mutasyonları temel alınarak oluşturulan genotipik sınıflandırmalara göre, grup I'da bir izolat, grup IIa'da dokuz izolat, grup IIb'de 25 izolat, grup IIc'de iki izolat, grup IId'de üç izolat, grup III benzerinde dört izolat, grup III+'da bir izolat belirlendi. Direnç mutasyonu görülen 34 BLNAR izolatının 31'i düşük düzey dirençli BLNAR (grup I ve II) olarak bulunurken, üçü yüksek düzey dirençli (grup III) olarak bulundu. Direnç mutasyonu görülen 11 BLPACR izolatının dokuzu düşük düzey dirençli BLPACR olarak bulunurken, ikisi yüksek düzey dirençli BLPACR olarak bulundu. Yüksek düzey BLNAR ve BLPACR dirençle ilişkilendirilen *ftsI* mutasyonlarının saptanması, *H.influenzae* izolatlarında rutin laboratuvarlarda uygulanan nitrosefin testi ve kullanılan antibiyotik duyarlılık testlerinin performansının gözden geçirilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Anahtar kelimeler: *Haemophilus influenzae*, antibiyotik direnci, *ftsI*, BLNAR, BLPACR

Destekleyen kuruluş: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Proje No: TSA-2021-18999

ABSTRACT

Ocaklı Aylin İrem, Evaluation of in vitro antibiotic susceptibility of *Haemophilus influenzae* strains isolated from clinical samples according to the EUCAST and CLSI criteria and molecular analysis of beta-lactam resistance, Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Thesis in Medical Microbiology, Ankara, 2023. Antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae* isolates, that cause invasive and non-invasive infections, is increasing all over the world, particularly in beta-lactam group antibiotics. This study aimed to analyse the in vitro antibiotic susceptibility profiles of *H. influenzae* isolates according to the EUCAST and CLSI criteria, to examine the molecular mechanisms underlying resistance development against beta-lactam group antibiotics and to evaluate the concordance of EUCAST and CLSI results with the genomic analysis. Between January 2018 and June 2022, a total of 150 *H. influenzae* isolates, obtained from blood and respiratory tract samples, were included in the study. Identification of the isolates was performed by MALDI-TOF MS. Antimicrobial susceptibilities of ampicillin, amoxicillin-clavulanic acid, meropenem, cefotaxime, cefuroxime, tetracycline and trimethoprim-sulfamethoxazole were determined by EUCAST disc diffusion method. MICs of ampicillin and cefotaxime were determined by EUCAST broth microdilution method. In accordance with the EUCAST recommendations, the nalidixic acid screening test for fluoroquinolones was performed and the benzylpenicillin G screening test was performed according to the recommended flowchart for the detection of beta-lactam resistance mechanisms. The results were interpreted according to the EUCAST criteria. In addition, antibiotic susceptibility results of the isolates obtained using the disc diffusion method according to the CLSI criteria were extracted from the Laboratory Information Management System data. Beta-lactamase production was determined by the chromogenic nitrocefin disc. The presence of the *bla*_{TEM-1} and the *bla*_{ROB-1} genes in beta-lactamase positive isolates was investigated by conventional PCR method. Mutations causing beta-lactam resistance were detected by sequence analysis of PCR products of the *ftsI* gene in the isolates determined as beta-lactamase negative ampicillin resistant (BLNAR) and beta-lactamase positive amoxicillin clavulanic acid resistant (BLPACR). The distribution of the *H. influenzae* isolates included to the study were as follows: 102 from sputum, 24 from bronchoalveolar lavage, 13 from deep tracheal

aspiration and 11 from blood samples. According to the EUCAST disk diffusion method, 58.7% of the isolates were resistant to benzylpenicillin G, 35.3% to ampicillin, 32.7% to amoxicillin-clavulanic acid, 38.9% to cefuroxime, 1.3% to cefotaxime, 1.3% to meropenem, 6.7% to nalidixic acid, 2% to tetracycline, 37.6% to trimethoprim-sulfamethoxazole. EUCAST broth microdilution method revealed that 24.3% of the isolates were resistant to ampicillin and 4.7% to cefotaxime. While the resistance rate for ampicillin and amoxicillin-clavulanic acid was found to be higher in the antibiotic susceptibility tests performed according to the EUCAST, the resistance rate for tetracycline and trimethoprim-sulfamethoxazole was found to be higher in the susceptibility tests performed according to the CLSI. While cefotaxime susceptibility results were similar for cephalosporins, the resistance rate for cefuroxime was found to be significantly higher in EUCAST disk diffusion method. Susceptibility results for meropenem between the two guidelines were similar. Eighteen isolates were detected as beta-lactamase positive by the nitrocefin disc and all of them were found to be positive for the *bla*_{TEM-1} gene. Thirty-five (23.3%) of the isolates were identified as BLNAR and 16 (10.7%) as BLPACR. As a result of the sequence analysis of the *ftsI* gene performed on 49 of these 51 isolates, no mutation was detected in four isolates which were not included in the genotypic classification. In the sequence analysis, a total of 19 amino acid substitutions were detected in 18 positions and the most common mutations were determined as D350N, M377I, G490E, A502V and N526K. According to the genotypic classifications based on *ftsI* mutations, there was one isolate in group I, nine isolates in group IIa, 25 isolates in group IIb, two isolates in group IIc, three isolates in group IId, four isolates in group III like and one isolate in group III+. Of the 34 BLNAR isolates with resistance mutations, 31 were found to be low-level resistant BLNAR (group I and II), while three were found to be high-level resistant (group III). While nine of the 11 BLPACR isolates with resistance mutation were found to be low-level resistant BLPACR, two were found to be high-level resistant BLPACR. Detection of *ftsI* mutations associated with high-level BLNAR and BLPACR resistance reveals the need to review the performance of the nitrocefin test and antibiotic susceptibility tests used in routine laboratories in *H. influenzae* isolates.

Keywords: *Haemophilus influenzae*, antibiotic resistance, *ftsI*, BLNAR, BLPACR

Supporting organization: Hacettepe University Scientific Research Projects
Coordination Unit, Project No: TSA-2021-18999

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	x
ŞEKİLLER.....	xiii
TABLolar.....	xiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. <i>Haemophilus</i> spp.	3
2.1.1. Tarihçe.....	3
2.1.2. Sınıflandırma.....	3
2.1.3. Mikrobiyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri.....	4
2.2. <i>Haemophilus influenzae</i> Enfeksiyonları.....	6
2.2.1. Epidemiyoloji.....	6
2.2.2. Patogenez ve Bağışıklık.....	7
2.2.3. Risk Faktörleri.....	9
2.2.4. Klinik Hastalıklar.....	10
2.3. Laboratuvar Tanısı.....	14
2.3.1. Klinik Örneklerin Toplanması, Taşınması ve Saklanması.....	14
2.3.2. Klinik Örneklerin Direkt İncelenmesi.....	15
2.3.3. İzolasyon Yöntemleri.....	17
2.3.4. Tanımlama.....	18
2.3.5. <i>Haemophilus</i> Türlerinin Biyotiplendirilmesi.....	20
2.3.6. <i>H. influenzae</i> 'nin Serotiplendirilmesi.....	20
2.3.7. İn vitro Antibiyotik Duyarlılığı.....	21
2.4. Tedavi.....	21
2.5. Antibiyotik Direnci.....	22
2.5.1. Beta-laktam Antibiyotik Direnci.....	22
2.5.2. Makrolit Direnci.....	29
2.5.3. Tetrasiklin Direnci.....	30
2.5.4. Kinolon Direnci.....	30

2.5.5. Trimetoprim-Sülfametoksazol Direnci	31
2.5.6. Kloramfenikol Direnci	31
2.6. <i>H. influenzae</i> Tip b Aşılıarı	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. Bakteri İzolatları	33
3.2. İzolatların Saklanması ve Canlandırılması	33
3.3. İzolatların Tanımlanması	33
3.4. İzolatların Serolojik Tanımlanması	33
3.5. İn-vitro Antibiyotik Duyarlılık Testleri	34
3.5.1. Kullanılan Antibiyotikler	35
3.5.2. Besiyerinin Hazırlanması	36
3.5.3. Disk Difüzyon Testi	37
3.5.4. Sıvı Mikrodilüsyon Testi	39
3.5.5. β -laktamaz Aktivitesinin Belirlenmesi	42
3.6. Moleküler Yöntemlerle Direnç Genlerinin Araştırılması	42
3.6.1. DNA İzolasyonu	42
3.6.2. Kullanılan Primerler	43
3.6.3. PZR Karışımı ve Amplifikasyon Koşulları	43
3.6.4. Agaroz Jel Elektrofrezisi	44
3.6.5. Dizi Analizi	45
4. BULGULAR	47
4.1. Çalışma İzolatları	47
4.2. İzolatların Serolojik Tanımlanması	48
4.3. Beta-laktamaz Varlığının Gösterilmesi	49
4.4. Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçları	49
4.4.1. EUCAST Disk Difüzyon ve Sıvı Mikrodilüsyon Testi Sonuçları	49
4.4.2. CLSI ve EUCAST Kriterleri Doğrultusunda Antibiyotik Duyarlılık Profillerinin Karşılaştırılması	51
4.5. Beta-laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmalarının Belirlenmesi	52
4.5.1. <i>bla</i> _{TEM-1} ve <i>bla</i> _{ROB-1} Direnç Genlerinin Varlığı	52
4.5.2. <i>ftsI</i> Gen Mutasyonları	53
4.5.3. BLNAS, BLNAR, BLPAR ve BLPACR Gruplarının Beta-laktam Grubu Antibiyotiklere Duyarlılık Profillerinin Karşılaştırılması	57

4.5.4. BLNAS, BLNAR, BLPAR ve BLPACR Gruplarının Fenotipik ve Genotipik Test Sonuçlarının Karşılaştırılması	58
5. TARTIŞMA.....	59
6. SONUÇLAR.....	74
KAYNAKLAR.....	76

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALA	: δ-aminolevulinik asit
AMC	: Amoksisilin-klavulanik asit
AMP	: Ampisilin
ATCC	: American Type Culture Collection
BAL	: Bronkoalveolar lavaj
bp	: Baz çifti
BH	: Büyük hata
BLNAR	: Beta-laktamaz negatif ampisilin dirençli
BLNAS	: Beta-laktamaz negatif ampisilin duyarlı
BLPACR	: Beta-laktamaz pozitif amoksisilin-klavulanik asit dirençli
BLPAR	: Beta-laktamaz pozitif ampisilin dirençli
BOS	: Beyin omurilik sıvısı
°C	: Santigrat derece
CAMP	: Christie, Atkins, Munch-Petersen
CAT	: Kloramfenikol asetiltransferaz
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
CIP	: Siprofloksasin
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
CO ₂	: Karbondioksit
CTX	: Sefotaksim
CXM	: Sefuroksim
ÇBH	: Çok büyük hata
DD	: Disk difüzyon
dH ₂ O	: Distile su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
DTA	: Derin trakeal aspirasyon
ECDC	: European Centre for Disease Prevention and Control
EUCAST	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA	: Food and Drug Administration
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	: Haemophilus Test Medium
Ig	: İmmünoglobulin
ISO	: International Organization for Standardization
KOAH	: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
KOB	: Koloni oluşturan birim
MALDI-TOF MS	: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry
MEM	: Meropenem
MH-F	: Mueller Hinton Fastidious
MİK	: Minimum inhibitör konsantrasyon
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotit
NADP	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NAL	: Nalidiksik asit
NK	: Negatif kontrol
NTHi	: Tiplendirilemeyen <i>Haemophilus influenzae</i>
OMP	: Outer membrane protein
PBP	: Penisilin bağlayan protein
PCG	: Benzilpenisilin G
PK	: Pozitif kontrol
PRP	: Poliribozil ribitol fosfat
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
rpm	: Revolutions per minute
rRNA	: Ribozomal ribonükleik asit
SF	: Serum fizyolojik
SMD	: Sıvı mikrodilüsyon
SOAR	: Survey of Antibiotic Resistance

SXT	: Trimetoprim-sülfametoksazol
TBE	: Tris-Borik asit-EDTA
TE	: Tris-EDTA
TET	: Tetrasiklin
Tm	: Melting temperature
Tn	: Transpozon
V	: Volt
L	: Litre
μg	: Mikrogram
μL	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
pmol	: Pikomol

ŞEKİLLER

- Şekil 1.** Lam aglütinasyon yöntemiyle *H. influenzae* izolatlarının serolojik tanımlanması... 34
- Şekil 2.** Disk difüzyon yöntemiyle antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi 38
- Şekil 3.** *H. influenzae* ve bir beta-laktam antibiyotiğin disk etrafında üreme görülen inhibisyon zonu örneği..... 39
- Şekil 4.** Disk difüzyonda çift zon örneği 39
- Şekil 5.** Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi 41
- Şekil 6.** β -laktamaz aktivitesinin nitrosefin diskiyle belirlenmesi 42
- Şekil 7.** UGENE programı kullanılarak görüntülenen bir elektroferogram örneği..... 45
- Şekil 8.** UGENE programı kullanılarak mutasyon varlığının araştırılması 46
- Şekil 9.** PZR ile *bla*_{TEM-1} geni pozitif bulunan izolatlara ait jel görüntüsü 53
- Şekil 10.** PZR ile *bla*_{ROB-1} geni negatif bulunan izolatlara ait jel görüntüsü..... 53
- Şekil 11.** İzolatların EUCAST akış şemasına göre fenotipik olarak sınıflandırılması..... 54
- Şekil 12.** *ftsI* gen amplifikasyonu yapılan izolatlara ait jel görüntüsü 55

TABLULAR

Tablo 1. <i>Haemophilus</i> türlerinin ayırt edilmesinde kullanılan fenotipik özellikler	5
Tablo 2. <i>H. influenzae</i> ve <i>H. parainfluenzae</i> biyotipleri	5
Tablo 3. EUCAST antibiyotik duyarlılık yöntemlerinin koşulları	21
Tablo 4. CLSI antibiyotik duyarlılık yöntemlerinin koşulları	21
Tablo 5. Beta-laktam antibiyotiklere direnç mekanizmalarına göre fenotipik ve genotipik sınıflandırma	23
Tablo 6. <i>ftsI</i> mutasyonları ve sınıflandırmalar	26
Tablo 7. <i>ftsI</i> genindeki mutasyonlara göre <i>H. influenzae</i> izolatlarının gruplandırılması.....	27
Tablo 8. EUCAST tarafından önerilen β -laktam direnç mekanizmaları akış şeması	29
Tablo 9. <i>H. influenzae</i> tip b konjuge aşıları	32
Tablo 10. Kullanılan disklerin antibiyotik içerikleri ve zon çaplarına göre değerlendirilmesi	35
Tablo 11. MH-F agarın hazırlanmasında kullanılan malzemeler.....	36
Tablo 12. MH-F sıvı besiyerinin hazırlanmasında kullanılan malzemeler	36
Tablo 13. Antibiyotiklere ait dilüsyon aralıkları.....	41
Tablo 14. Kullanılan primer dizileri	43
Tablo 15. PZR karışımı	44
Tablo 16. Amplifikasyon koşulları	44
Tablo 17. İzolatların ait olduğu klinik örneklerin dağılımı	47
Tablo 18. Hastaların yaş grubu dağılımı.....	47
Tablo 19. Örneklerin gönderildiği bölümlerin dağılımı	48
Tablo 20. Örneklerin yıllara göre dağılımı	48
Tablo 21. İzolatların EUCAST kriterlerine göre disk difüzyon testi duyarlılık sonuçları.....	49
Tablo 22. MİK ₅₀ , MİK ₉₀ değerleri ve MİK aralıkları	49
Tablo 23. Disk difüzyon yöntemiyle elde edilen sonuçların referans sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması	50

Tablo 24. Tiplendirilebilen <i>H. influenzae</i> izolatları ile NTHi izolatlarının direnç oranlarının karşılaştırılması	51
Tablo 25. EUCAST ve CLSI disk difüzyon yöntemiyle belirlenen antibiyotik duyarlılık sonuçlarının karşılaştırılması	52
Tablo 26. BLNAR ve BLPACR izolatlarda saptanan <i>ftsI</i> gen mutasyonları, izolatların gruplandırılması ve MİK değerleri	56
Tablo 27. BLNAS, BLNAR, BLPAR ve BLPACR gruplarının EUCAST disk difüzyon sonuçlarına göre beta-laktam grubu antibiyotiklere duyarlılık profillerinin karşılaştırılması	57
Tablo 28. İzolatların beta-laktam antibiyotikler açısından fenotipik ve genotipik test sonuçları ve sınıflandırılması	58
Tablo 29. Ülkemizde EUCAST veya CLSI kriterlerine göre yapılan çalışmaların sonuçları	65
Tablo 30. Avrupa’da EUCAST kriterlerine göre yapılan çalışmaların sonuçları	66

1. GİRİŞ

Haemophilus influenzae, üst solunum yolu mikrobiyotasının bir üyesi olmakla birlikte hem çocuklarda hem de yetişkinlerde solunum yolu enfeksiyonunun yanı sıra menenjit ve sepsis gibi ciddi invazif enfeksiyonlara da neden olabilen gram negatif bir kokobasildir. *H. influenzae* suşları, kapsüllü ya da kapsülsüz olabilir. Kapsülsüz *H. influenzae* suşları tiplendirilemeyen *H. influenzae* (NTHi) olarak adlandırılırken, kapsüllü suşlar polisakkarit kapsülün antijen yapısına göre altı farklı serotipe (a, b, c, d, e, f) ayrılır. *H. influenzae* tip b (Hib) aşısının yaygın kullanımıyla invazif enfeksiyona neden olan serotiplerin dağılımı da değişmiştir. Günümüzde kapsülsüz *H. influenzae* suşları tüm yaş gruplarında, özellikle yenidoğanlar, yaşlılar ve alta yatan komorbiditeleri olan kişiler gibi enfeksiyona daha duyarlı gruplar arasında invazif *H. influenzae* hastalığının önde gelen nedeni olmuştur.

H. influenzae'nin neden olduğu enfeksiyonların çoğu ampirik olarak tedavi edilir. *H. influenzae*'ya karşı etkinliğe sahip antibiyotikler arasında beta-laktamlar (örn. amoksisilin, amoksisilin-klavulanik asit veya ikinci ve üçüncü kuşak sefalosporinler), florokinolonlar, makrolitler ve tetrasiklinler yer alır. Genellikle ilk sırada beta-laktamlar tercih edilir. *H. influenzae*'da beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç, genellikle ya bir beta-laktamaz (TEM ve ROB tipi) üretimine (sadece penisilinleri etkiler) ya da beta-laktamaz negatif ampisiline dirençli (BLNAR) izolatlarda olduğu gibi PBP3 olarak da bilinen transpeptidaz enzimini kodlayan *ftsI* geninde oluşan mutasyonlar sonucunda beta-laktamlara karşı afinitenin azalmasına (tüm beta-laktamları etkiler) bağlıdır. İzolatların çok küçük bir kısmı her iki mekanizmaya da sahiptir ve beta-laktamaz pozitif amoksisilin-klavulanik aside dirençli (BLPACR) izolatlar olarak adlandırılırlar. Bu iki direnç mekanizmasının dışında AcrAB atım pompasının aşırı ekspresyonuna bağlı olarak da beta-laktam direnci gelişebilmektedir. Beta-laktamaz üretimi dünyada halen hemen hemen tüm bölgelerde beta-laktam direncinin en yaygın mekanizmasıdır.

Etkenlere yönelik tedavi protokollerinin oluşturulmasında doğru antibiyotik duyarlılık testleri ile elde edilmiş veriler önem taşımaktadır. Tüm dünyada direnç oranları giderek artan *H. influenzae* izolatlarının antibiyotik duyarlılık durumları, Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing-EUCAST) ve Amerikan Klinik ve Laboratuvar

Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI) kılavuzları tarafından önerilen kriterlere göre farklılıklar göstermektedir. Ülkemiz, klinik izolatlarda antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesinde CLSI kılavuzlarından EUCAST kılavuzlarına ve sınır değerlerine geçiş sürecindedir. Halen, ülkemizde birçok merkez *H. influenzae* izolatları için duyarlılık sonuçlarını CLSI kriterlerine göre vermektedir. Farklı kriterlere göre belirlenen antibiyotik duyarlılık sonuçları *H. influenzae* direnç epidemiyolojisi alanında farklı sonuçlara yol açmakta ve buna bağlı olarak da tedavi protokolleri yakından etkilenmektedir.

Bu çalışmada, *H. influenzae* izolatlarının in vitro antibiyotik duyarlılık profillerinin EUCAST ve CLSI kriterleri doğrultusunda değerlendirilmesi, beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı gelişen direnç mekanizmalarının moleküler düzeyde incelenmesi ve EUCAST ve CLSI kriterlerine göre elde edilen sonuçların altta yatan direnç mekanizması ile ilişkisinin irdelenmesi amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Haemophilus* spp.

2.1.1. Tarihçe

Haemophilus influenzae ilk kez 1889–1890 yıllarında Avrupa’da görülen influenza pandemisi sonrasında influenza pnömonisi olan bireylerin solunum yolu örneklerinden Richard Friedrich Johannes Pfeiffer tarafından 1892 yılında izole edilmiş ve “Pfeiffer’s bacillus” ya da *Bacillus influenzae* olarak isimlendirilmiştir (1, 2). 1899 yılında Slawyk (3) ve 1909 yılında Cohen (4) *H. influenzae*’nın neden olduğu menenjit vakaları bildirmiştir. 1933 yılında influenzaya neden olan etkenin aslında bir virüs olduğu keşfedildikten sonra *H. influenzae* daha doğru bir şekilde tanımlanmaya başlanmıştır (5). 1920 yılında Amerikan Bakteriyoloji Derneği üremek için kan faktörlerine gereksinim duyması sebebiyle bakteriyi *Haemophilus influenzae* olarak isimlendirmiştir (6).

1931 yılında Margaret Pittman kapsüllü ve kapsülsüz *H. influenzae* suşlarını tanımlamıştır. Kapsüler polisakkaritlerdeki antijen farklılıklarına göre altı farklı serotipe ayrıldığını saptamış ve tip b serotipi ile menenjit ilişkisini bildirmiştir (7). Dünyada *H. influenzae* tip b (Hib) aşısı 1980’lerden itibaren uygulanmaya başlanmıştır. Ülkemizde ise Hib aşısı 2006 yılında rutin aşılama takvimine eklenmiştir (8). *H. influenzae*, genom analizi yapılan ilk serbest yaşayan organizma olup tam genom dizilimi 1995 yılında tamamlanmıştır (9).

2.1.2. Sınıflandırma

Pasteurellaceae ailesi üyelerinden olan *Haemophilus* cinsinin tanımlanmış dokuz türü insanlar için konak özgülüğüne sahiptir. Bu türler bazı fenotipik özelliklere göre üç gruba ayrılır. *H. influenzae* grubu X faktörüne (hemin) bağımlı *H. influenzae*, *H. aegyptius* ve *H. haemolyticus* türlerinden oluşurken, *H. parainfluenzae* grubu X faktöründen bağımsız *H. parainfluenzae*, *H. parahaemolyticus*, *H. paraphrohaemolyticus*, *H. pittmaniae* ve *H. sputorum* türlerinden oluşur. Son grup ise sadece *H. ducreyi* türünü içerir (10).

H. pittmaniae ve *H. sputorum* yeni *Haemophilus* türleri iken bazı eski *Haemophilus* ve *Actinobacillus* türlerini (*Aggregatibacter aphrophilus*, *Aggregatibacter*

segnis ve *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) içeren yeni bir *Aggregatibacter* cinsi 2006 yılında oluşturulmuştur (11).

2.1.3. Mikrobiyolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

Haemophilus cinsi bakteriler küçük, hareketsiz, sporsuz, aside dirençli olmayan, pleomorfik, fakültatif anaerop, güç üreyen gram negatif kokobasil ya da kısa basillerdir. Üremek için X ve/veya V faktörlerine gereksinim duyarlar. X faktörü, hemin biyosentetik yolundaki bir metabolik ara madde olan protoporfirin IX; V faktörü ise, NAD (Nikotinamid adenin dinükleotit) veya NADP (Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat) olarak kompleks halde nikotinamidden oluşur. Her iki faktör de eritrositlerde bulunur (Yunanca "*haemophilus*", "kan seven" anlamına gelir). Bu faktörler için gereksinimler türlere göre değişir; *H. influenzae*, *H. aegyptius* ve *H. haemolyticus* üremek için hem X hem de V faktörüne ihtiyaç duyarken diğerleri yalnızca tek bir faktöre ihtiyaç duyar. Optimal üreme, %5-7 CO₂ varlığında 35-37 °C 'de gerçekleşir. Tüm türler CAMP reaksiyonu negatiftir ve alkalin fosfataz üretirler (12).

Haemophilus türleri tipik olarak çikolata agarda ürer. *H. influenzae* kolonileri düz ve gri renktedir; kapsüllü suşlar mukoid görünümde olabilir. Suşların çoğu, bir gecelik inkübasyondan sonra konveks veya düz, 1-2 mm çapında koloniler şeklinde ürer. Suşların bazılarında, bazı biyotipler tarafından üretilen indol nedeniyle koku olabilir. Genellikle oksidaz ve katalaz pozitif olmakla birlikte, geç oksidaz reaksiyonu oluşabilir (13).

H. influenzae suşları, kapsüllü ya da kapsülsüz olabilir. Kapsülsüz *H. influenzae* suşları NTHi olarak adlandırılırken, kapsüllü suşlar polisakkarit kapsülün antijen yapısına göre altı farklı serotipe (a, b, c, d, e, f) ayrılır (14). Tip b polisakkariti, karbonhidrat alt ünitesi olarak heksoz şekerlerden ziyade iki pentoz monosakkaridi içeren tek kapsül tipidir. *H. influenzae* tip b'nin kapsüler antijeni; poliribozil ribitol fosfat (PRP) adı verilen bir riboz, ribitol ve fosfat polimeri içerir (13, 15).

Haemophilus cinsi bakterilerin ayırt edilmesinde kullanılan fenotipik özellikler Tablo 1'de yer almaktadır. *H. influenzae* ve *H. parainfluenzae* indol üretimi, üreaz ve ornitin dekarboksilaz aktivitesine göre sekiz biyotipe ayrılır (Tablo 2). Bu biyotiplerin ayrımı epidemiyolojik açıdan yararlıdır (16).

Tablo 1. *Haemophilus* türlerinin ayırt edilmesinde kullanılan fenotipik özellikler (12)

<i>Haemophilus</i> türleri	Faktör gereksinimi		Katalaz	Fermentasyon					İndol üretimi	Üreaz	Ornitin dekarboksilaz	β-galaktozidaz	Hemoliz
	X faktörü	V faktörü		Glukoz	Sükroz	Laktöz	Ksiloz	Mannoz					
<i>H. influenzae</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	D	D	D	-	-
<i>H. aegyptius</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+	+	-	-	D	-	D	+	-	-	+
<i>H. parainfluenzae</i>	-	+	D	+	+	-	-	+	D	D	D	D	-
<i>H. ducreyi</i>	+	-	-	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>H. parahaemolyticus</i>	-	+	D	+	+	-	-	-	-	+	-	D	+
<i>H. pittmaniae</i>	-	+	Z	+	+	-	-	+	B	B	B	+	+
<i>H. paraphrohaemolyticus</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	D	+
<i>H. sputorum</i>	-	+	B	+	B	-	-	-	+	+	-	+	+

+, pozitif; -, negatif; D, değişken; Z, zayıf; B, bilinmiyor.

Tablo 2. *H. influenzae* ve *H. parainfluenzae* biyotipleri (12)

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

2.2. *Haemophilus influenzae* Enfeksiyonları

2.2.1. Epidemiyoloji

Haemophilus türleri erişkinlerin %85'ten fazlasında orofarenks ve nazofarenksin normal bakteriyel mikrobiyotasının bir parçasıdır. Orofarengeal suşların çoğu NTHi ve *H. parainfluenzae* olmakla birlikte, kapsüllü *H. influenzae* suşları da hem çocuklarda hem de erişkinlerde üst solunum yolunun normal mikrobiyotasında bulunabilir (13).

NTHi ile karşılaşma doğumdan sonra başlar. Solunum yollarında kolonizasyon dinamik bir süreçtir ve NTHi suşları sıklıkla solunum yollarından alınır ve temizlenir. Yaşamın ilk yılında *H. influenzae* ile nazofarengeal kolonizasyon, tekrarlayan otitis media riskinde artış ile ilişkilidir (17).

H. influenzae yalnızca insandan insana bulaşmaktadır; bilinen başka bir doğal konağı bulunmamaktadır. Bulaş üst solunum yolundan ve nadiren genital sistem yolundan olmaktadır. Bir kişiden diğerine bulaş, havadaki damlacıklar veya salgılarıyla doğrudan temas yoluyla gerçekleşir (17). Yenidoğanlarda doğum sırasında amniyotik sıvı veya genital sistem salgılarıyla temas sonucu enfeksiyon gelişebilir. Enfeksiyon, görülme sıklığı açısından bimodal dağılım göstermekte, en sık Eylül-Aralık ve Mart-Mayıs aylarında görülmektedir (18).

H. influenzae tip b'ye yönelik aşılardan çocukluk çağı aşılama programlarına yaygın bir şekilde girmesinden önce Hib, dünya çapında ciddi invazif *H. influenzae* enfeksiyonunun en yaygın nedeniydi. Hib aşısı uygulanmadan önce Hib menenjitinin tahmini insidansı, Avrupa ve Amerika'da beş yaş altı çocuklarda sırasıyla 23/100.000 ve 54/100.000 iken (19) Hib aşısı kullanımıyla birlikte, Avrupa'da tüm yaş grupları için genel Hib insidansı artık 0,1/100.000'den daha az olarak rapor edilmektedir (20). Hib aşısı tüm yaş gruplarında invazif Hib hastalığı insidansını belirgin bir şekilde azaltırken, bu azalma küçük çocuklarda en fazla olmuştur. Hib enfeksiyonlarının çoğu artık altta yatan komorbiditeleri olan yaşlı erişkinlerde görülmektedir (21). Hib aşısı farengeal Hib taşıyıcılık oranlarında da belirgin bir azalma sağlamıştır (22).

Hib aşısının yaygın kullanımıyla invazif enfeksiyona neden olan serotiplerin dağılımı da değişmiştir. Günümüzde kapsülsüz *H. influenzae* kökenleri tüm yaş

gruplarında, özellikle yenidoğanlar, yaşlılar ve altta yatan komorbiditeleri olan kişiler gibi enfeksiyona daha duyarlı gruplar arasında invazif *H. influenzae* hastalığının önde gelen nedeni olmuştur (22). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezinin (Centers for Disease Control and Prevention-CDC) güncel verilerinde, ABD’de Hib aşısı kullanımıyla birlikte beş yaş altı çocuklarda invazif *H. influenzae* hastalığı insidansı %99 oranında azalırken, NTHi ve *H. influenzae* tip a ve f oranlarının arttığı belirtilmektedir (23). Benzer şekilde, başka çalışmalar NTHi suşlarının vakaların %54,6-82’si arasında değişen bir oranla en sık invazif hastalık nedeni olduğunu, buna karşın serotip sıklığının coğrafi bölgeye göre değiştiğini bildirmiştir (24). Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (European Centre for Disease Prevention and Control-ECDC) verileri, invazif enfeksiyonların %7’sine neden olan serotip b’nin aşılamanın başlamasından bu yana belirgin bir azalma gösterdiğini, invazif enfeksiyonların %9’una neden olan serotip f prevalansının ise arttığını belirtmektedir (20). Buna karşılık başka çalışmalarda, aşılama öncesi dönemde nadir görülen serotip a’nın günümüzde Kanada, ABD, Brezilya ve Avustralya’da ciddi bir mortalite ve morbidite nedeni olarak ortaya çıktığı ve Kanada’daki invazif enfeksiyonların %23,1’ine neden olduğu gösterilmiştir (24).

2.2.2. Patogenez ve Bağışıklık

Haemophilus türleri, özellikle *H. parainfluenzae* ve NTHi, yaşamın ilk birkaç ayında hemen hemen tüm insanlarda üst solunum yollarında kolonize olur. İmmünoglobulin (Ig) A proteazları, hem kapsüllü hem de kapsülsüz suşlar tarafından üretilir ve humoral bağışıklığa engel olarak bakterinin mukozal yüzeylerde kolonizasyonunu kolaylaştırır (16). Bakteri lokal olarak yayılabilir ve kulak (otitis media), sinüs (sinüzit) ve alt solunum yollarında (bronşit, pnömoni) hastalığa neden olabilir. NTHi izolatlarına bağlı dissemine hastalık ise nadiren görülür. Buna karşılık, kapsüllü *H. influenzae* (özellikle serotip b [biyotip I]) suşları üst solunum yollarında nadiren bulunur, ancak aşılanmamış çocuklarda yaygın bir hastalık nedenidir (menenjit, epiglottit, selülit) (16). *H. influenzae*, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından öncelikli patojenler olarak kabul edilen on iki bakteriyel patojenden biridir (25).

Tüm gram-negatif bakteriler gibi, *H. influenzae* da bir lipopolisakkarite sahiptir, ancak bu yapıda daha kısa bir polisakkarit zinciri yer alır ve lipooligosakkarit olarak

adlandırılır. Lipooligosakkarit, gram-negatif bakterilerin endotoksinlerine özgü özelliklere sahip olmasının dışında, insanda bulunan moleküler yapıları taklit ederek opsonizasyon ve fagositozdan kaçmaya yardımcı olur. Bunun nedeni, insan vücudunun sfingolipitlerindeki siyalatlı oligosakkaritlere yapısal ve antijenik olarak benzer olan lipooligosakkaridin siyale uçlarıdır (26). *H. influenzae* ekzotoksin üretmez (15).

Bakterilerin hücre duvarı bileşenleri (lipopolisakkaritin lipid A komponenti ve düşük moleküler ağırlıklı glikopeptitler), siliyer fonksiyonu bozarak solunum epitelinin hasar görmesine yol açar. Bakteri daha sonra hem epitelyal hem de endotelyal hücreler arasında yer değiştirebilir ve kana geçebilir. Polisakkarit kapsüle yönelik özgül opsonik antikörlerin yokluğunda, meninkslere veya diğer uzak odaklara yayılan yüksek dereceli bakteriyemi gelişebilir (16).

Pili ve pili olmayan adezinler, orofarenksin *H. influenzae* ile kolonizasyonuna aracılık eder. NTHi'de adezyon, adezyon proteinlerinin iki ana grubu olan yüksek moleküler ağırlıklı proteinler (HMW1/HMW2) ve Hia adezinler tarafından sağlanır. Yüksek moleküler ağırlıklı proteinler, NTHi'lerin %75-80'inde bulunur ve potansiyel aşı adayları olarak çalışılmıştır. Bunları kodlayan genler, dış zar proteinlerinin (outer membrane protein-OMP) ekspresyonundan sorumlu genlerle birlikte kromozomda kümeler halinde düzenlenmiştir. Yüksek moleküler ağırlıklı proteinlerin ekspresyon seviyesi, çocuklarda otitis media ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) olan hastalarda bronşit gelişimi ile ilişkilidir. Hia adezini, NTHi'lerin yaklaşık %20'sinde bulunur. Kapsüllü *H. influenzae* serotiplerindeki analogu, Hsf adezinidir. Hap adezini ise IgA proteaz ile homolog olup IgA proteaz ile dizi benzerliğine rağmen, insan IgA1'ini parçalayamaz. Hap, *H. influenzae* ve epitel hücreleri arasındaki etkileşimde rol alırken aynı zamanda bakteriyel agregasyonu ve epitel hücrelerinin yüzeyinde mikrokolonilerin oluşumunu da teşvik eder (16, 26, 27).

P2 proteini, *H. influenzae*'da en bol bulunan ana dış zar proteindir. Bu protein, virülansda belirgin bir rol oynamayan ancak güçlü bir şekilde immünojenik olan bir porindir. Proteinin dış kısmı oldukça değişkendir ve suşlar arasında farklılık gösterir. *H. influenzae* dış zar proteinleri de olası aşı adayları olarak değerlendirilmiştir (26, 28)

H. influenzae tip b'nin majör virülans faktörü, antifagositik polisakkarit kapsüldür. Kapsüle karşı oluşan antikörler, bakteriyel fagositozu ve kompleman aracılı bakterisidal

aktiviteyi uyarır. Bu antikorlar, doğal enfeksiyon, saflaştırılmış PRP ile aşılama veya maternal antikorların pasif transferi yoluyla gelişir. Menenjit ve epiglottit riski, anti-PRP antikorlu olmayan, kompleman eksikliği ve splenektomi öyküsü olan hastalarda anlamlı olarak daha fazladır. Kolostrum yoluyla edinilen maternal antikorların varlığı nedeniyle yenidoğanların enfeksiyon riski düşüktür. Yaklaşık 2 aylıkken, PRP kapsülüne karşı maternal antikorlar azalmaya başladığında, infantlar invazif *H. influenzae* hastalığı geliştirme açısından yüksek risk altında olurlar. Doğal enfeksiyondan sonra bile infantların anti-PRP bağışıklık tepkisi azalır. Bu nedenle, infantlar tekrarlayan enfeksiyonlar için risk altındadır. Çocukların büyük çoğunluğunda 5 yaşına kadar doğal olarak antikor edinilmiş olur (12).

Aşılanmamış popülasyonlarda Hib enfeksiyonlarının en yüksek insidansı, serum antikorunun en düşük olduğu 6 ila 18 aylıkken ortaya çıkar. Enfeksiyon ve serum antikor arasındaki bu ters ilişki, *Neisseria meningitidis* ile benzerdir. En büyük fark, bağışıklığın *N. meningitidis* ve *Streptococcus pneumoniae* gibi diğer kapsüllü bakterilerin çoklu immünotiplerinden ziyade tek bir tipe (Hib) yönelik antikor tarafından sağlanmasıdır. Bu nedenle erişkinlerde sistemik *H. influenzae* enfeksiyonları nadirdir. Diğer polisakkaritler gibi, Hib PRP de T hüresinden bağımsız bir antijen gibi davranır ve 18 aylıktan küçük çocuklarda bağışıklamaya karşı antikor yanıtları zayıftır. PRP'nin protein ile konjugasyonu, PRP'nin özgüllüğünü korurken tipik T-hüresine bağımlı yanıtları ortaya çıkararak immünojeniteyi önemli ölçüde artırır (15).

2.2.3. Risk Faktörleri

Hib hastalığı için risk faktörleri hem etkenle karşılaşmaya sebep olan faktörleri hem de konak faktörlerini içerir. Etkenle karşılaşmaya sebep olan faktörler arasında hane halkı kalabalığı, çocuk bakımına katılım, düşük sosyoekonomik durum, düşük ebeveyn eğitim düzeyi ve okul çağındaki kardeşler yer almaktadır. Konak faktörleri arasında yaş (yüksek risk taşıyan 5 yaş altı çocuklar ve 65 yaş ve üzeri yetişkinler), ırk/etnik köken (Amerikan Kızılderilileri ve Alaska Yerlileri) ve kronik hastalıklar (örn. fonksiyonel ve anatomik aspleni, orak hücreli anemi, HIV enfeksiyonu, immüoglobulin eksikliği, kompleman eksikliği, kemoterapi öyküsü ve kök hücre nakli) yer almaktadır (18, 23).

2.2.4. Klinik Hastalıklar

Hib kökenleri sıklıkla invazif enfeksiyonlara, NTHi kökenleri ise sıklıkla lokal enfeksiyonlara neden olmaktadır (17).

Haemophilus influenzae tip b Enfeksiyonları

Menenjit

Menenjit, *H. influenzae* kaynaklı sistemik enfeksiyonlar arasında en ciddi olan tablodur (17). Menenjitten önce sıklıkla farenjit, sinüzit veya orta kulak iltihabı gibi üst solunum yolu enfeksiyonunun belirti ve semptomları görülür. (15). *H. influenzae* menenjitinin klinik özellikleri diğer pürülan menenjit formları ile benzerdir. Enfeksiyon daha sıklıkla aşılanmamış kişilerde görülmektedir. Erişkin vakalar nadirdir ve sıklıkla geçirilmiş kafa travması, beyin cerrahisi, paranazal sinüzit, otit veya beyin omurilik sıvısı sızıntısı öyküsü vardır. *H. influenzae* menenjiti yenidoğanlarda da nadirdir, ancak bu tür vakalar erken başlangıçlı grup B streptokok enfeksiyonuna benzeyebilir. En yaygın belirtiler ateş ve merkezi sinir sistemi fonksiyonlarında değişikliktir, ancak küçük çocuklarda spesifik belirti nadir olabilir ve ense sertliği sıklıkla yoktur. Nöbet veya koma gibi daha belirgin belirtiler genellikle hastalık ilerledikçe gelişir. Subdural efüzyon yaygın bir komplikasyondur. *H. influenzae* menenjitinden kaynaklanan genel ölüm oranı uygun tedavi ile %5'ten daha azdır, ancak hayatta kalanların çoğunda kalıcı sekeller ortaya çıkmaktadır (17).

Epiglottit

Epiglottit, supraglottik dokuların selülitisiyle karakterize, fulminan başlangıçlı olan, obstrüktif larengeal ödemle sonuçlanan, potansiyel olarak öldürücü bir hastalıktır. Genellikle 2-7 yaş arasındaki çocuklarda görülmektedir. Başlangıç belirtileri boğaz ağrısı, ateş ve dispnedir; hızla disfajiye, oral sekresyonların birikmesine ve ağızdan tükürüğün akmasına kadar ilerler (17). Çocuklarda bu ani başlangıç, epiglotitin viral etkenlerin oluşturduğu krup hastalığı ve boğmacadan klinik olarak ayırt edilmesine yardımcı olur (13). Hasta huzursuzdur, kaygılıdır ve hava yolu tıkanıklığını azaltmak için boynu ekstansiyonda ve çenesi öne doğru çıkacak şekilde oturma pozisyonundadır. Ani bozulma genellikle birkaç saat içinde meydana gelir ve yeterli tedavi olmadığında ölümle sonuçlanır (17).

Pnömoni ve Ampiyem

Çocuklarda Hib'in neden olduğu primer akciğer enfeksiyonlarının gerçek sıklığını kesin olarak belirlemek zordur. Tipik olarak 4 ay ile 4 yaş arasındaki çocuklarda görülür ve hastaneye yatış gerektirecek kadar şiddetli olan konsolidasyonla karakterize pnömoni (çoğunlukla plevral tutulumla birlikte) ile ortaya çıkar. *H. influenzae* pnömonisini *S. aureus* veya *S. pneumoniae*'nin neden olduğu bakteriyel pnömonilerden ayıran tek klinik özellik, daha sinsi bir başlangıçtır. Şiddetli dispne, taşikardi ve kardiyovasküler yetmezlik bulgularının gelişmesi, nadir fakat önemli bir komplikasyon olan perikarditi düşündürür (17).

Selülit

Selülit çoğunlukla küçük çocuklarda görülür. Klinik özellikler ateş ve sıklıkla bir yanakta veya periorbital bölgede yer alan, karakteristik kırmızimsı mavi renkte, kabarıklık, sıcak ve hassas bir lezyondur. Yumuşak doku tutulumu birkaç saat içinde hızla ilerler. Bu çocukların bir kısmında başka septik odakların (örneğin menenjit) belirtileri vardır veya gelişir, çünkü eşlik eden bakteriyemi son derece yaygındır (17).

Bakteriyemi

Bakteriyemi, akut Hib menenjitinin sık görülen, erken bir bulgusudur; ancak çocuklarda, özellikle 6 ila 36 aylık olanlarda, lokal hastalık belirtisi olmaksızın bakteriyemi görülebilir. Tipik olarak ateş, anoreksi ve letarji görülür. Orak hücreli anemisi olan veya daha önce splenektomi geçirmiş olan çocuklar özellikle duyarlıdır. Erken tanı ve tedavi kritik öneme sahiptir çünkü bu hastalar hızla kötüleşebilir ve septik şok veya lokalize pürülan odağa sahip olabilir (13, 17).

Septik artrit

H. influenzae 2 yaş altı çocuklarda septik artrite neden olur. Tipik olarak tek, büyük, ağırlık taşıyan bir eklem (osteomyelit olmaksızın) tutulumu vardır; mobilitede azalma, hareket sırasında ağrı ve şişlik görülür. Sistemik antibiyotiklere yanıt dramatik ve sıklıkla tedavi edicidir, ancak uzun süreli takip önemlidir çünkü çocukların önemli bir yüzdesinde kalıcı eklem disfonksiyonu meydana gelir. *H. influenzae* septik artriti yetişkinlerde de görülür (17).

NTHi Enfeksiyonları

Otitis Media

NTHi, tüm akut orta kulak iltihabı vakalarının %25 ila %35'ini oluşturur. Bu enfeksiyon her yaşta ortaya çıksa da en sık 6 ay ile 5 yaş arasındaki çocuklarda görülür. Bebeklerde akut orta kulak iltihabının tipik klinik görünümü ateş ve irritabilitedir, daha büyük çocuklarda kulak ağrısı olabilir. Daha önce geçirilmiş bir viral solunum yolu enfeksiyonu genellikle orta kulak iltihabının öncülüdür. Tanı pnömatik otoskopi ile konur. Kesin etiyolojik tanı, rutin olarak uygulanmayan timpanosentezi gerektirir. Enfeksiyon etkenini klinik özelliklere dayanarak belirlemek mümkün olmasa da *Streptococcus pneumoniae* ile karşılaştırıldığında NTHi'nin neden olduğu otitis media enfeksiyonunda ateş olma olasılığı daha düşüktür ve otere daha az sıklıkla görülür. Bununla birlikte, NTHi'nin neden olduğu enfeksiyonda tekrarlayan atak öyküsü, tedavi başarısızlığı, eşlik eden konjonktivit, amoksisilin tedavisi öyküsü, bilateral otitis media ve antibiyotik tedavisinin tamamlanmasından sonraki 2 hafta içinde otitis media görülmesi daha olasıdır (17). Komplikasyonlar; tekrarlayan otitis media, drenaj tüplerinin yerleştirilmesini gerektiren orta kulak efüzyonlarının varlığı, işitme kaybı, mastoidit, menenjit, kronik otitis media, beyin apsisi ve sepsisi içerir (13).

Bronşit ve KOAH Alevlenmesi

Kronik bronşit, pulmoner parenkimin önemli bir tutulumu olmaksızın bronşiyal inflamasyonu kapsayan, yeterince belirlenmemiş klinik bir tablodur. Stabil kronik bronşiti olan hastalarda, alt havayolları sıklıkla NTHi suşlarıyla kolonize olur; akut alevlenmeler sırasında suşların yoğunluğu artmaktadır (13). KOAH'ın seyri hastalığın aralıklı alevlenmeleri ile karakterizedir. Alevlenmelerin yaklaşık yarısının bakterilerden kaynaklandığı ve NTHi'nin en sık görülen bakteriyel neden olduğu tahmin edilmektedir. Alevlenmenin üç ana belirtisi balgam üretiminde artış, balgam pürülansı ve dispnedir. Ateş genellikle yoktur ve akciğer grafisinde infiltrasyon yoktur (17).

Toplum Kökenli Pnömoni

NTHi, altta yatan solunum hastalıkları (örn. kronik bronşit, KOAH) veya altta yatan diğer hastalıkları (örn. immün yetmezlik, diyabet, alkolizm, neoplazmalar) bulunan yaşlı hastalarda pnömonin önemli bir nedenidir. Sistemik hastalığı olan

hastalarda, *H. influenzae* pnömonisi, lobar, segmental ve pürülan olup, bulguları pnömokoksik pnömoniye benzer (13).

Sinüzit

Sinüs aspiratlarından alınan kültürlerin kullanıldığı çalışmalar, NTHi'nin akut maksiller sinüzitin yaygın bir nedeni olduğunu göstermektedir. Hastalarda burun tıkanıklığı, pürülan burun akıntısı, baş ağrısı ve yüz ağrısı görülür. Otitis media enfeksiyonunda olduğu gibi, etiyolojik bir tanı koymak için invazif bir işlem olan sinüs aspirasyonu gereklidir (17).

Neonatal, Maternal ve Ürogenital Enfeksiyonlar

NTHi'nin neden olduğu neonatal sepsiste mortalite genel olarak %50 iken prematüre bebeklerde %90'a kadar çıkabilir. Yenidoğan sepsisine neden olan birçok suş, biyotip IV'tür. Aynı biyotip IV suşları aynı zamanda endometrit ile ilişkili postpartum sepsise de neden olur. NTHi üretrit, vulvovajinit, tubo-ovaryan apse ve kronik salpenjitin de bir nedenidir (13, 17).

Bakteriyemi ve İnvaziv Enfeksiyonlar

Hib aşılarının kullanıldığı ülkelerde invazif *H. influenzae* enfeksiyonlarının çoğu, tiplendirilemeyen suşlardan kaynaklanmaktadır. Bakteriyemisi olan kişilerin çoğunda alkolizm, kardiyopulmoner hastalık, HIV enfeksiyonu veya kanser gibi altta yatan durumlar vardır. Hib'in yaygın olarak neden olduğu invazif hastalıklara, zaman zaman tiplendirilemeyen suşların yanı sıra a, c, d, e ve f tipleri de neden olur. Bu enfeksiyonlar arasında erişkin epiglottiti, ampiyem, septik artrit, selülit, osteomyelit, perikardit, kolesistit, karın içi enfeksiyon ve vasküler greft enfeksiyonu bulunur (17).

Konjonktivit

NTHi, çocuklarda konjonktivitin en yaygın bakteriyel nedenidir. Diğer *Haemophilus* enfeksiyonlarının sporadik doğasının aksine, konjonktivit, özellikle kreşlerde salgınlar halinde ortaya çıkabilir. Klinik özellikler konjonktival hiperemi ve pürülan akıntıyı içerir. NTHi, zaman zaman bol ve pürülan akıntı, kapak ödemi, kemozis ve keratit ile karakterize ciddi konjonktivite neden olur (17).

2.3. Laboratuvar Tanısı

2.3.1. Klinik Örneklerin Toplanması, Taşınması ve Saklanması

Klinik örneklerden *Haemophilus* türlerinin optimum şekilde izole edilmesi, örneklerin uygun bir şekilde toplanması, taşınması, uygun besiyeri ve inkübasyon ortamının kullanılmasına bağlıdır. Hassas yapıları nedeniyle bu bakterileri içeren örnekler, kurumaya ve aşırı sıcaklık değişimlerine maruz bırakılmamalıdır (13).

Menenjit şüphesi olan hastalardan kan ve beyin omurilik sıvısı (BOS) kültürleri alınmalıdır. Timpanosentez yoluyla elde edilen orta kulak sıvısı, otitis media olan hastalar için tercih edilen örnektir; ancak otoresi ve timpanik membran perforasyonu olan hastalarda, orta kulak sıvısının dış kulak yolundan aseptik olarak aspirasyonu da yapılabilir. Maksiller sinüzit vakalarında, endoskopik yöntemle doğrudan sinüs aspiratları veya meatus nasi mediustan sürüntü örnekleri alınmalıdır. *Haemophilus* konjonktiviti olduğu düşünülen hastaların değerlendirilmesinde konjonktival sürüntü örnekleri gerekir (12).

Haemophilus spp.'ye bağlı bronkopulmoner enfeksiyon şüphesi olan hastalarda, alt solunum yoluna ait örnekler, orofarengeal kommensal mikrobiyota ile kontaminasyonu önleyecek şekilde alınmalıdır. Bu amaçla bronkoalveoler lavaj veya bronşiyal yıkama örnekleri tercih edilmelidir. Balgam ve trakeal aspirat örneklerinin alınması daha az invazif olsa da bu yolla patojenler ile oral mikrobiyota arasında ayırım yapmak zor olabilir. Bakteriyel pnömoniden şüphelenildiğinde kan kültürleri de alınmalıdır. Kistik fibrozis vakaları dışında, nazofarengeal ve nazal sürüntü örnekleri, hastaların değerlendirilmesinde tercih edilmemelidir. Kistik fibrozis vakalarında posterior farenkse konulan bir eküvyon üzerinde toplanan indüklenmiş derin öksürük örneği faydalı olabilir (12). Epiglottit şüphesi olan hastalarda posterior farenksten örnekler alınmamalıdır çünkü bu yöntem öksürüğü uyarabilir ve hava yolunu tıkayabilir (16). Epiglottit tanısında kan kültürü tercih edilmelidir (29). Plevral boşluk, sinovyum, perikard veya periton gibi steril bölgelerde *Haemophilus* enfeksiyonu şüphesi olan hastalarda, tutulum bölgesinden aseptik olarak aspire edilen sıvı örneği tercih edilmelidir. Eş zamanlı kan kültürleri de alınmalıdır (12).

Örnekler mümkünse antibiyotik tedavisi başlanmadan önce alınmalıdır. Bakteriyel menenjit veya invazif enfeksiyon tanısı için alınan BOS, kan veya diğer klinik örnekler laboratuvarında işleme alınmaya kadar geçen süre boyunca oda sıcaklığında veya 35 °C'de taşınmalı ve saklanmalıdır; kesinlikle buzdolabına konmamalıdır. Kan kültürü aseptik koşullarda alınmalıdır. Hib şüphesi varsa kan mümkünse IsoVitaleX (BBL, Becton Dickinson, ABD) veya Vitox (Oxoid, İngiltere) eklenmiş kan kültürü şişesine aktarılır. BOS için alınan örnek miktarı sonraki işlemleri belirler. Laboratuvara hemen ulaşamayacaksa tüplerden birindeki BOS örneği (~1 ml) tercihen bifazik Trans-Isolate (T-I) besiyeri içeren şişeye; yoksa bir pediatrik kan kültür şişesine inoküle edilip gönderilmelidir. Steril vücut bölgesinden alınan sıvı örnekler de BOS gibi işlem görmeli, örnek steril bir tüpe aktarılarak hemen laboratuvara gönderilmelidir (14).

2.3.2. Klinik Örneklerin Direkt İncelenmesi

Mikroskopi

Gram boyamada *Haemophilus* spp. küçük, pleomorfik, gram negatif kokobasil, basil veya filamentöz formda görünür. *Haemophilus* spp.'nin pleomorfizmi nedeniyle, Gram boyama yaymalarının *Neisseria meningitidis* gibi diğer gram negatif bakterilerle karışmasını önlemek için dikkatli bir şekilde yorumlanması gerekir (12).

H. influenzae menenjitinin hızlı ön tanısı, Gram boyası kullanılarak BOS'un direkt incelemesiyle yapılabilir. Eğer yeterli BOS (1-2 ml'den fazla) varsa, inceleme ve kültür için 1000 x g'de 15-20 dk santrifüj edilerek ya da sitosantrifüjde 10.000 x g'de 10 dakika santrifüj edilerek elde edilen çökelti kullanılır. BOS örneklerinin sitosantrifügasyonu, az sayıda bulunan organizmaların saptanma şansını artırır (12-14). Diğer steril vücut sıvılarından da benzer şekilde yaymalar hazırlanmalıdır. Orta kulak sıvısı ve sinüs aspirat örneklerinin yayması sitosantrifüj yapılmadan 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 (12). Özellikle menenjit şüphesinde BOS sedimentinden Gram boyamayla birlikte mutlaka metilen mavisi boyama da yapılmalıdır. Gram boyama ile pembe-kırmızı boyanan ve genellikle pembe zeminde ayırt edilmesi güç olabilen *H. influenzae* gibi gram negatif organizmalar, metilen mavisi kullanılması halinde açık gri zeminde

koyu mavi boyanmış hücreler şeklinde görüleceklerinden kolayca ayırt edilebilirler (14).

Antijen Saptama

Hib enfeksiyonlarının hızlı tanısı için BOS, serum ve idrarda tip b PRP kapsüller antijeninin saptanmasına yönelik çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Ticari olarak mevcut yöntemler lateks aglütinasyonu ve stafilokok protein A koagülünasyonu testleridir. Bu kitleler, vücut sıvılarında *H. influenzae* tip b PRP antijeninin yanı sıra *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* ve grup B streptokok antijenlerinin tespiti için de reaktifler içerir (13). Bu yöntemler patojenin hızlı bir şekilde tanımlanmasını sağlarken, Gram boyama ile karşılaştırıldığında duyarlılık ve özgüllükleri düşüktür. Bu nedenle antijen saptama yöntemlerinin kullanımı sınırlı bir klinik değere sahiptir ve genellikle önerilmez. Bununla birlikte, hastalığın prevalansının yüksek olduğu ve rutin kültürün güvenilir olmadığı, kaynakların kısıtlı olduğu durumlarda bu yöntemler faydalı olabilir (12).

Moleküler Teknikler

Nükleik asit amplifikasyon testleri, özellikle de polimeraz zincir reaksiyonuna (PZR) dayalı testler, *H. influenzae*'yi BOS, plazma, serum ve tam kan dahil olmak üzere çeşitli klinik örneklerden doğrudan tespit etmek için kullanılabilir. Bu yöntemler, menenjit gibi spesifik enfeksiyon hastalıklarının diğer yaygın bakteriyel nedenlerini de saptamak için genişletilebilir. Çalışmalar bu yöntemlerin değişken duyarlılıklarını bildirirken, özgüllükleri genellikle yüksektir. Klinik örneklerde patojen sayısının az olması duyarlılığı düşürür. Bir diğer kısıtlayıcı faktör ise antimikrobiyal tedavinin etkisiyle ilgilidir. Antimikrobialların ilk uygun dozunun uygulanmasını takiben kültür sıklıkla negatif hale gelse de patojenin temizlenmesini takiben en az iki hafta boyunca hastaların kan ve BOS örneklerinde bakteriyel DNA bulunabilir ve bu durum yanlış pozitifliklere yol açabilir. Öte yandan özellikle solunum yolundan alınan örneklerde, *Haemophilus* spp.'nin kommensal suşlarının sıklıkla bulunması sonuçların yorumlanmasını zorlaştırır (12). Toplum kaynaklı pnömoni etkenlerinin saptanmasına yönelik geliştirilen sendromik paneller de patojen/kolonizasyon ayırımını yapmakta yetersiz kalmaktadır (30, 31).

2.3.3. İzolasyon Yöntemleri

H. influenzae'nin kültürde üreyebilmesi için, zor üreyen bakterilerin üremesini destekleyen zenginleştirilmiş bir besiyeri kullanılması gerekir. Besiyeri en az 10 µg/ml serbest X ve V faktörleri içermelidir. Hem X hem de V faktörünün yüksek konsantrasyonları tam kanda bulunur ve çoğu eritrositler içinde tutulur. Bu sebeple besiyerinde kullanılan kan, eritrositlerin parçalanıp serbest X ve V faktörünü ortama salabilmesi için ısıtılmalıdır. Bu işlem otoklavlama sonrası 80 °C 'ye soğuyan besiyerine kan eklenerek gerçekleştirilebilir ve çikolatalaştırma olarak bilinir (12).

Koyun kanında doğal olarak bulunan ve V faktörünü inaktive eden enzimlerin varlığı nedeniyle, *H. influenzae*'nin izolasyonunda konvansiyonel koyun kanlı agar uygun değildir. Tavşan veya at kanı bu enzimleri içermez ve bu kan ürünlerinden birini içeren agar ortamı üremeyi destekler. Çikolatalaştırma sırasında ayrıca V faktörünü inaktive eden enzimler de etkisiz hale getirilerek besiyerindeki V faktörü miktarı optimize edilir. *H. influenzae*'nin klinik örneklerden primer izolasyonu; çikolata agar, *Haemophilus* izolasyon agarı, Levinthal besiyeri ve stafilokok çizgi tekniği (süt anne fenomeni) kullanılarak sağlanır (12, 13).

Ticari olarak çikolata agar, hemin ve kimyasal olarak tanımlı üreme faktörleri karışımının GC (gonokokal) agar baz ortamına eklenmesiyle hazırlanır. GC agar bazı; proteaz pepton, mısır nişastası, fosfat tamponları, sodyum klorür ve agar içermektedir. Kimyasal olarak tanımlı katkıları ise; NAD, vitaminler (B₁₂), mineraller, nazlı bakterilerin üremesi için gerekli amino asitler (sistein, glutamin) ve glukozdan oluşur. Bu katkıları, IsoVitalax (BD Biosciences, ABD) ve GCHI Enrichment (Remel Laboratories, ABD) ticari isimleri ile piyasadan temin edilebilir. *Haemophilus* türlerinin primer izolasyonu için çikolata agar kullanmanın dezavantajı, hemolitik özellik gösteren *H. haemolyticus*, *H. parahaemolyticus* ve *H. pittmanniae* gibi türlerin hemolitik özelliklerinin saptanamamasıdır (13).

Ticari olarak mevcut *Haemophilus* izolasyon agarı, sığır kalbi infüzyonu, peptonlar, maya özütü ve hem X hem de V faktörlerini içeren, defibrine at kanından (%5) oluşmaktadır. Diğer normal solunum yolu mikrobiyotasını (stafilokoklar, mikrokoklar, streptokoklar, *Neisseria* türleri, vb.) inhibe etmek üzere, besiyerine basitrasin (300 µg/ml) eklenir. Bu besiyeri *Haemophilus* türlerinin seçici olarak

izolasyonunun yanı sıra, ilk izolasyonda hemolitik özelliklerinin de doğrudan saptanmasını sağlar (13).

Haemophilus spp. için kullanılabilir diğer bir besiyeri Levinthal besiyeridir. Şeffaf olması nedeniyle sıklıkla kapsülle ilişkili bir özellik olan kolonide parlak renk yansımalarının saptanmasını sağlamaktadır (12).

Birçok bakteri ve maya, besiyerlerinde üreme sırasında NAD sentezler ve salgırlar. V faktör gereksinimi olan *Haemophilus* türleri, bu kolonilerin etrafında iğne ucu büyüklüğünde koloniler oluşturarak üreyebilir. Bu fenomene satellitizm (sütanne fenomeni) adı verilir. Muhtemel bir *Haemophilus* kolonisinden, koyun kanlı agar plağının yüzeyini tamamen kaplayacak şekilde pasaj yapılır. Takiben, inokulum üzerine çizgi şeklinde NAD üreten bir organizma (örn. *S. aureus*) ekilir. CO₂'den zengin, 35-37 °C'lik ortamda bir gecelik inkübasyondan sonra, çok küçük, nemli gri *Haemophilus* kolonileri, stafilokok üremesine bitişik olarak hemolitik alanda gözlemlenebilir (13).

İnokülasyon sonrası katı besiyeri, nemli bir atmosferde ve %5-7 CO₂ varlığında 35-37 °C'de inkübe edilmelidir. Bu koşullar altında çoğu *Haemophilus* spp. 24-48 saat içinde ürer. Çikolata agarda *H. influenzae* kolonileri düzgün kenarlı, düz veya dışbükey şekilli, grimsi ve yarı saydamdır. Kapsüllü suşlar sıklıkla mukoid bir görünüme sahipken, kapsülsüz suşlar daha küçük, devetüyü rengi koloniler üretir. *H. influenzae* suşlarının çoğu, güçlü bir amin benzeri koku yayan indol üretir. Kolonilerin çapı 1-2 mm'dir (12).

2.3.4. Tanımlama

Haemophilus spp.'nin tanımlanması; üreme için X ve V faktörü gereksinimlerinin belirlenmesi, porfirin testi sonuçları, hemolizin değerlendirilmesi, karbonhidrat fermentasyon paternlerinin belirlenmesi ve indol, ornitin dekarboksilaz, üreaz, katalaz ve β-galaktozidaz üretiminin değerlendirilmesine dayanmaktadır. X ve V üreme faktörü gereksinimlerinin belirlenmesi ve porfirin testi, *Haemophilus* spp.'nin olası tür tanımlaması için yeterli bilgi sağlar. Ancak kesin tür tanımlaması diğer fenotipik özelliklerin de değerlendirilmesini gerektirir. Alternatif olarak, 16s rRNA gen dizilimi veya Matris Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyon Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass

Spectrometry-MALDI-TOF MS) de bu organizmaların kesin tanımlanmasını sağlar (12).

Faktör gereksinimlerinin belirlenmesinde X faktörü, V faktörü veya hem X hem de V faktörleri emdirilmiş filtre kağıdı diskleri veya şeritleri kullanılır. Saptanacak olan organizmanın 0,5 McFarland standardındaki süspansiyonu, triptik soy agar gibi üreme faktörlerini içermeyen bir besiyerine yüzeyi tamamen kaplayacak şekilde ekilir. X ve V faktör diskleri veya şeritleri agar yüzeyine 1-2 cm aralıklarla yerleştirilir. Plaklar % 5-7 CO₂'li ortamda 35 °C'de 18-24 saat inkübe edilir ve disk/şeritlerin etrafındaki üreme paternleri gözlemlenir. Testlerin yorumlanması genellikle kolay olmakla birlikte, X faktörü tespitindeki tutarsız sonuçlar nedeniyle *H. influenzae*'nin *H. parainfluenzae* olarak yanlış şekilde tanımlanabildiği bildirilmiştir. Bu yanlışlıkların nedenleri; test için kullanılan bazal ortamda eser miktarda hemin bulunması, kan içeren ortamdaki üremelerden alınan inokulumlar ile X faktörünün taşınması ve bazı *H. parainfluenzae* suşlarının zor üreme özelliği nedeniyle testlerin okunmasındaki güçluktur (13).

δ-aminolevulinik asit (ALA)-porfirin testi *Haemophilus* suşlarının ALA'dan hemin sentezindeki yolda protoporfirin ara ürünlerini sentezleme yeteneklerini değerlendirir. Üreme için ekzojen X faktörüne gereksinim duyan suşlar, ALA'dan protoporfirinleri sentezleyemez ve bu test ile negatif sonuç verirler. Bu testi yapmak için ALA emdirilmiş diskler veya ALA ayıraçları içeren besiyerleri kullanılabilir (13).

MALDI-TOF MS'yi değerlendiren çalışmalar, *Haemophilus* türleri de dahil olmak üzere HACEK grubu (*Haemophilus* spp., *Aggregatibacter* spp., *Cardiobacterium* spp., *Eikenella corrodens* ve *Kingella* spp.) mikroorganizmalar için MALDI-TOF MS'nin performansının mükemmel olduğunu belirtmektedir (32, 33). Couturier ve ark. (32), *H. parainfluenzae* ve *H. influenzae* izolatlarının sırasıyla, >%90 ve >%98'inin MALDI-TOF kullanılarak tür düzeyinde tanımlanabileceğini göstermiştir. Benzer şekilde Van Veen ve ark. (33) HACEK organizmalarının tür düzeyinde >%98 oranında tanımlandığını göstermiştir. Branda ve ark. (34) VITEK MS in vitro diagnostik veri tabanını (bioMérieux, Fransa) değerlendirmiş ve *H. influenzae* ve *H. parainfluenzae* için tür düzeyinde sırasıyla, %96 ve %92 oranında doğru tanımlandığını belirlemişlerdir.

2.3.5. *Haemophilus* Türlerinin Biyotiplendirilmesi

Biyotiplerin belirlenmesinde indol üretimi, üreaz ve ornitin dekarboksilaz olmak üzere üç test kullanılır. *H. influenzae* suşları, serotipten bağımsız sekiz biyotipe ayrılabilir. Ayrıca *H. parainfluenzae*'nin sekiz biyotipi de bu yöntemlerle tanımlanabilir (13).

Haemophilus türlerinin biyotiplendirilmesi, belirli biyotiplerin farklı enfeksiyonlar, kaynaklar, antijenik özellikler ve antimikrobiyal direnç paternleriyle ilişkili olduğunu göstermiştir. *H. influenzae* biyotip I suşları, çoğunlukla bir yaş altındaki bebeklerin BOS, kan ve solunum yolu salgularından izole edilmiştir. *H. influenzae* biyotip II ve III ise 1-5 yaş arası çocukların ve 20 yaşından büyük erişkinlerin konjonktiva ve balgam kültürlerinden izole edilmiştir. *H. influenzae* biyotip IV suşları, obstetrik, jinekolojik, perinatal ve neonatal enfeksiyonlardan izole edilmiştir (13).

2.3.6. *H. influenzae*'nin Serotiplendirilmesi

Serotiplendirme fenotipik ve genotipik yöntemlerle yapılabilmektedir. İzolatların serotiplendirilmesi için en basit yöntem, lam aglütinasyonudur. Serum fizyolojik (SF) içinde yoğun bir bakteri süspansiyonu hazırlanır ve süspansiyondan bir damla, lam üzerinde test edilecek izolata karşılık gelen daire üzerine konulur; ayrıca kontrol dairesine de SF damlatılır. Daha sonra tipe özgül antiserumlar test dairelerinin her birine eklenir ve lam döndürülerek karıştırılır. Organizmaların özgül bir antiserumla aglütinasyonu ve SF kontrolünde aglütinasyonun olmaması izolatın belirli bir serotip olarak tanımlanmasını sağlar. Tüm altı *H. influenzae* serotipi için polivalan ve monovalan antiserumlar ticari olarak mevcuttur (13).

Moleküler yöntemlerle serotiplendirme, standardize tekniklerin kullanılması ve lam aglütinasyon testlerinde kapsülsüz suşlarda gözlemlenen yanlış pozitif reaksiyonların bulunmaması nedeniyle artan duyarlılık ve özgüllük avantajına sahiptir. Bu yöntemlerin çoğu kapsül (cap) lokusundaki genlerin, dış membran protein D geninin (*glpQ*), kapsül üreten genin (*bexA*), 16S rRNA geninin ve insersiyon benzeri sekansın amplifikasyonuna dayanır (12).

2.3.7. İn vitro Antibiyotik Duyarlılığı

Etkenlere yönelik tedavi protokollerinin oluşturulmasında doğru antibiyotik duyarlılık testleri ile elde edilmiş veriler önem taşımaktadır. Tüm dünyada direnç oranları giderek artan *H. influenzae* izolatlarının antibiyotik duyarlılık durumları, EUCAST ve CLSI kılavuzları tarafından önerilen kriterlere göre farklılıklar göstermektedir (35-37). Antibiyotik duyarlılık yöntemlerinden olan sıvı mikrodilüsyon (SMD) ve disk difüzyon (DD) testinin *H. influenzae* için iki kılavuz arasındaki farklılıkları Tablo 3 ve 4'te özetlenmiştir.

Tablo 3. EUCAST antibiyotik duyarlılık yöntemlerinin koşulları

	EUCAST	
	Sıvı Mikrodilüsyon	Disk Difüzyon
Besiyeri	Mueller Hinton sıvı besiyeri + %5 lize at kanı + 20 mg/L β -NAD (MH-F Sıvı Besiyeri*)	Mueller Hinton agar + %5 defibrine at kanı + 20 mg/L β -NAD (MH-F Agar**)
İnokulum	5X10 ⁵ KOB/mL	0,5 McFarland
İnkübasyon	Normal atmosfer, 35±1 °C, 16-20 sa	%5 CO ₂ , 35±1 °C, 16-20 sa
Kalite kontrol	<i>H. influenzae</i> ATCC 49766	

* Mueller Hinton Fastidious Sıvı Besiyeri

**Mueller Hinton Fastidious Agar

Tablo 4. CLSI antibiyotik duyarlılık yöntemlerinin koşulları

	CLSI	
	Sıvı Mikrodilüsyon	Disk Difüzyon
Besiyeri	Mueller Hinton sıvı besiyeri + 5 g/L maya özütü + 15 μ g/mL β -NAD + 15 μ g/mL hematin (HTM Sıvı Besiyeri)	Mueller Hinton agar + 5 g/L maya özütü + 15 μ g/mL β -NAD + 15 μ g/mL hematin (HTM*)
İnokulum	5X10 ⁵ KOB/mL	0,5 McFarland
İnkübasyon	Normal atmosfer, 35±2 °C, 20-24 sa	%5 CO ₂ , 35±2 °C, 16-18 sa
Kalite kontrol	<i>H. influenzae</i> ATCC 49766 ve <i>H. influenzae</i> ATCC 49247	

**Haemophilus* Test Medium

2.4. Tedavi

H. influenzae'nin neden olduğu enfeksiyonların çoğu ampirik olarak tedavi edilir. *H. influenzae*'ya karşı etkinliğe sahip antibiyotikler arasında beta-laktamlar (örn. amoksisilin, amoksisilin-klavulanik asit veya ikinci ve üçüncü kuşak sefalosporinler), florokinolonlar, makrolitler ve tetrasiklinler yer alır. Genellikle ilk sırada beta-laktamlar tercih edilir. Amoksisilin-klavulanik asit; otitis media, sinüzit ve KOAH alevlenmeleri

gibi lokalize ve yaşamı tehdit etmeyen enfeksiyonlar için yaygın olarak kullanılan ampirik bir tedavi seçeneğidir (38). Bu enfeksiyonlar için aynı zamanda oral makrolitler (azitromisin, klaritromisin) ya da florokinolonlar da reçete edilmektedir (13).

Sistemik *H. influenzae* enfeksiyonu olan hastalar, acil antimikrobiyal tedaviye ihtiyaç duyar çünkü tedavi edilmeyen menenjit veya epiglottiti olan hastalarda mortalite oranı %100'e yaklaşmaktadır (16). Günümüzde sistemik Hib enfeksiyonları tedavisi için üçüncü kuşak sefalosporinlerin (sefotaksim, seftriakson) kullanımı önerilmektedir. Sistemik enfeksiyonların tedavisine genellikle 7-10 gün devam edilir; komplekse enfeksiyonları (örn. endokardit, osteomyelit) olan hastalarda 3-6 hafta parenteral tedaviye gerek duyulabilir (13). Sefalosporinlere en iyi alternatifler florokinolonlar, tetrasiklinler ve karbapenemlerdir (38). Ampisilin, yüksek direnç seviyeleri nedeniyle şüpheli invazif bakteriyel enfeksiyonlarda tek başına kullanılmamalıdır (39). Hib'e bağlı menenjitin başlangıç tedavisi için alternatif bir rejim, ampisilin ve kloramfenikolün birlikte kullanımınıdır (40). Adjuvan deksametazon, özellikle antibiyotiğin ilk dozundan önce veya antibiyotikle birlikte verilirse, Hib menenjiti olan hastalarda uzun vadeli sekel riskini azaltır (39).

İnvaziv Hib enfeksiyonu olan hastalarla yakın temasta olan; gebeler hariç bütün erişkinler, 48 aydan küçük çocuklar ve immünkompromize çocuklara rifampin ile antibiyotik profilaksisi önerilir (29).

2.5. Antibiyotik Direnci

2.5.1. Beta-laktam Antibiyotik Direnci

Genel olarak bir bakteride beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç; dış zar geçirgenliğinin azalması, atım pompaları, beta-laktamaz sentezi ve penisilin bağlayan proteinlerde (PBP) yapısal değişikliğe bağlı olarak ortaya çıkar. *H. influenzae*'da ise ampisilin ve diğer beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç, genellikle ya bir beta-laktamaz üretimine (sadece penisilinleri etkiler) ya da beta-laktamaz negatif ampisiline dirençli (BLNAR) izolatlarda olduğu gibi PBP3 transpeptidaz enzimini kodlayan *ftsI* geninde oluşan mutasyonlar sonucunda beta-laktamlara karşı afinitenin azalmasına (tüm beta-laktamları etkiler) bağlıdır. Bu iki direnç mekanizmasının dışında AcrAB atım pompasının aşırı ekspresyonuna bağlı olarak da beta-laktam direnci gelişebilmektedir.

İzolatların çok küçük bir kısmı hem beta-laktamaz üretir hem de *ftsI* mutasyonlarına sahiptir ve beta-laktamaz pozitif amoksisilin-klavulanik aside dirençli (BLPACR) izolatlar olarak adlandırılırlar. Beta-laktamaz üretimi dünyada hemen hemen tüm bölgelerde beta-laktam direncinin en yaygın mekanizmasıdır (41, 42). *H. influenzae*'da ampisilin direnci görülme oranları farklı Avrupa ülkeleri ve Kuzey Amerika'da %8 ila %30 arasında değişirken, bazı Doğu Asya ülkelerinde %50'nin üzerindedir (43).

Antimikrobiyal dirençli *H. influenzae*'nın isimlendirilmesi karmaşıktır. *H. influenzae* kökenleri, beta-laktam antibiyotiklere direnç açısından fenotipik ve genotipik olarak dört farklı şekilde tanımlanmaktadır. Fenotipik tanımlama; kromojenik nitrosefin diski ile beta-laktamaz varlığının araştırılması, ampisilin ve amoksisilin-klavulanik asit duyarlılık durumlarının belirlenmesiyle yapılırken direnç fenotipinden bağımsız olarak genotipik tanımlama; *bla_{TEM-1}*, *bla_{ROB-1}* genlerinin araştırılması ve *ftsI* geninin dizi analizi ile yapılmaktadır (41). Tanımlar Tablo 5'te özetlenmiştir.

Tablo 5. Beta-laktam antibiyotiklere direnç mekanizmalarına göre fenotipik ve genotipik sınıflandırma (43)

BLNAS	β-laktamaz negatif, ampisiline duyarlı suş
gBLNAS	β-laktamaz genleri negatif, PBP3'te önemli amino asit değişikliği olmayan suş
BLNAR	β-laktamaz negatif, ampisiline dirençli suş
gBLNAR	β-laktamaz genleri negatif, PBP3'te önemli amino asit değişikliği olan suş
BLPAR	β-laktamaz pozitif, ampisiline dirençli suş
gBLPAR	β-laktamaz genleri pozitif, PBP3'te önemli amino asit değişikliği olmayan suş
BLPACR	β-laktamaz pozitif, amoksisilin-klavulanik aside dirençli suş
gBLPACR	β-laktamaz genleri pozitif, PBP3'te önemli amino asit değişikliği olan suş

g: genomik

Yapısal değişikliğe sahip penisilin bağlayan proteinlerden kaynaklanan direnç, NTHi dahil olmak üzere birçok bakteriyel patojende beta-laktam direncinin önemli bir mekanizması olarak ortaya çıkar. Son yıllarda birçok ülkede, özellikle solunum yolu izolatları arasında BLNAR NTHi izolatlarının prevalansında hızlı bir artış olduğu belgelenmiştir (44). gBLNAR izolatları, Avustralya, ABD ve Avrupa'daki tüm NTHi izolatlarının %15-30'unu oluştururken, Japonya'da ise %50 gibi endişe verici bir orana ulaşmaktadır (45, 46).

Beta-laktamaz Aracılı Direnç

H. influenzae'de beta-laktamaz aracılı ampisilin direnci ilk kez 1970'li yılların başında Avrupa'da tanımlanmış ve bu beta-laktamazın TEM tipi olduğu 1975 yılında belirlenmiştir. 1981'de Rubin ve ark. *H. influenzae*'de daha sonra ROB-1 olarak adlandırılan yeni bir beta-laktamaz varlığını bildirmiştir (41). Her ikisi de ampisilin direncine sebep olan ve klavulanik asit gibi β -laktamaz inhibitörleri tarafından etkili bir şekilde inhibe edilen, benzer substrat profillerine sahip plazmit aracılı sınıf A serin β -laktamazlardır. Klinik izolatlarda beta-laktamaz aracılı ampisilin direncinin tespit edilmesi genellikle kolaydır; çünkü her iki enzim için de pozitif olan suşlar, yüksek MİK değerlerine (MİK₉₀: ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$) sahip olup nitrosefin diski ile pozitif sonuç verir. Bir izolatta beta-laktamaz tipini belirlemek için moleküler yöntemlerin kullanılması gereklidir. *H. influenzae*'de en yaygın ampisilin direnç mekanizması TEM-1 β -laktamaz üretimi olup ROB-1 β -laktamaz daha nadir olarak (%7-11) görülmektedir (41, 47).

a) TEM tipi β -laktamazlar

Plazmit aracılı TEM-1 ve TEM-2 β -laktamazlar, gram negatif bakteriler, özellikle *Enterobacteriaceae* ailesinde yaygındır ve *bla*_{TEM} genleri tarafından kodlanır. *bla*_{TEM-2} geninin yapısal bölgesindeki tek baz çifti farklılığından dolayı 37. pozisyonda gelişen amino asit değişikliği (glutamin yerine lizin) TEM-2 β -laktamazın gelişimine neden olmuştur. TEM-1 ve TEM-2 β -laktamazlar esasen aynı substrat profillerine sahiptir (41).

H. influenzae plazmitleri üzerinde yapılan kapsamlı araştırmalar, *bla*_{TEM} geninin *Enterobacteriaceae* türlerinden transpozon 2 (Tn2) veya Tn3 aracılığıyla *Haemophilus* türlerinde halihazırda var olan kriptik plazmitlere transpoze edildiğini bildirmektedir. Verilerin çoğu, *H. influenzae*'daki TEM β -laktamazın TEM-1 olduğunu göstermektedir (41, 48).

H. influenzae'de TEM taşıyan plazmitler iki farklı gruba ayrılmaktadır. Küçük (<10 kb) ve konjugatif olmayan plazmitler, tek direnç belirleyicisi olarak *bla*_{TEM}'i taşıma eğilimindeyken, daha büyük (yaklaşık 40 kb) ve konjugatif plazmitler sıklıkla kloramfenikol, tetrasiklin veya kanamisin direncine sebep olan diğer direnç genlerini de taşır. Büyük plazmitler daha yaygındır ve *H. influenzae*'de *bla*_{TEM} genlerinin yayılmasında daha önemli görünmektedir (41).

b) ROB tipi β -laktamazlar

ROB-1 geninin kromozomal olduğu bir izolat dışında, tüm izolatlarda ROB-1 geni 4,1-5,0 kb arasında değişen küçük plazmitler üzerinde bulunmaktadır (41). İnsan ve hayvandan elde edilen dokuz izolat üzerinde yapılan bir çalışmada, pB1000 plazmidinin dizilemesinin incelenmesiyle, *Pasteurellaceae* türlerinin *H. influenzae*'ya bu plazmidin aktarılmasında rezervuar olabileceği öne sürülmüştür (49).

ROB tipi β -laktamazın sefaklorlara karşı özellikle yüksek seviyede hidrolitik aktivitesi vardır ve sefaklor dirençli *H. influenzae* suşlarının yaklaşık %70'i ROB-1 üretir. ABD ve Meksika'da β -laktamaz üreten suşlar arasında ROB-1'in yüksek prevalansının (sırasıyla %21 ve %26) bu iki ülkede sefaklor kullanımının yaygın olması nedeniyle ROB-1 pozitif kökenlerin seçilimi ile ilişkili olduğu ileri sürülmektedir (47).

c) Yeni β -laktamazlar

H. influenzae kökenlerinde nitrosefin testi pozitif, PZR ile hem TEM-1 hem de ROB-1 genleri için negatif olan suşlar tanımlanmıştır (50). Bu durum, *H. influenzae* için daha önce tanımlanmayan bir β -laktamazı veya azalmış aktivite veya ekspresyon seviyesine sahip bir TEM-1 veya ROB-1 varyantını gösteriyor olabilir (41).

Penisilin Bağlayan Proteinlerdeki Değişikliklere Bağlı Direnç

H. influenzae, azalan moleküler ağırlıklarına göre sıralanan ve başlangıçta PBP1 ile PBP8 olarak adlandırılan sekiz PBP'ye sahiptir. Çeşitli proteinlerin farklı beta-laktamlara bağlanma kapasitelerinin *Escherichia coli*'deki PBP'lere benzer olduğu gözlemine dayanarak, bu proteinlere daha sonra sırasıyla PBP 1A, 1B, 2, 3A, 3B, 4, 5 ve 6 adı verilmiştir. PBP3, *ftsI* geni tarafından kodlanır. PBP'ler de dahil olmak üzere penisilin bağlayan enzimlerin çoğu, fonksiyonel olarak gerekli, yüksek oranda korunmuş üç amino asit motifine sahiptir. *H. influenzae* PBP3'te bu motifler S327-T-V-K, S379-S-N ve K512-T-G'dir (41, 51).

H. influenzae'nın β -laktamaz negatif suşlarında ampisilin direncine ilişkin ilk rapor 1974 yılında yayınlanmıştır. Hib olan ilk BLNAR suşu ise 1980 yılında Markowitz tarafından rapor edilmiştir (41). Bu konuda yapılan ileri çalışmalarla PBP3A ve PBP3B'deki yapısal değişikliklerin BLNAR'a sebep olan mekanizma olduğu belirlenmiştir. PBP3'ün transpeptidaz bölgesini kodlayan *ftsI* dizi analizinin BLNAR

suşlarında amino asit dizilimlerini ortaya çıkarmak ve bu dizileri duyarlı olan kontrol suşlarıyla karşılaştırmak için kullanılabilceği düşünülmüştür (41). Ubukata ve ark. (51) tarafından tarif edilen suşlarda, bu amino asit değişikliklerinin çoğunun korunmuş PBP3 motiflerinin yakınında olduğu görülmektedir. Bir grup çalışmada tanımlanmış olan *ftsI* mutasyonları ve oluşturulan sınıflandırmalar Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6. *ftsI* mutasyonları ve sınıflandırmalar (41)

Suş	Aminoasit pozisyonu																							
	337	350	352	357	368	377	385	389	437	443	449	490	501	502	511	517	526	528	532	547	562	569	586	
Rd	A	D	S	S	A	M	S	L	A	T	I	G	R	A	V	R	N	Y	T	V	V	N	A	
Ubukata																								
I		<u>N</u>		<u>N</u>		I	T		S							H							S	
II		<u>N</u>		<u>N</u>										V			K						S	
III		N		<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>	S	<u>S</u>
Dabernat																								
I	N		N											T		H								
IIa																							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>							

Kalın yazı tipi: Tüm suşlarda bulunan mutasyonlar; Altı çizili yazı tipi: Çoğu suшта bulunan mutasyonlar; Düz yazı tipi: Bazı suşlarda bulunan mutasyonlar

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

Rd: Referans dizi (*Haemophilus influenzae* Rd KW20 kromozom, tüm genom)

PBP3 aracılı direnç için çeşitli genotipik sınıflandırma sistemleri önerilmiştir ve terminoloji hala gelişmektedir. PBP3 aracılı dirence sahip *H. influenzae* izolatları, spesifik amino asit değişikliklerinin varlığına göre Ubukata ve ark. (51) tarafından tanımlanan üç temel genotipik gruba ayrılır (Grup I, II ve III). Türün hangi beta-laktamlara ve ne dereceye kadar dirençli olacağını belirleyen, mutasyonların konumudur. En yaygın olarak bulunan ve direnç gelişiminin ilk aşamasını temsil eden mutasyonlar; N526K ve R517H mutasyonlarıdır (52, 53). Dabernat ve ark. (54) tarafından diğer spesifik mutasyonların varlığına göre Grup II dört alt gruba ayrılmıştır

(Grup IIa, IIb, IIc, IId). Grup III benzeri Garcia-Cobos ve ark. (55) tarafından tanımlanırken, Grup III+ ve Grup III benzeri + Skaare ve ark. (42) tarafından tanımlanmıştır. Bu gruplar ve mutasyonları Tablo 7’de gösterilmiştir.

Tablo 7. *ftsI* genindeki mutasyonlara göre *H. influenzae* izolatlarının gruplandırılması (56)

PBP3 grubu	Amino asit değişiklikleri
I	R517H
IIa	N526K
IIb	N526K + A502V
IIc	N526K + A502T
IId	N526K + I449V
III	M377I + S385T + N526K
III benzeri	M377I + S385T + R517H
III+	M377I + S385T + L389F + N526K
III benzeri +	M377I + S385T + L389F + R517H

S385T mutasyonu, sefotaksim MİK değerinin artmasıyla ilişkilidir ve yüksek düzey dirençli izolatları düşük düzey dirençli olanlardan ayırır. Grup I ve II düşük düzey dirençli izolatları temsil ederken, grup III ve grup III benzeri yüksek düzey dirençli izolatları gösterir. Ek olarak L389F mutasyonu varlığı, yüksek düzey dirençli izolatlarda direnç seviyelerinin daha da artmasıyla ilişkilidir (53). Yüksek düzey dirençli izolatlar Japonya ve Güney Kore’de (57-59) önemli bir klinik sorun oluştururken, düşük düzey dirençli izolatlar dünyanın geri kalanında baskındır (42, 60-67).

Yüksek düzey dirençli izolatlar 1990’ların sonunda Japonya’da ve 2000’li yıllarda Kore’de sık görülmeye başlandı (58, 68). Bununla birlikte, Güneybatı ve Kuzey Avrupa’da, S385T mutasyonu olmayan ve esas olarak sefotaksim ve seftriaksona duyarlı olan düşük düzey dirençli *H. influenzae* izolatları halen baskındır (42, 55, 60, 63). Asya dışında PBP3 amino asit değişikliklerinin belirlendiği önceki sistematik araştırmalarda, çok az sayıda grup III izolat rapor edilmiştir (53). Bunlar; Kanada’dan bir invazif izolat, Fransa’dan bir otitis media izolatı ve Norveç’ten bir üst solunum yolu izolatıydı (42, 63, 69). Grup III benzeri izolatlar ise Avrupa’da daha sık rapor edilmektedir (42, 55, 63, 64, 70, 71). Bununla birlikte, Avrupa’da grup II izolatlarının yaygın hale gelmesinin bir endişe konusu olduğunu bildiren çalışmalar da mevcuttur (52).

H. influenzae'da enzimatik direnç, birçok Avrupa ülkesi, Avustralya ve Kanada'da %20'nin üstünde bir prevalansla daha baskın olmuştur. Ancak son çalışmalar, BLPAR izolatların prevalansının stabil olduğunu veya azaldığını, buna karşılık BLNAR fenotipinde önemli bir artış olduğunu ortaya koymaktadır (72).

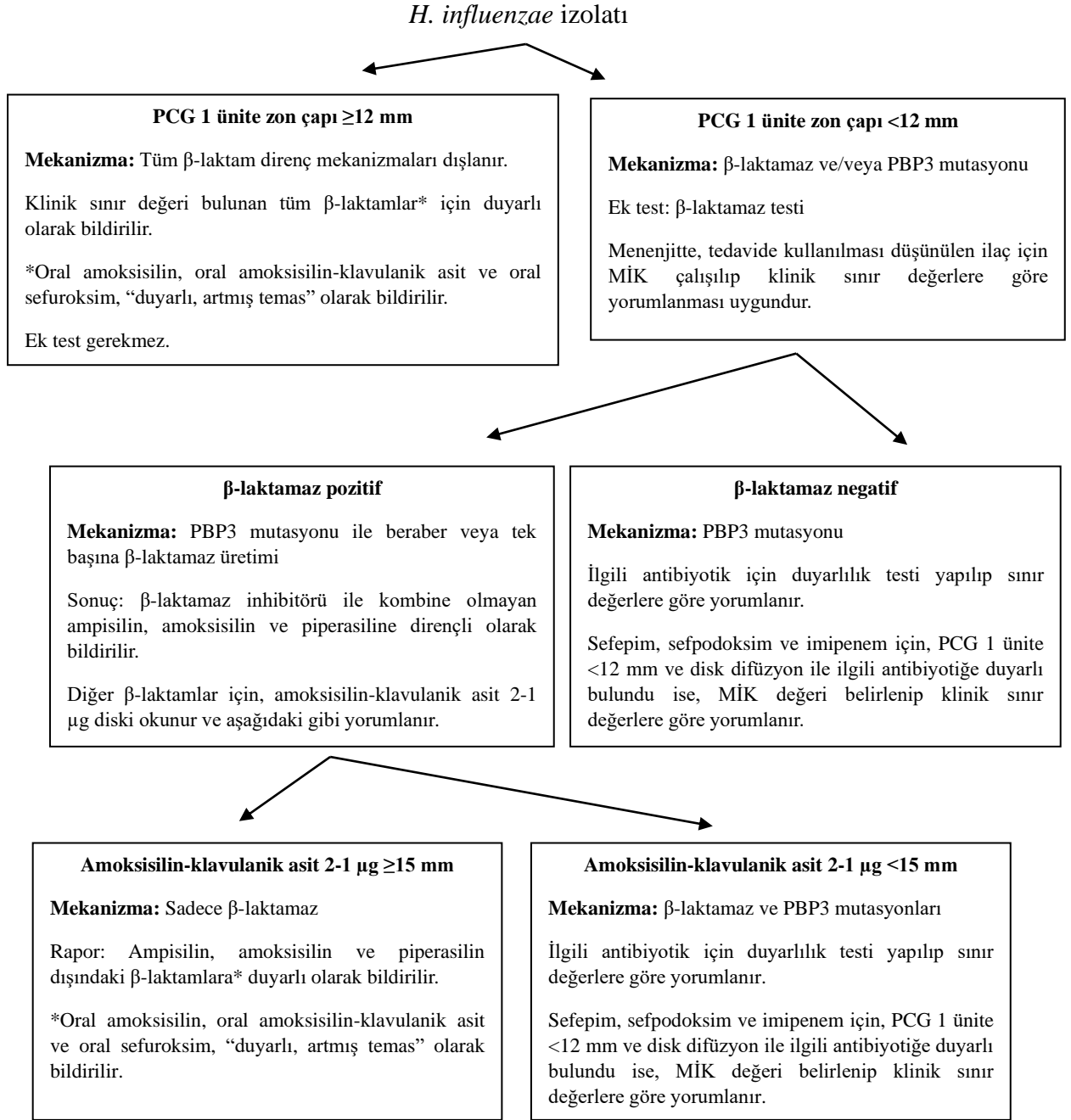
PBP3 aracılı dirence sahip izolatların ortaya çıkmasına neden olan mekanizmalar tam olarak anlaşılammıştır. R517H, N526K ve S385T değişikliklerinin birincil nedeni olarak spontan mutasyonlar kabul edilir ancak klasik transformasyon ve homolog rekombinasyon yoluyla horizontal gen transferinin direncin daha da gelişmesinde ve yayılmasında önemli bir rol oynadığı da öne sürülmüştür (42).

Bir dizi çalışma, aynı PBP3 amino asit değişikliklerine sahip BLNAR suşları ile karşılaştırıldığında BLPACR suşlarının, BLNAR suşlarından çok daha yüksek ampisilin MİK'lerine (2 - 64 mg/L) sahip olduğunu göstermiştir ancak amoksisilin-klavulanik asit ve sefalosporinlerin MİK'leri aynıdır; bu da beta-laktamazın dirence katkısının ampisilin ile sınırlı kaldığını gösterir (41).

Tüm bu mekanizmalar dışında, *acrR* düzenleyici genindeki (AcrAB atım pompasını baskılayan gen) mutasyonların neden olduğu AcrAB atım pompasının aşırı ekspresyonunun da beta-laktam direncine neden olabileceği Kaczmarek ve ark. (65) tarafından gösterilmiştir.

EUCAST, β -laktam antibiyotiklere direnci saptamaya ilişkin özel testlerin sayısını azaltmak amacıyla β -laktam direnç mekanizmalarının saptanmasında benzilpenisilin (PCG) tarama testinin kullanımına yönelik bir akış şeması oluşturmuştur (Tablo 8) (35). Bu algoritma, PBP3 aracılı dirence sahip izolatların saptanmasında yüksek duyarlılık ve özgüllük göstermektedir, ancak tarama testi pozitif izolatların gerçekten dirençli olup olmadığını belirlemek için MİK değerlerini saptayan doğrulayıcı testlerin yapılması önerilir (73).

Tablo 8. EUCAST tarafından önerilen β -laktam direnç mekanizmaları akış şeması



PCG: Benzilpenisilin

2.5.2. Makrolit Direnci

Makrolitler, intrinsik bir atım pompasının varlığı nedeniyle *H. influenzae*'ya karşı sınırlı aktiviteye sahiptir. Azitromisin MİK değerleri genellikle 0,25-4 mg/L arasında değişmektedir. Bazı izolatlarda ek L4 ve L22 ribozomal protein ve 23S rRNA

mutasyonları ile ilişkili olarak yüksek düzey direnç (azitromisin MİK değerleri >64 mg/L) de bildirilmiştir (41, 74).

Gram pozitif bakterilerde özellikle yaygın olan, ancak bunlarla sınırlı olmayan, kazanılmış makrolit direnç genleri mevcuttur. Bunlar, rRNA metilazları kodlayan ve 23S rRNA hedefinde makrolit bağlanmasını inhibe eden çeşitli *erm* genlerini ve akım pompalarını kodlayan çeşitli *mef* veya ilgili genleri içerir. Bu genler Roberts ve ark. (75) tarafından 2011'de yapılan çalışma dışında, *H. influenzae*'da geniş çapta rapor edilmemiştir (74).

2.5.3. Tetrasiklin Direnci

H. influenzae'de tetrasiklin direnci, genellikle konjugatif plazmitlerde yer alan *tet(B)* geni tarafından kodlanan bir atım pompası mekanizması ile ilişkilidir. Belçika, İspanya ve Küba'da Hib izolatları için ampisilin-kloramfenikol-tetrasiklin-kanamisin direnç genlerini taşıyan plazmitler tanımlanmıştır. Atım pompası mekanizması dışında, ribozomal koruma proteinlerinin üretimi yoluyla tetrasiklin direnci geliştiren *tet(M)* ve *tet(K)* genleri sırasıyla *H. ducreyi* ve *H. aphrophilus*'ta bulunmuştur. *H. ducreyi*'deki *tet(M)* geninin plazmit aracılı olduğu ve in vitro konjugasyon yoluyla *H. influenzae*'ya transfer edilebildiği gösterilmiştir (41).

2.5.4. Kinolon Direnci

H. influenzae kökenleri arasında kinolonlara direnç nadir olmakla birlikte, *gyrA* ve *gyrB* tarafından kodlanan DNA girazın ve *parC* ve *parE* tarafından kodlanan topoizomeraz IV'ün kinolon direncini belirleyen bölgesindeki mutasyonlar direnç açısından kritik öneme sahiptir (76). Diğer gram negatif bakterilerde olduğu gibi, kinolonlar için DNA giraz birincil hedefken, topoizomeraz IV ikincil hedeftir. *H. influenzae*'da bu mutasyonların kademeli bir şekilde meydana geldiği gösterilmiştir. *gyrA*'daki ilk mutasyon, kinolonlara karşı duyarlılığın azalmasına neden olur, ancak MİK düzeyleri sınır değerlere göre duyarlı aralıkta kalır. Corkill ve ark. tarafından nalidiksik asit duyarlılığının azalmış siprofloksasin duyarlılığını göstermede başarılı olduğu bulunmuştur ve düşük ve yüksek düzey kinolon direncinin test edilmesi için yararlı bir gösterge olarak önerilmiştir (77). Her iki kinolon hedefindeki çift

mutasyonlar, mevcut CLSI ve EUCAST sınır değerleri kullanılarak saptanabilen dirençli bir fenotip oluşturur (78).

H. influenzae'da kinolon direnci ilk kez 1993'te, dirence neden olan spesifik mutasyonlar ise 1996'da tanımlanmıştır. Kinolon direnci, artan sayıda mutasyonla kademeli olarak kazanılır. *gyrA* ve *parC*'de bir veya iki mutasyon barındıran suşlar kinolonlara karşı düşük düzeyde direnç gösterirken, *gyrA* , *parC* ve *parE*'de üç veya daha fazla mutasyona sahip olanlar yüksek düzeyde direnç gösterir (78). Daha önce, *gyrA*'da S84 ve D88, *parC*'de G82, S84 ve E88'de mutasyonlara sahip kinolon dirençli *H. influenzae* suşları rapor edilmiştir (79).

2.5.5. Trimetoprim-Sülfametoksazol Direnci

H. influenzae kökenleri arasında trimetoprim-sülfametoksazole (SXT) direnç yaygındır (41). Trimetoprim direnci temel olarak dihidrofolat redüktazı kodlayan genlerin değişmesiyle (*dfrA* genleri), mutant dihidrofolat redüktazın ilaca olan düşük afinitesinden kaynaklanır ancak doğal substratlara olan afinitesini etkilemez. Sülfametoksazol direnci genellikle *sul1* veya *sul2* genlerinin plazmit aracılı kazanılmasından ve/veya dihidropteroat sentaz kodlayan kromozomal *folP* geninde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanır (80, 81). Aynı zamanda mevcut kanıtlar, timidilat sentazı kodlayan *thyA*'da meydana gelen mutasyonların neden olduğu timidin oksotrofinin *H. influenzae*'da dirence sebep olduğunu göstermiştir (82).

2.5.6. Kloramfenikol Direnci

H. influenzae'daki kloramfenikol direnci, genellikle plazmit aracılı *cat* geni tarafından kodlanan kloramfenikol asetiltransferazın (CAT) üretimiyle ilişkilidir. Bu plazmitler sıklıkla tetrasiklin ve ampisiline direnci kodlayan genleri de taşır. Konjugatif plazmitler ayrıca kromozoma dahil olabilir (41).

2.6. *H. influenzae* Tip b Aşıları

H. influenzae tip b kapsüler polisakkarit aşısı, 1985 yılında ABD'de kullanım için ruhsatlandırılmış ve 1988'e kadar kullanılmıştır. Hib polisakkarit aşısının özellikleri diğer polisakkarit aşılarına benzemektedir. Aşıya verilen yanıt, T hücrelerinden bağımsız olup iki yaş veya daha küçük çocuklarda zayıf immünojeniteye sahiptir. Ayrıca

tekrarlayan dozlarda antikor titresinde herhangi bir artış gözlenmezken, üretilen antikor nispeten düşük afiniteli IgM'dir ve IgG üretimine geçiş minimum düzeydedir (18).

Aşının immünojenitesini artırmak amacıyla geliştirilen ilk Hib konjuge aşısı 1987'de ruhsatlandırılmıştır. Konjugasyon, bir polisakkaritin daha etkili bir protein taşıyıcıya kimyasal olarak bağlanması işlemidir. Bu işlem polisakkariti T hücrelerinden bağımsız bir antijenden T hücrelerine bağımlı bir antijene dönüştürür ve özellikle küçük çocuklarda immünojeniteyi büyük ölçüde artırır (18). Konjuge aşılar hem invazif hastalıkları hem de nazofarengeal taşıyıcılığı azaltmaktadır (17). Hib konjuge aşıları Tablo 9'da gösterilmiştir.

Tablo 9. *H. influenzae* tip b konjuge aşıları

Monovalan Konjuge Aşılar	Karma Aşılar
PRP-T (ActHIB [®] , Sanofi Pasteur)	DTaP-IPV/Hib (Pentacel [®] , Sanofi Pasteur)
PRP-T (Hiberix [®] , GlaxoSmithKline)	DTaP-IPV-Hib-HepB (Vaxelis [®] , MSP Vaccine Company)
PRP-OMP (PedvaxHIB [®] , Merck Sharp & Dohme Corp.)	

ActHIB ve Hiberix taşıyıcı protein olarak tetanoz toksoidi (PRP-T) kullanırken, PedvaxHIB meningokok dış membran proteini (PRP-OMP) kullanır. Pentacel PRP-T içerirken, Vaxelis PRP-OMP içerir. Hib aşıları intramüsküler enjeksiyon yoluyla uygulanır. PedvaxHIB aşısının her dozu adjuvan olarak alüminyum içerir. Monovalan Hib aşıları hiçbir antibiyotik veya koruyucu madde içermez. Hib aşısı içeren karma aşılarda içerikler farklılık gösterir (18).

Tüm bebeklere ikinci aydan itibaren primer seri Hib konjuge aşısı (monovalan veya karma aşı) yapılmalıdır. Primer serideki doz sayısı kullanılan aşının türüne bağlıdır. PRP-T üç doz gerektirirken PRP-OMP iki doz gerektirir. Primer seride hangi aşının kullanıldığına bakılmaksızın, 12 ila 15 ay arasında bir takviye dozu önerilir (17).

Türkiye Çocukluk Dönemi Aşılama Takviminde Hib aşısı beşli karma aşı içerisinde (DaBT-İPA-Hib) yer almaktadır. Bu aşı 2., 4., 6. ve 18. ayda olmak üzere dört doz uygulanır (83).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Bakteri İzolatları

Çalışmaya Ocak 2018-Haziran 2022 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Merkez Bakteriyoloji Laboratuvarında kan ve solunum yolu örneklerinden enfeksiyon etkeni olarak izole edilen toplam 150 adet *H. influenzae* izolatı dahil edildi. Tekrarların önlenmesi için her hastaya ait bir izolat çalışmaya alındı.

3.2. İzolatların Saklanması ve Canlandırılması

İzolatlar tekrar çalışılincaya dek, stok besiyeri (%20 gliserol içeren beyin kalp infüzyon sıvı besiyeri) içerisinde -80°C’de saklandı. Canlandırma işlemi, stoklar açılıp oda sıcaklığında çözüldükten sonra, 50 µl bakteri süspansiyonu tek koloni ekim yöntemiyle %5 at kanlı çikolata agara (RTA, Türkiye) ekilerek ve 35-37 °C’de %5 CO₂’li etüvde 24 saat inkübasyona bırakılarak yapıldı.

3.3. İzolatların Tanımlanması

%5 at kanlı çikolata agarda üreyen bakterilerin makroskopik olarak koloni morfolojisi değerlendirildi ve mikroskopik inceleme için Gram boyaması yapıldı. Makroskopik ve mikroskopik olarak *H. influenzae* olabileceği düşünülen kolonilerin tanımlanması MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Almanya) ile yapıldı. MALDI-TOF MS ile ≥ 2.0 skorla tür düzeyinde tanımlanabilen izolatlar çalışmaya alındı.

3.4. İzolatların Serolojik Tanımlanması

İzolatların serotiplendirilmesi lam aglütinasyon yöntemiyle yapıldı. Lam aglütinasyon yöntemi üretici firmanın önerileri doğrultusunda, Difco™ *Haemophilus influenzae* Antisera Poly (Becton Dickinson, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm malzemeler oda sıcaklığına getirildikten sonra antiserum içeriği, 1 ml steril saf su ile tamamen çözdürüldü. İşleme başlamadan önce izolatlar otoaglütinasyon açısından değerlendirildi. Temiz bir lamın üzerinde, çikolata agardaki kolonilerden bir öze dolusu bakteri bir damla (yaklaşık 35 µl) steril SF solüsyonuna aktararak emülsifiye edildi. Lam bir dakika boyunca döndürülüp otoaglütinasyon olup olmadığı test edildi. Otoaglütinasyon olmadığından emin olunduktan sonra işlem basamaklarına geçildi. Temiz bir lama antiserumdan bir damla koyuldu. Çikolata agardaki kolonilerden bir öze

dolusu bakteri antiserum damlasına eklenerek iyice karıştırıldı. Lam bir dakika boyunca ileri-geri hareket ettirilerek aglütinasyon varlığı araştırıldı. Aglütinasyon aşağıdaki kriterlere göre değerlendirildi:

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

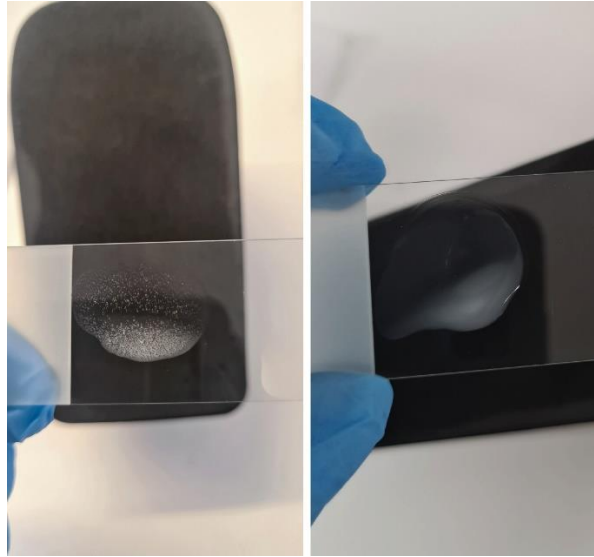
3+ : %75 aglütinasyon (arka plan net- hafif bulanık)

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

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

- : Aglütinasyon yok

Bir dakika içinde 3+ veya daha büyük aglütinasyon oluşması pozitif sonuç olarak kabul edildi. İzolatlar polivalan bir antiserumla test edildiği için tiplendirilebilen (a, b, c, d, e, f'den biri) ve NTHi olarak iki gruba ayrıldı. Lam aglütinasyon yöntemiyle *H. influenzae* izolatlarının serolojik tanımlanması Şekil 1'de gösterilmiştir.



Şekil 1. Lam aglütinasyon yöntemiyle *H. influenzae* izolatlarının serolojik tanımlanması (sol-pozitif sonuç, sağ-negatif sonuç)

3.5. İn-vitro Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Antibiyotik duyarlılık testleri EUCAST sınır değerler rehberi (v 13.0, 2023) kriterleri doğrultusunda disk difüzyon yöntemiyle gerçekleştirildi. Ampisilin ve sefotaksim için MİK değerleri ISO-standart sıvı mikrodilüsyon yöntemi uyarınca EUCAST kriterleri doğrultusunda belirlendi (35, 84). Ayrıca izolatların hasta örneklerinden ilk izolasyonları sırasında CLSI rehberi (Amoksisilin-klavulanik asit için

M100-ED31:2021, diğ er antibiyotikler için M100-ED33:2023) (36, 85) kriterleri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi kullanılarak elde edilen duyarlılık sonuçları Laboratuvar Bilgi Yönetim Sistemi verileri üzerinden alındı. Bu veriler EUCAST kriterleri doğrultusunda elde edilen sonuçlarla karşılaştırma yapmak amacıyla kullanıldı. İzolatların beta-laktamaz üretimi kromojenik nitrosefin diski kullanılarak belirlendi.

3.5.1. Kullanılan Antibiyotikler

Çalışmada disk difüzyon testi için ampisilin, amoksisilin-klavulanik asit, meropenem, sefuroksim, sefotaksim, tetrasiklin ve trimetoprim-sülfametoksazol diskleri (Bioanalyse, Türkiye) kullanıldı. EUCAST'in beta-laktam antibiyotiklere ilişkin spesifik testlerin sayısını azaltmak amacıyla beta-laktam direnç mekanizmalarının saptanmasında önerdiği akış şeması gereğince benzilpenisilin G (Oxoid, İngiltere) tarama testi ve florokinolonlara yönelik nalidiksik asit (Bioanalyse, Türkiye) tarama testi de disk difüzyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirildi. Çalışmada sıvı mikrodilüsyon testi için ampisilin (Sigma-Aldrich, ABD, Cat. No. A9518) ve sefotaksim (Sigma-Aldrich, ABD, Cat. No. C7912) tozu kullanıldı. Kullanılan disklerin EUCAST ve CLSI kılavuzlarına göre antibiyotik içerikleri ve zon çaplarına göre değerlendirilmesi Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10. Kullanılan disklerin antibiyotik içerikleri ve zon çaplarına göre değerlendirilmesi

Antibiyotik	Disk içeriği		Zon çapları (mm)				
	EUCAST	CLSI	EUCAST			CLSI	
			Duyarlı (≥)	Dirençli (<)	Teknik Belirsizlik Alanı	Duyarlı (≥)	Dirençli (≤)
Benzilpenisilin G (Tarama)	1 ünite	-	12	12		-	
Ampisilin	2 µg	10 µg	18	18		22	18
Amoksisilin-Klavulanik asit	2-1 µg	20-10 µg	15	15		20	19
Meropenem	10 µg	10 µg	20	20		20	-
Sefuroksim	30 µg	30 µg	27	25	25-27	20	16
Sefotaksim	5 µg	30 µg	27	27	25-27	26	-
Tetrasiklin	30 µg	30 µg	25	25		29	25
Trimetoprim-Sülfametoksazol	1.25-23.75 µg	1.25-23.75 µg	23	20		16	10
Nalidiksik Asit (Tarama)	30 µg	-	23	23		-	

3.5.2. Besiyerinin Hazırlanması

EUCAST, *H. influenzae* gibi güç üreyen mikroorganizmaların in vitro antibiyotik duyarlılıklarının araştırılmasında disk difüzyon yöntemi için Mueller Hinton Fastidious agar (MH-F agar) ve sıvı mikrodilüsyon yöntemi için Mueller Hinton Fastidious sıvı besiyeri (MH-F sıvı besiyeri) kullanılmasını önermektedir. MH-F agar ve MH-F sıvı besiyeri, EUCAST besiyeri hazırlama rehberindeki (v 7.0) basamaklar doğrultusunda manuel olarak hazırlandı (86). MH-F agar ve MH-F sıvı besiyeri hazırlarken kullanılan içerikler Tablo 11 ve Tablo 12’de gösterilmiştir.

Tablo 11. MH-F agarın hazırlanmasında kullanılan malzemeler

Mueller Hinton agar tozu (Condalab, İspanya)
Mekanik yöntemle defibrine edilmiş at kanı
β -nikotinamid adenin dinükleotid (β -NAD), saflık \geq %98 (Serva, Almanya)

Tablo 12. MH-F sıvı besiyerinin hazırlanmasında kullanılan malzemeler

Kasyon ayarlı Mueller Hinton sıvı besiyeri tozu (Becton Dickinson, ABD)
%50 sulandırılmış lize at kanı
β -nikotinamid adenin dinükleotid (β -NAD), saflık \geq %98 (Serva, Almanya)

MH-F sıvı besiyeri için %50 sulandırılmış lize at kanının hazırlanması

1. Mekanik yöntemle defibrine edilmiş at kanı eşit miktarda steril deiyonize su ile aseptik koşullarda sulandırıldı.
2. Kan bir gece -20 °C’de donduruldu ve ardından çözündürüldü. Bu döngüye tüm hücreler tamamen lize olana dek devam edildi (genellikle üç döngünün yeterli olduğu belirtilmekle birlikte ISO standardı 20776-1 tarafından önerildiği üzere gerekli görüldüğünde yedi döngüye kadar çıkılabilmektedir).
3. %50 sulandırılmış lize at kanı santrifüjlenerek berrak bir görünüm alması sağlandı.
4. Hazırlanan kan, alikotlara ayrılarak -20 °C’de saklandı ve gerektiğinde çözülerek kullanıldı.

MH-F agar ve sıvı besiyeri için β -NAD stok çözeltisinin hazırlanması:

1. β -NAD, steril deiyonize su içerisinde konsantrasyonu 20 mg/mL olacak şekilde çözdürüldü.
2. Çözelti 0,2 μ m membran filtreden geçirilerek steril edildi.
3. Stok çözeltisi alikotlara ayrılarak -20 °C'de saklandı ve gerektiğinde çözülerek kullanıldı.

MH-F agar plaklarının hazırlanması ve saklanması:

1. Mueller Hinton agar üreticinin talimatları doğrultusunda hazırlandı ve otoklavlandı.
2. Besiyeri 42-45°C'ye soğutuldu.
3. MH-F hazırlanması için, aseptik koşullarda bir litre besiyerine mekanik yöntemlerle defibrine edilmiş 50 mL at kanı (İstanbul Pendik Veteriner Enstitüsünden sağlanmıştır) ve 1 mL β -NAD stok çözeltisi (20 mg/mL) eklendi. (Mueller Hinton agar + %5 defibrine at kanı + 20 mg/L β -NAD).
4. İyice karıştırılan besiyeri, steril petri plaklarına besiyeri kalınlığı 4 mm \pm 0,5 mm olacak şekilde dağıtıldı (90 mm çaplı petri plakları için yaklaşık 25 mL).
5. Plaklar hareket ettirilmeden önce agarın katılaşması bekledi.
6. Hazırlanan agar plakları 4-8 °C'de saklandı.

MH-F sıvı besiyerinin hazırlanması ve saklanması:

1. Katyon ayarlı Mueller Hinton sıvı besiyeri, üreticinin talimatları doğrultusunda, eklenecek lize at kanı miktarı kadar (bir litre besiyeri için 100 mL) daha az distile su (900 mL) eklenerek hazırlandı ve otoklavlandı.
2. Besiyeri 42-45 °C'ye soğutuldu.
3. Aseptik koşullarda bir litre besiyerine 100 mL %50 sulandırılmış lize at kanı ve 1 mL β -NAD stok çözeltisi (20 mg/mL) eklendi ve iyice karıştırıldı.
4. Hazırlanan besiyeri 4-8 °C'de saklandı.

3.5.3. Disk Difüzyon Testi

1. Bir gece inkübasyon sonucunda çikolata agarda üremiş olan kolonilerden steril izotonik SF içinde 0,5 McFarland bulanıklık standardına (fotometrik cihaz kullanılarak) eşdeğer bir bakteri süspansiyonu hazırlandı ve bu süspansiyon 15 dakika içinde kullanıldı.

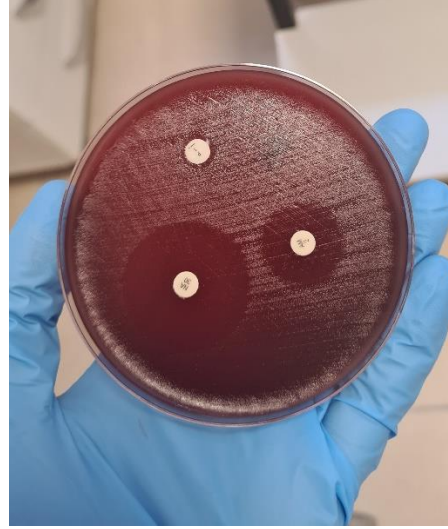
2. Ekim işlemi öncesinde besiyerleri ve diskler oda sıcaklığına getirildi. Steril bir eküvyon bakteri süspansiyonuna daldırıldı ve inokulum tüm agar yüzeyine ekim çizgileri arasında boşluk kalmamasına özen gösterilerek eşit olarak yayıldı.

3. Plaklara ekim işlemi sonrasında 15 dakika içinde diskler yerleştirildi. Agar plakları ters çevrildi ve 15 dakika içinde etüve kaldırıldı. Plaklar 35 ± 1 °C'de, %5 CO₂ içeren atmosferde 18 ± 2 saat inkübe edildi.

4. Kalite kontrol suşları olarak *H. influenzae* ATCC 49766 (duyarlı, sokak tipi) (Microbiologics, ABD) ve *H. influenzae* ATCC 49247 (PBP mutasyonlarına bağlı olarak β -laktamlara azalmış duyarlılık gösteren suş) (Microbiologics, ABD) kullanıldı.

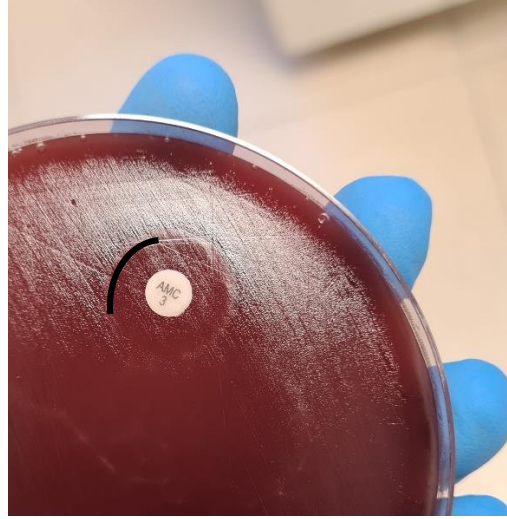
5. İnkübasyon sonrası zon çapları, plağın ön yüzünden kapak açık olarak, yansıyan ışıkta bir cetvel yardımıyla ölçüldü.

6. Zon çapları EUCAST güncel sınır değer tablolarına (v 13.0, 2023) göre değerlendirildi. Disk difüzyon yöntemiyle antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi Şekil 2'de gösterilmiştir.



Şekil 2. Disk difüzyon yöntemiyle antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi

EUCAST sınır değerler rehberi (v 13.0), beta-laktam antibiyotik diski etrafında üreme olmasına rağmen bir inhibisyon zonu izlenmesi durumunda inhibisyon zonunun dış kenarının okunmasını önermektedir (35). Bu duruma sahip izolatlardan bir örnek Şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3. *H. influenzae* ve bir beta-laktam antibiyotiğin disk etrafında üreme görülen inhibisyon zonu örneği

EUCAST disk difüzyon okuma rehberi (v 10.0), saf kültürlerde çift zon oluşması durumunda iç zonun okunmasını önermektedir (87). Bu duruma sahip izolatlardan bir örnek Şekil 4'te gösterilmiştir.



Şekil 4. Disk difüzyonda çift zon örneği

3.5.4. Sıvı Mikrodilüsyon Testi

Sıvı mikrodilüsyon testi EUCAST kriterleri doğrultusunda katyon ayarlı Mueller Hinton Fastidious sıvı besiyeri içinde antibiyotiklerin iki kat dilüsyonları hazırlanarak yapıldı. Son inokulum konsantrasyonu 5×10^5 KOB/mL olacak şekilde bakteri

süspansiyonu inoküle edildi. %5 CO₂'li ortamda 35±1 °C'de 18±2 saat inkübasyon sonrası gözle görülür üremenin inhibe olduğu en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK olarak belirlendi.

Antibiyotik Stok Çözeltilerinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan ampisilin tozunun potensi 920 µg/mg ve sefotaksim tozunun potensi 940 µg/mg idi. Çözücü olarak ampisilin için fosfat tamponu (pH 8,0, 0,1 mol/L) ve sefotaksim için steril distile su, sulandırıcı olarak her iki antibiyotik için de Mueller Hinton Fastidious sıvı besiyeri kullanıldı. Antibiyotiklerin stok çözeltilerinin hazırlanması için aşağıdaki formülden yararlanıldı.

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

Ampisilin 1280 µg/mL ve sefotaksim 256 µg/mL konsantrasyonda olacak şekilde stok çözeltiler hazırlandı. Ampisilin stok çözeltisi 1/40 oranında MH-F sıvı besiyeri ile ve sefotaksim stok çözeltisi 1/128 oranında MH-F sıvı besiyeri ile sulandırıldı. Böylece son konsantrasyon ampisilin için 32 µg/mL ve sefotaksim için 2 µg/mL olarak elde edildi. Antibiyotiklerin iki kat seri dilüsyonları için vidalı kapaklara sahip steril cam tüpler kullanıldı.

Bakteri İnokulumunun Hazırlanması

1. Bir gece inkübasyon sonucunda çikolata agarda üreyen kolonilerden steril izotonik SF içinde 0,5 McFarland bulanıklık standardına (fotometrik cihaz kullanılarak) eşdeğer bir bakteri süspansiyonu hazırlandı (10⁸ KOB/ml).

2. 4950 µl Mueller Hinton sıvı besiyeri içerisine 50 µl bakteri süspansiyonundan eklendi (10⁶ KOB/ml).

Testin Yapılışı

1. Steril U tabanlı 96 kuyucuklu mikropaklar kullanıldı.

2. Birinci kuyucuktan 10. kuyucuğa kadar tüpler içinde hazırlanmış olan antibiyotik seri dilüsyonlarından 50 µL eklendi. 11. kuyucuğa 50 µL ve 12. kuyucuğa 100 µL antibiyotik içermeyen MH-F sıvı besiyeri eklendi.

3. Bakteri inokulumundan 12. kuyucuk hariç tüm kuyucuklara 50 µL eklendi. Böylece son inokulum konsantrasyonu 5×10⁵ KOB/mL olarak ayarlandı.

4. Her bir izolat için, son kuyucuk besiyerinin sterilite kontrolü (negatif kontrol) ve 11. kuyucuk inokulum kontrolü (pozitif kontrol, üreme kontrolü) olarak kullanıldı.

7. *H. influenzae* ATCC 49766 ve *H. influenzae* ATCC 49247 suşu kalite kontrol amaçlı kullanıldı.

8. Plaklar %5 CO₂'li ortamda, 35±1 °C'de 18±2 saat inkübe edildi.

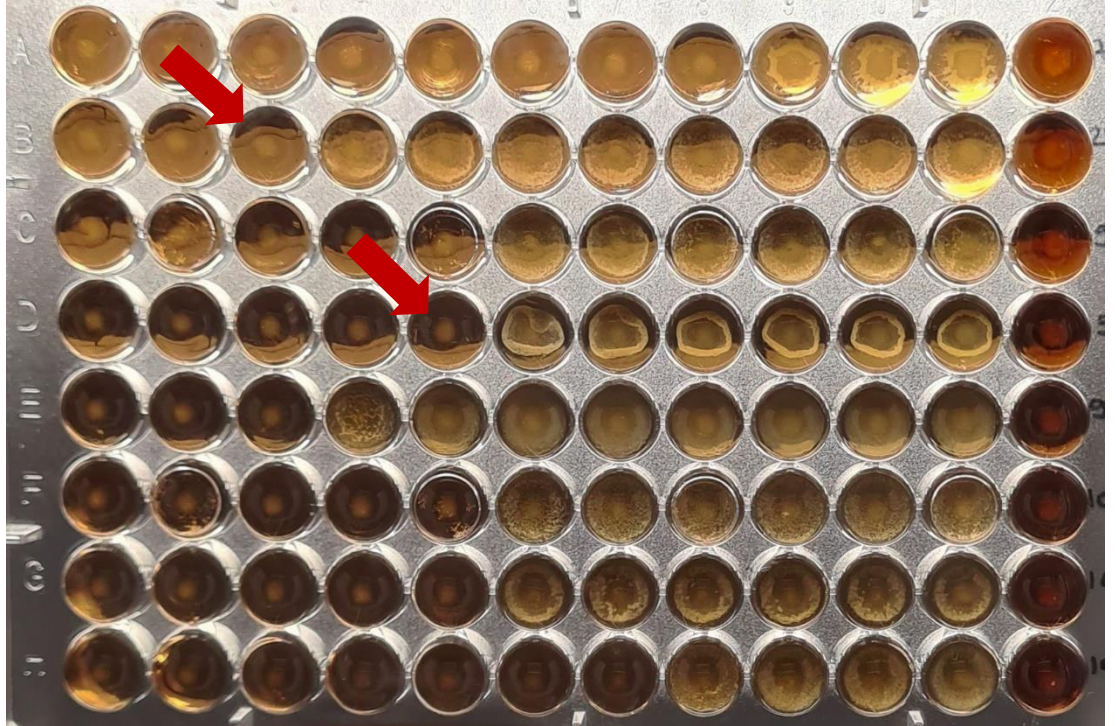
9. Üremenin görülmediği en düşük konsantrasyon, MİK değeri olarak kabul edildi.

Antibiyotiklere ait dilüsyon aralıkları Tablo 13'te ve sıvı mikrodilüsyon yöntemine ait bir mikropak örneği Şekil 5'te gösterilmiştir.

Tablo 13. Antibiyotiklere ait dilüsyon aralıkları

Antibiyotikler	Kuyucuklar											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
AMP	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	PK	NK
CTX	1	0,5	0,25	0,125	0,06	0,03	0,016	0,008	0,004	0,002	PK	NK

PK, Pozitif kontrol; NK, Negatif kontrol; AMP, Ampisilin; CTX, Sefotaksim



Şekil 5. Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi

(Ok işareti üremenin görülmediği en düşük konsantrasyonu yani MİK değerini göstermektedir)

3.5.5. β -laktamaz Aktivitesinin Belirlenmesi

1. İzolatların β -laktamaz aktivitelerinin belirlenmesi için Cefinase (Becton Dickinson, ABD) diski kullanıldı.

2. Pastör pipeti ile bir damla distile su kromojenik nitrosefin diski üzerine damlatıldıktan sonra üzerine steril öze ile koloniler alındı ve disk yüzeyine sürüldü.

3. Diskin üzerinde sarıdan kırmızıya renk değişimi olması pozitif reaksiyon, renk değişimi olmaması negatif reaksiyon olarak değerlendirildi. β -laktamaz aktivitesinin belirlenmesi Şekil 6'da gösterilmiştir.



Şekil 6. β -laktamaz aktivitesinin nitrosefin diskiyle belirlenmesi
sol-pozitif sonuç, sağ-negatif sonuç

3.6. Moleküler Yöntemlerle Direnç Genlerinin Araştırılması

β -laktamaz testi pozitif sonuç veren izolatlarda, PZR ile *bla*_{TEM-1} ve *bla*_{ROB-1} genlerinin varlığı araştırıldı. Disk difüzyon yöntemiyle BLNAR ve BLPACR olarak belirlenen izolatlarda ise *ftsI* geni PZR ile çoğaltılarak oluşan ürünlerde mutasyonları saptamak için dizi analizi yapıldı.

3.6.1. DNA İzolasyonu

1. 500 μ l Tris-EDTA (TE) tampon solüsyonu, steril mikrosantrifüj tüpleri içine konuldu.

2. Çikolata agarda 24 saat inkübe edilen taze saf kültürden steril öze ile 3-5 koloni alınarak tüplere aktarıldı ve tüpler vorteks ile karıştırıldı.

3. Tüpler, ısı bloğunda 10-15 dakika 100 °C'de bekletildi ve bu süre sonunda soğutuldu.

4. Tüpler 14.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.

5. Tüpteki süspansiyonun süpernatant kısmından 100 μ l otomatik pipet ile alınarak yeni bir tüpe aktarıldı ve kalıp DNA olarak kullanılmaya kadar -20 °C'de saklandı.

3.6.2. Kullanılan Primerler

H. influenzae için *bla*_{TEM-1}, *bla*_{ROB-1} ve *ftsI* genlerinin PZR ile araştırılmasında liyofilize haldeki primerler (Ella Biotech GmbH, Almanya) kullanım öncesinde nükleaz içermeyen steril distile su ile konsantrasyonu 10 pmol/μL olacak şekilde sulandırıldı. Kullanılan primer dizileri Tablo 14’te gösterilmiştir.

Tablo 14. Kullanılan primer dizileri (54, 88, 89)

Gen	Primer	Sekans (5'→3')	Ürün uzunluğu (bp)
<i>ftsI</i>	ftsI-F	5'-GTTAATGCGTAACCGTGCAATTACC-3'	705 (936–1640 bp)
	ftsI-R	5'-ACCACTAATGCATAACGAGGATC-3'	
<i>bla</i> _{TEM-1}	TEM-F	5'-TGGGTGCACGAGTGGGTTAC-3'	526 (321–846 bp)
	TEM-R	5'-TTATCCGCCTCCATCCAGTC-3'	
<i>bla</i> _{ROB-1}	ROB1-F	5'-ATCAGCCACACAAGCCACCT-3'	692 (419–1110 bp)
	ROB1-R	5'-GTTTGCGATTGGTATGCGA-3'	

bp (base pair): baz çifti

3.6.3. PZR Karışımı ve Amplifikasyon Koşulları

PZR karışımı için Taq PCR Master Mix (Qiagen, Almanya) kiti kullanıldı. Reaksiyon karışımları PZR kabini içerisinde, soğuk bloklar kullanılarak hazırlandı. PZR reaksiyonlarında pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere; *bla*_{TEM-1} pozitif suş Uzm. Dr. Hatice Yurttakal’dan (Prof. Dr. Bülent Bozdoğan’dan Uzm. Dr. Hatice Yurttakal’a) sağlandı. *bla*_{ROB-1} pozitif suş ise Prof. Dr. Osman Birol Özgümüş’ten (Dr. George A. Jacoby’dan Prof. Dr. Osman Birol Özgümüş’e) sağlandı. *ftsI* geni için pozitif kontrol olarak *H. influenzae* ATCC 49766 suşu kullanıldı. Negatif kontrol olarak ise reaksiyon karışımlarının hazırlanmasında kullanılan distile su kullanıldı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda, toplam 25 μl olarak hazırlanan bir reaksiyonluk PZR karışımı Tablo 15’te gösterilmiştir. Hazırlanan reaksiyon karışımı ısı döngü cihazında (Applied Biosystems, ABD) amplifiye edildi. Amplifikasyon koşulları Tablo 16’da gösterilmiştir.

Tablo 15. PZR karışımı

Komponent	Hacim
Master Mix	12,5 µl
Primerler (10 pmol/µL)	Primer-F 0,5 µl
	Primer-R 0,5 µl
DNA	2,5 µl
dH ₂ O	9 µl
Toplam reaksiyon hacmi	25 µl

Tablo 16. Amplifikasyon koşulları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Başlangıç Denatürasyonu	94 °C	5 dakika	1
Denatürasyon	94 °C	30 saniye	36
Bağlanma	<i>bla</i> _{TEM-1} ve <i>ftsI</i> için 58 °C, <i>bla</i> _{ROB-1} için 53 °C	30 saniye	
Uzama	72 °C	60 saniye	
Son Uzama	72 °C	7 dakika	1
Bekleme	4 °C	∞	

3.6.4. Agaroz Jel Elektroforezi

1. 10X Tris-Borik Asit-EDTA (TBE) tampon solüsyonu (New Bioscience, Türkiye), distile su ile 1/10 oranında sulandırılarak 1X TBE tampon solüsyonu hazırlandı.

2. Agaroz jel elektroforezi için %1,5'luk jel hazırlandı. Bu amaçla 100 mL 1X TBE tampon solüsyonu içerisinde 1,5 gr agaroz (Lonza, ABD) mikrodalga fırında ısıtılarak eritildi.

3. Agaroz solüsyonunun 55 °C'ye kadar soğuması beklendikten sonra, içerisine etidyum bromür solüsyonundan (Serva, Almanya) 10 µL eklendi ve elektroforez tepsinine dökülerek katılaşması beklendi.

4. Katılaştıktan sonra jelin içindeki tarak çıkarıldı ve yatay elektroforez tankına (Thermo Fisher Scientific, ABD) tepsi ile yerleştirildi. Jelin üzerini kaplayacak şekilde 1X TBE tampon solüsyonu konuldu.

5. İlk kuyucuğa 5 µL 100 bp DNA Ladder moleküler ağırlık belirteci (Thermo Fisher Scientific, ABD) yüklendi.

6. Diğer kuyucuklara ise PZR ürünlerinden 5 µL alınıp, 1 µL 6X Loading Dye (Solis Biodyne, Estonya) ile karıştırılıp yüklendi.

7. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra güç kaynağının (Consort bvba, Belçika) elektrotları tanka bağlandı ve 110 V lineer elektrik akımında 50 dakika boyunca elektroforez işlemi gerçekleştirildi.

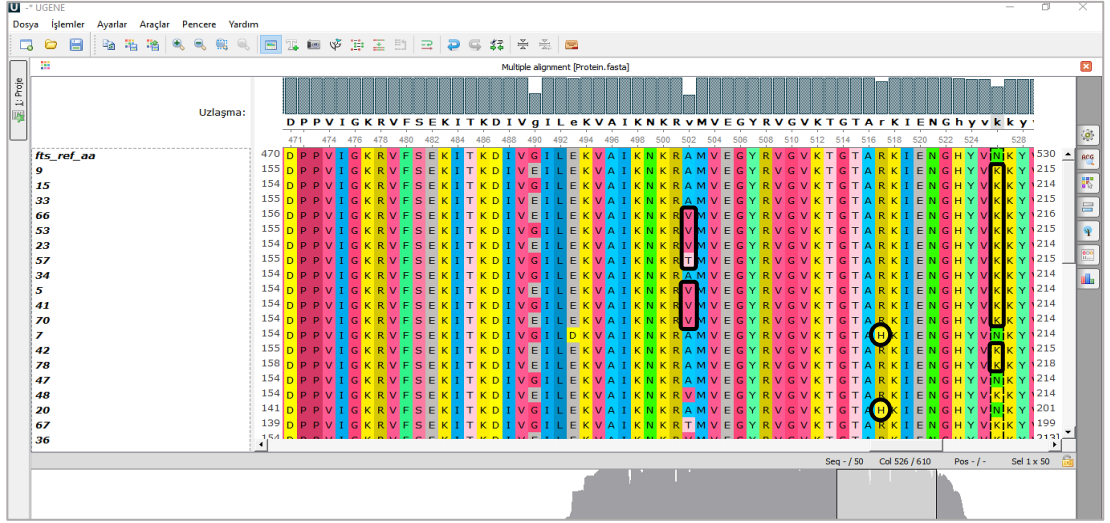
8. Elektroforez işleminden sonra jel görüntüleme cihazında (UVP BioSpectrum Imaging System, ABD) elde edilen bantlar incelendi.

3.6.5. Dizi Analizi

DNA saflaştırma ve Sanger dizi analizi için reaksiyon başına 20 µL PZR ürünü ve 5 µL primer, BM Labosis, Ankara'ya gönderildi. PZR ürünlerine dizi analizi, *ftsI* için ileri ve geri primerler kullanılarak çift yönlü olarak gerçekleştirildi. Elde edilen elektroferogramlar, Unipro UGENE yazılım programı (v 47.0) kullanılarak ve Genbank üzerinden indirilen ve referans dizi olan “*H. influenzae* Rd KW20” ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Sanger dizi analiziyle elde edilen bir elektroferogram örneği Şekil 7’de gösterilmiştir. Elektroferogram dalgalarının sol ve sağ uçlarından Phred skoru 30 değerinin altında olan nükleotidlerin kırılması, FASTA formatında nükleotid dizilerine ve ardından protein dizilerine dönüştürülmesi ve hizalama işlemleri sonrasında mutasyonların varlığı araştırıldı. Referans dizi, uzlaşma dizisi ve izolatlara ait dizilerin programdaki görüntüsüne ait örnek Şekil 8’de gösterilmiştir.



Şekil 7. UGENE programı kullanılarak görüntülenen bir elektroferogram örneği



Şekil 8. UGENE programı kullanılarak mutasyon varlığının araştırılması

4. BULGULAR

4.1. Çalışma İzolatları

Çalışmaya dahil edilen 150 izolatın ait olduğu klinik örneklerin dağılımı Tablo 17’de gösterilmiştir. Hastaların 60’ı (%40) kadın, 90’ı (%60) erkekti. Hastaların 78’i (%52) çocuk, 72’si (%48) erişkindi. Göğüs hastalıkları (%18,7) ve çocuk göğüs hastalıkları (%47,3) en fazla sayıda izolatın elde edildiği bölümlerdi. Hastaların yaş grubu dağılımı Tablo 18’de ve örneklerin gönderildiği bölümlerin dağılımı Tablo 19’da gösterilmiştir. Hastaların 34’ü (%22,7) kistik fibrozis hastasıydı. Hastaların 88’i (%58,7) ayaktan başvururken, 62’si (%41,3) yatan hastaydı. Yatan hastaların 18’i (%29) yoğun bakım hastasıydı. Örneklerin çoğu, 2021 yılına (%44,7) aitti. Örneklerin yıllara göre dağılımı Tablo 20’de gösterilmiştir.

Tablo 17. İzolatların ait olduğu klinik örneklerin dağılımı

Örnek	Balgam	BAL	DTA	Kan
n (%)	102 (68)	24 (16)	13 (8,7)	11 (7,3)

Tablo 18. Hastaların yaş grubu dağılımı

Yaş Grubu	n (%)
0-6 ay	-
6 ay-18 yaş	78 (52)
18-39 yaş	27 (18)
40-49 yaş	10 (6,7)
50-59 yaş	12 (8)
60-64 yaş	6 (4)
≥65 yaş	17 (11,3)

Tablo 19. Örneklerin gönderildiği bölümlerin dağılımı

Bölümler	n (%)
Acil Servis	5 (3,3)
Alerji ve İmmünoloji	2 (1,3)
Anestezi	2 (1,3)
Çocuk Cerrahi	1 (0,7)
Çocuk Göğüs Hastalıkları	71 (47,3)
Enfeksiyon Hastalıkları	1 (0,7)
Genel Cerrahi	1 (0,7)
Genel Dahiliye	4 (2,7)
Göğüs Hastalıkları	28 (18,7)
Kardiyoloji	2 (1,3)
Kardiyovasküler Cerrahi	1 (0,7)
Medikal Onkoloji	2 (1,3)
Nefroloji	2 (1,3)
Nöroloji	7 (4,7)
Nöroşirurji	5 (3,3)
Pediyatri	5 (3,3)
Pediyatrik Kemik İliği Transplantasyon Ünitesi	4 (2,7)
Pediyatrik Onkoloji	1 (0,7)
Yoğun Bakım İç Hastalıkları	6 (4)

Tablo 20. Örneklerin yıllara göre dağılımı

Yıl	2018	2019	2020	2021	2022
n (%)	6 (%4)	25 (%16,7)	8 (%5,3)	67 (%44,7)	44 (%29,3)

4.2. İzolatların Serolojik Tanımlanması

Polivalan antiserum ile 150 izolatın 43'ü (%28,7) a, b, c, d, e, f serotiplerinden birine karşı pozitif olarak değerlendirilirken, 107'si (%71,3) NTHi olarak belirlendi. Çalışmaya dahil edilen 11 kan kültüründe invazif enfeksiyon etkeni olarak izole edilen *H. influenzae* kökenlerinin sekizi NTHi olarak bulunurken, üçü tiplendirilebilen *H. influenzae* olarak tanımlandı.

4.3. Beta-laktamaz Varlığının Gösterilmesi

Kromojenik nitrosefin diskiyle 150 izolatın 18'i (%12) beta-laktamaz pozitif olarak bulunurken, 132'si (%88) beta-laktamaz negatif olarak bulundu.

4.4. Antibiyotik Duyarlılık Testi Sonuçları

4.4.1. EUCAST Disk Difüzyon ve Sıvı Mikrodilüsyon Testi Sonuçları

Disk difüzyon testine göre; izolatların 88'i (%58,7) benzilpenisilin G'ye, 53'ü (%35,3) ampisiline, 49'u (%32,7) amoksisilin-klavulanik aside, 58'i (%38,9) sefuroksime, ikisi (%1,3) sefotaksime, ikisi (%1,3) meropeneme, 10'u (%6,7) nalidiksik aside, üçü (%2) tetrasikline ve 56'sı (%37,6) trimetoprim-sülfametoksazole dirençli bulundu. İzolatların disk difüzyon yöntemiyle EUCAST kriterlerine göre duyarlılık sonuçları Tablo 21'de gösterilmiştir. Sıvı mikrodilüsyon testine göre; izolatların 36'sı (%24,3) ampisiline, yedisi (%4,7) sefotaksime dirençli bulundu. MİK₅₀, MİK₉₀ değerleri ve MİK aralıkları Tablo 22'de gösterilmiştir.

Tablo 21. İzolatların EUCAST kriterlerine göre disk difüzyon testi duyarlılık sonuçları

Antibiyotik	Duyarlı, n (%)	Dirençli, n (%)	Artmış Dozda Duyarlı, n (%)	Teknik Belirsizlik Alanı, n (%)
PCG	62 (41,3)	88 (58,7)		
AMP	97 (64,7)	53 (35,3)		
AMC	101 (67,3)	49 (32,7)		
CXM	74 (49,7)	58 (38,9)		17 (11,4)
CTX	144 (96,6)	2 (1,3)		3 (2)
MEM	147 (98,7)	2 (1,3)		
NAL	140 (93,3)	10 (6,7)		
TET	146 (98)	3 (2)		
SXT	90 (60,4)	56 (37,6)	3 (2)	

PCG, benzilpenisilin G; AMP, ampisilin; AMC, amoksisilin-klavulanik asit; CXM, sefuroksim; CTX, sefotaksim; MEM, meropenem; NAL, nalidiksik asit; TET, tetrasiklin; SXT, trimetoprim-sülfametoksazol

Tablo 22. MİK₅₀, MİK₉₀ değerleri ve MİK aralıkları

	MİK ₅₀ (µg/mL)	MİK ₉₀ (µg/mL)	MİK aralığı (µg/mL)
AMP (n=148)	1	>16	0,25 - >16
CTX (n=149)	0,03	0,06	0,008 - 0,25

Sıvı mikrodilüsyon testi referans olarak alındığında ampisilin duyarlılık testlerinde disk difüzyon yöntemiyle 19 büyük hata (BH) ve iki çok büyük hata (ÇBH) saptandı. Disk difüzyon yönteminin sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle kategorik uyumu %85,8 olarak bulundu. Sefotaksim duyarlılık testlerinde disk difüzyon yöntemiyle bir BH ve beş ÇBH saptandı. Disk difüzyon yönteminin sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle kategorik uyumu %95,9 olarak bulundu. Disk difüzyon yönteminin referans sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle karşılaştırılması Tablo 23'te gösterilmiştir. Antibiyotik duyarlılık test performanslarının değerlendirilmesinde ABD Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. Food and Drug Administration-FDA) kriterleri kullanıldı (90). Sefotaksim için kategorik uyum kabul edilebilir sınırlar (\geq %90) içindeyken ampisilin için bu değer düşük bulundu. Ampisilin için hem BH hem de ÇBH kabul edilebilir sınırların (BH için \leq %3, ÇBH için \leq %1,5) dışındayken, sefotaksim için ÇBH dikkat çekici bir farkla kabul edilebilir sınırların dışındadır.

Tablo 23. Disk difüzyon yöntemiyle elde edilen sonuçların referans sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması

Yöntem	Kategorik uyum, n (%)	Büyük hata, n (%)	Çok büyük hata, n (%)
AMP (n=148*) Disk difüzyon	127 (85,8)	19 (%17)	2 (%5,6)
CTX (n=145*) Disk difüzyon	139 (95,9)	1 (%0,7)	5 (%3,3)

* Her iki yöntem için de duyarlılık sonucu olan izolatların sayısı. CTX için zon çapı 25 ve 26 mm olup duyarlılık kategorisi olarak teknik belirsizlik alanı içinde olan izolatlar karşılaştırmaya dahil edilmemiştir.

Tiplendirilebilen *H. influenzae* izolatları ile NTHi izolatlarının direnç oranları karşılaştırıldığında iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. NTHi izolatlarında ampisilin, amoksisilin-klavulanik asit, sefotaksim, meropenem, tetrasiklin ve trimetoprim-sülfametoksazole direnç oranı daha yüksek bulundu. Tiplenirilebilen *H. influenzae* izolatları ile NTHi izolatlarının direnç oranları Tablo 24'te verilmiştir.

Tablo 24. Tiplendirilebilen *H. influenzae* izolatları ile NTHi izolatlarının direnç oranlarının karşılaştırması

Antibiyotik	Dirençli, n (%)		p değeri
	Tiplendirilebilen <i>H. influenzae</i> (n=43)	NTHi (n=107)	
PCG	26 (%60,5)	62 (%58)	0,78
AMP	14 (%32,6)	39 (%36,4)	0,65
AMC	14 (%32,6)	35 (%32,7)	0,99
CXM	17 (%39,5)	41 (%38,3)	0,89
CTX	0 (0)	2 (%1,9)	0,37
MEM	0 (0)	2 (%1,9)	0,37
NAL	4 (%9,3)	6 (%5,6)	0,41
TET	0 (0)	3 (%2,8)	0,27
SXT	13 (%30,2)	43 (%40,2)	0,25

4.4.2. CLSI ve EUCAST Kriterleri Doğrultusunda Antibiyotik Duyarlılık Profillerinin Karşılaştırılması

İzolatların disk difüzyon yöntemiyle CLSI sınır değerlerine göre önceden elde edilmiş olan antibiyotik duyarlılık sonuçları, aynı izolatların EUCAST kriterleri doğrultusunda elde edilen sonuçları ile karşılaştırıldı. Örneğin; çalışma kapsamında ampisilin için 150 izolatın EUCAST kriterleri doğrultusunda sonuçları mevcutken, Laboratuvar Bilgi Yönetim Sisteminde bu izolatlardan 146'sının CLSI sonuçları elde edilebildi ve bu nedenle karşılaştırma 146 izolat üzerinden yapıldı. İki kılavuzun karşılaştırması Tablo 25'te gösterilmiştir. Sadece duyarlı ve dirençli kategorileri değerlendirildiğinde, ampisilin ve amoksisilin-klavulanik asit için direnç oranı EUCAST'e göre yapılan antibiyotik duyarlılık testlerinde daha yüksek bulunurken, tetrasiklin ve trimetoprim-sülfametoksazol için direnç oranının CLSI'a göre yapılan duyarlılık testlerinde daha yüksek olduğu görüldü. Sefalosporinler açısından sefotaksim duyarlılık sonuçları benzerken, sefuroksim için direnç oranı EUCAST'e göre yapılan antibiyotik duyarlılık testlerinde dikkat çekici bir oranda daha yüksek bulundu. Meropenem için iki kılavuz arasındaki duyarlılık sonuçları benzerdi.

Tablo 25. EUCAST ve CLSI disk difüzyon yöntemiyle belirlenen antibiyotik duyarlılık sonuçlarının karşılaştırılması

Antibiyotik	EUCAST	CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST	CLSI	EUCAST	Toplam izolat sayısı
	Duyarlı, n (%)		Dirençli, n (%)		Artmış Dozda Duyarlı, n(%)	Orta Duyarlı, n (%)	Teknik Belirsizlik Alanı, n (%)	
AMP	96 (65,8)	87 (59,6)	50 (34,2)	45 (30,8)		14 (9,6)		146
AMC	100 (69)	117 (80,7)	45 (31)	28 (19,3)				145
CXM	72 (53,7)	128 (95,5)	46 (34,3)	1 (0,7)		5 (3,7)	16 (11,9)	134
CTX	103 (97,2)	106 (100)	1 (0,9)	0 (0)			2 (1,9)	106
MEM	122 (100)	120 (100)	0 (0)	-*				122
TET	50 (98)	37 (72,5)	1 (2)	5 (9,8)		9 (17,6)		51
SXT	87 (60,8)	86 (60,1)	53 (37,1)	56 (39,2)	3 (2,1)	1 (0,7)		143

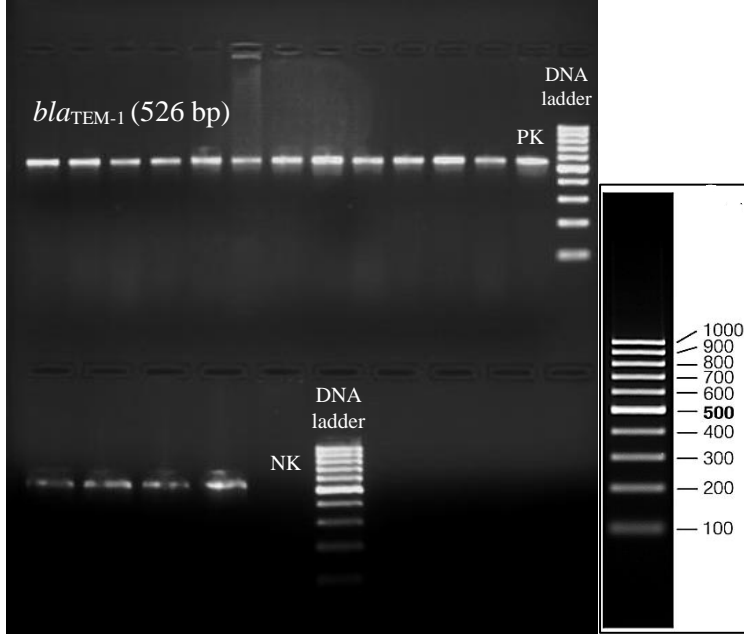
PCG ve NAL için CLSI'da sınır değeri bulunmaması nedeniyle tabloda yer verilmemiştir.

*İki suşun zon çapı 15 mm olup CLSI'da herhangi bir duyarlılık kategorisine girmemektedir.

4.5. Beta-laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmalarının Belirlenmesi

4.5.1. *bla*_{TEM-1} ve *bla*_{ROB-1} Direnç Genlerinin Varlığı

Nitrosefin diskiyle beta-laktamazı pozitif saptanan ve disk difüzyon testi ile ampisiline dirençli olan 18 izolatta *bla*_{TEM-1} ve *bla*_{ROB-1} direnç genlerinin varlığı PZR ile araştırıldı. İzolatların tümünde *bla*_{TEM-1} genine ait primerler ile 526 bp büyüklüğünde bant saptandı. *bla*_{TEM-1} geni pozitif bulunan izolatlara ait jel görüntüsü Şekil 9'da gösterilmiştir. İzolatların hiçbirinde, *bla*_{ROB-1} genine ait primerler ile 692 bp büyüklüğünde bant görülmedi. *bla*_{ROB-1} geni negatif bulunan izolatlara ait jel görüntüsü Şekil 10'da gösterilmiştir.



Şekil 9. PZR ile *bla*_{TEM-1} geni pozitif bulunan izolatlara ait jel görüntüsü

PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol

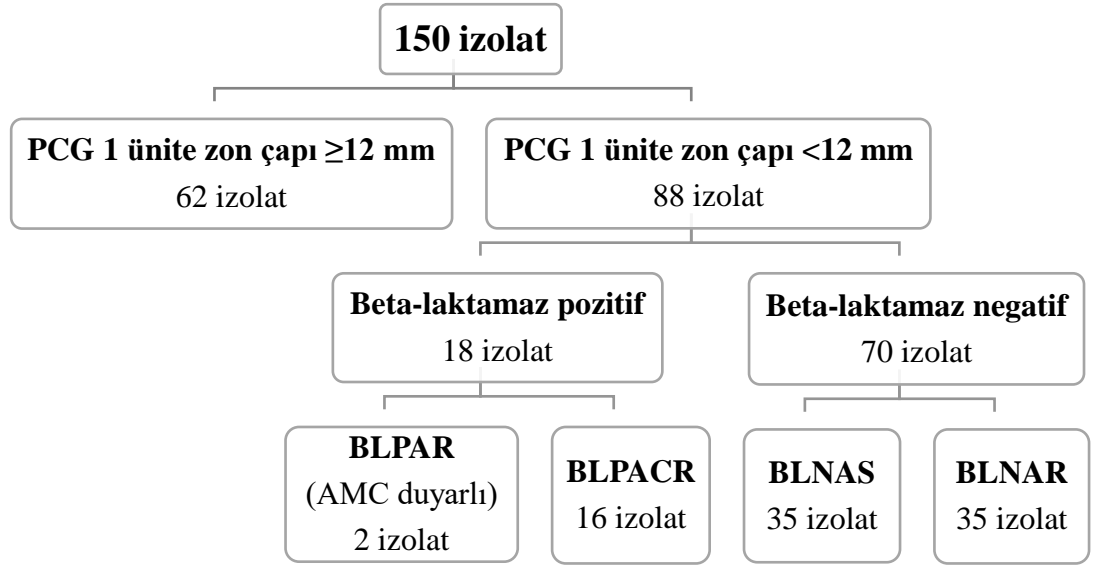


Şekil 10. PZR ile *bla*_{ROB-1} geni negatif bulunan izolatlara ait jel görüntüsü

PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol

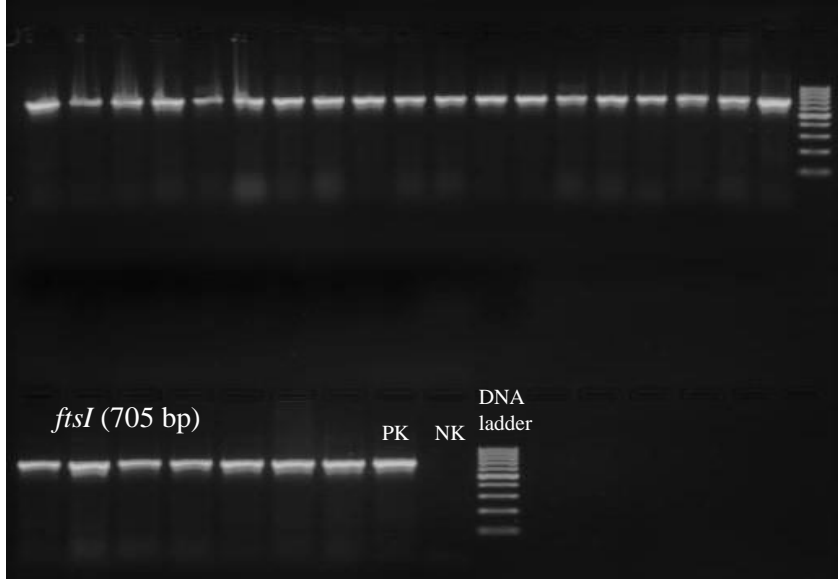
4.5.2. *ftsI* Gen Mutasyonları

EUCAST'in benzilpenisilin G tarama testi akış şemasına göre, benzilpenisilin G zon çapı 12 mm'den küçük olan 88 izolatın 35'i BLNAS, 35'i BLNAR, ikisi BLPAR ve 16'sı BLPACR olarak fenotipik olarak sınıflandırıldı. İzolatların akış şeması gereğince fenotipik olarak sınıflandırılması Şekil 11'de gösterilmiştir. BLNAR (n=35) ve BLPACR (n=16) izolatlarına *ftsI* gen amplifikasyonu için PZR yapıldı. *ftsI* genine ait primerler ile 51 izolatta 705 bp büyüklüğünde bant saptandı. *ftsI* gen amplifikasyonu yapılan izolatlara ait jel görüntüsü Şekil 12'de gösterilmiştir.



Şekil 11. İzolatların EUCAST akış şemasına göre fenotipik olarak sınıflandırılması

CLSI sonucu olan izolatlar dikkate alındığında, CLSI kriterlerine göre 23 izolat BLNAR, altı izolat BLPACR olarak tanımlandı. İki kılavuzun sonuçları karşılaştırıldığında her ikisi de 15 izolatu BLNAR olarak tanımlarken, CLSI EUCAST'ten farklı olarak sekiz izolatu ve EUCAST CLSI'dan farklı olarak 18 izolatu BLNAR olarak tanımladı. İki kılavuz da altı suşu BLPACR olarak tanımlarken, EUCAST CLSI'dan farklı olarak dokuz izolatu daha BLPACR olarak tanımladı. Bu karşılaştırmalara ampisilin için CLSI sonucu olmayan dört izolat (EUCAST'e göre iki BLNAR izolat, bir BLPACR izolat ve bir BLNAS izolat) dahil edilmedi.



Şekil 12. *ftsI* gen amplifikasyonu yapılan izolatlara ait jel görüntüsü

PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol

Dizi analizi, *ftsI* geni PZR ile çoğaltılan 51 izolattan 49'una yapıldı. Elde edilen dizilerde mutasyonların varlığı *H. influenzae* Rd KW20 suşu ile karşılaştırılarak araştırıldı. Dört izolatta bir mutasyon görülmedi ve genotipik sınıflandırmaya dahil edilmedi. Dizi analizinde 18 pozisyonda toplamda 19 amino asit değişikliği saptandı.

En sık görülen amino asit değişiklikleri; D350N, M377I, G490E, A502V ve N526K mutasyonlarıydı. Ubukata (51), Dabernat (54), Skaare (42) ve Garcia-Cobos ve ark.'nın (55) *ftsI* mutasyonlarına göre oluşturduğu genotipik sınıflandırmalara göre grup I'de bir izolat, grup IIa'da dokuz izolat, grup IIb'de 25 izolat, grup IIc'de iki izolat, grup II'de üç izolat, grup III benzerinde dört izolat, grup III+'da bir izolat vardı. Direnç mutasyonu görülen 34 BLNAR izolatın 31'i düşük düzey dirençli BLNAR (grup I ve II) olarak bulunurken, üçü yüksek düzey dirençli (grup III) olarak bulundu. Direnç mutasyonu görülen 11 BLPACR izolatın dokuzu düşük düzey dirençli BLPACR olarak bulunurken, ikisi yüksek düzey dirençli BLPACR olarak bulundu. Sefotaksim MİK'lerinin artışı ile karakterize, grup III benzeri ve grup III+'da bulunan toplam beş izolatın sefotaksim MİK değerlerine bakıldığında dört izolatın MİK değerinin 0,25 µg/ml olduğu ve bir izolatın MİK değerinin 0,125 µg/ml olduğu gözlenmiştir. Grup III benzeri bir izolatta diğerlerinden farklı olarak E493D mutasyonu belirlendi. Bu izolatın ampisilin MİK değeri 4 µg/ml, sefotaksim 0,25 µg/ml olarak izlendi. *ftsI* mutasyonu saptanmayan dört izolatın tümü BLPACR grubundaydı ve hem disk difüzyon hem de

											BLPACR						
5	N						I		E	V	K			Iib	>16	0,03	
9	N								E			K	S	Iia	>16	0,06	
33	N				N	I	T	F	E			K	S	III+	>16	0,25	
41	N						I				V	K		Iib	>16	0,03	
42	N								E			K	S	Iia	>16	0,06	
85											V	H		I	>16	0,03	
95									E			K	S	Iia	>16	0,06	
97									E			K	S	Iia	>16	0,06	
101												K		Iia	>16	0,06	
117	N				N	I	T					H		S	III benzeri	>16	0,125
121	R	N	G	T	V		I		E	V	K			Iib	>16	0,008	

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

4.5.3. BLNAS, BLNAR, BLPAR ve BLPACR Gruplarının Beta-laktam Grubu Antibiyotiklere Duyarlılık Profillerinin Karşılaştırılması

Sefuroksime direnç oranı BLNAR grubunda en yüksek bulunurken, sefotaksime direnç oranı BLPACR grubunda en yüksek saptandı. Meropenem için en yüksek direnç oranı BLPACR grubunda izlendi. Grupların EUCAST disk difüzyon sonuçlarına göre beta-laktam grubu antibiyotiklere duyarlılık profillerinin karşılaştırılması Tablo 27'de verilmiştir.

Tablo 27. BLNAS, BLNAR, BLPAR ve BLPACR gruplarının EUCAST disk difüzyon sonuçlarına göre beta-laktam grubu antibiyotiklere duyarlılık profillerinin karşılaştırılması

İzolatlar (n)	CXM			CTX			MEM	
	Duyarlı, n (%)	Artmış Dozda Duyarlı, n (%)	Dirençli, n (%)	Duyarlı, n (%)	Artmış Dozda Duyarlı, n (%)	Dirençli, n (%)	Duyarlı, n (%)	Dirençli, n (%)
BLNAS (35)	13 (37,1)	8 (22,8)	14 (40)	34 (97,1)	1 (2,8)	0 (0)	35 (100)	0 (0)
BLNAR (35)	0 (0)	2 (5,7)	33 (94,3)	34 (97,1)	0 (0)	1 (2,8)	34 (97,1)	1 (2,8)
BLPAR (2)	1 (50)	1 (50)	0 (0)	2 (100)	0 (0)	0 (0)	2 (100)	0 (0)
BLPACR (16)	4 (25)	2 (12,5)	10 (62,5)	13 (81,2)	2 (12,5)	1 (6,3)	15 (93,8)	1 (6,2)

4.5.4. BLNAS, BLNAR, BLPAR ve BLPACR Gruplarının Fenotipik ve Genotipik Test Sonuçlarının Karşılaştırılması

İzolatların beta-laktam antibiyotikler açısından fenotipik ve genotipik test sonuçları ve sınıflandırılması Tablo 28’de gösterilmiştir.

Tablo 28. İzolatların beta-laktam antibiyotikler açısından fenotipik ve genotipik test sonuçları ve sınıflandırılması

İzolat sayısı	Nitrosefin testi	AMP DD/SMD	AMC DD	<i>bla</i> TEM-1	<i>ftsI</i> mutasyonu	DD'ye göre gruplar
32	-	S/S	S	X	X	BLNAS
1	-	S/-	S	X	X	BLNAS
2	-	S/R	S	X	X	BLNAS
1	-	R/R	R	X	N526K	BLNAR Grup IIa
3	-	R/S	R	X	N526K	BLNAR Grup IIa
9	-	R/R	R	X	N526K + A502V	BLNAR Grup IIb
13	-	R/S	12 izolat R, 1 izolat S	X	N526K + A502V	BLNAR Grup IIb
2	-	R/R	R	X	N526K + A502T	BLNAR Grup IIc
3	-	R/S	R	X	N526K + I449V	BLNAR Grup IId
3	-	R/R	2 izolat R, 1 izolat S	X	M377I + S385T + R517H	BLNAR Grup III benzeri
2	+	R/R	S	+	X	BLPAR
1	+	R/R	R	+	R517H	BLPACR Grup I
5	+	R/R	R	+	N526K	BLPACR Grup IIa
3	+	R/R	R	+	N526K + A502V	BLPACR Grup IIb
1	+	R/R	R	+	M377I + S385T + R517H	BLPACR Grup III benzeri
1	+	R/R	R	+	M377I + S385T + L389F + N526K	BLPACR Grup III+

Dizi analizi yapılmayan iki izolat ve mutasyon saptanmayan dört izolat tabloya dahil edilmemiştir. AMP: Ampisilin, DD: Disk Difüzyon, SMD: Sıvı Mikrodilüsyon S: Duyarlı, R: Dirençli, +: pozitif, -: negatif, X: Yapılmadı

5. TARTIŞMA

H. influenzae, insan nazofarenksinde yaygın olarak bulunan, sinüzit ve otitis media gibi invazif olmayan üst solunum yolu enfeksiyonlarının yanı sıra sepsis ve menenjit gibi ciddi invazif hastalıklara da neden olabilen bir bakteridir.

Hib tarihsel olarak invazif hastalığa neden olan en yaygın serotipken, Hib konjuge aşularının çoğu ülkede ulusal çocukluk aşılama programında başarılı bir şekilde uygulanmasıyla birlikte artık nadir olarak görülmektedir. Ceyhan ve ark. (91) tarafından 2020 yılında yayımlanan çok merkezli bir sürveyans çalışmasında, Hib aşısının uygulanmasından sonra Hib ile ilişkili menenjit vakalarının %20,6'dan (2005-2006 yılları) %2,4'e (2015-2018 yılları) düştüğü gösterilmiştir. Dünya genelinde artık NTHi, invazif *H. influenzae* enfeksiyonlarının en yaygın nedeni olup çok az vaka ise esas olarak f serotipi ve ardından e serotipi olmak üzere kapsüllü *H. influenzae* kökenlerine bağlıdır. Yaklaşık 10 yıl öncesine kadar, *H. influenzae* serotip a'ya bağlı invazif hastalık, Kuzey Amerika ve Avustralya'daki yerli popülasyonlar dışında son derece nadirken son zamanlarda a serotipine bağlı invazif hastalık raporları da giderek artmaktadır (92). İngiltere'de 2008-2021 yılları arasını kapsayan 14 yıllık bir sürveyans çalışmasının verilerine göre, 7002 *H. influenzae* izolatının %82,4'ü NTHi, %3,2'si serotip b ve %14,4'ü diğer serotipler olarak tanımlanmıştır (92). İtalya'da 2017-2021 yıllarını kapsayan ve 392 adet invazif *H. influenzae* izolatının (kan ve BOS örnekleri) dahil edildiği bir çalışmada izolatların %77,8'i NTHi, %12,5'i Hib, %7,9'u Hif, %1'i Hia ve %0,8'i Hie olarak bulunmuştur (93).

Ülkemizde 2016 yılında Budak ve ark.'nın (94) yaptığı çalışmada 139 *H.influenzae* izolatının (116 balgam, 17 BAL, 3 DTA, 1 kateter ve 2 püy örneği) %75,5'i NTHi, %13,7'si Hib, %6,5'i Hia, % 1,4'ü Hid, % 1,4'ü Hif, %0,7'si Hic ve %0,7'si Hie olarak saptanmıştır. 2022 yılında Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti HACEK Çalışma Grubu tarafından yayımlanan *H. influenzae* çalıştay raporunda da aşılama programına bağlı olarak Hib prevalansının azaldığı, buna karşın *H. influenzae* serotip a ve NTHi prevalansının arttığı ifade edilmiştir (95). Çalışmamızda da benzer şekilde izolatların büyük çoğunluğu (%71,3) NTHi olarak bulunurken, çalışmamızdaki bütçe kısıtlılığı nedeniyle kapsüllü *H. influenzae* izolatlarının serotipleri ayrı ayrı belirlenememiştir. Çalışmamıza dahil edilen 11 kan örneğinde invazif enfeksiyon etkeni olarak izole edilen *H. influenzae* kökenlerinin sekizi NTHi olarak bulunurken, üçü

tiplendirilebilen *H. influenzae* olarak tanımlanmıştır. Çalışmamıza dahil edilen izolatlar Gram boyama ile klinik örneklerin değerlendirilmesi ve kültürdeki üreme durumuna göre enfeksiyon etkeni olarak kabul edilen izolatlar olmakla birlikte, kan dışındaki izolatların invazif enfeksiyon etkeni oldukları kesin olarak söylenemez. Hib dışındaki diğer serotiplerin ve NTHi kökenlerinin özellikle çocuklar, bağışıklığı baskılanmış kişiler ve yaşlılar olmak üzere invazif enfeksiyonlara neden olduğu görülmektedir. Bu durum, Hib aşılmasının düzenli olarak uygulanmasının yanı sıra diğer serotipler ve NTHi aşılarının geliştirilmesi gerekliliğini de ortaya koymaktadır.

H. influenzae enfeksiyonlarının epidemiyolojisinde aşuya bağlı değişiklikler ortaya çıkarken son yıllarda direnç epidemiyolojisinde de değişimler rapor edilmektedir (70, 96). Bu değişikliklerin bir nedeni, izolatların serotip dağılımındaki değişim; diğer bir nedeni de farklı antibiyotik duyarlılık yöntemleri ve değerlendirme kriterleri kullanılması olarak ileri sürülmektedir. EUCAST ve CLSI tarafından önerilen kriterlere göre belirlenen antibiyotik duyarlılık sonuçları, *H. influenzae* direnç epidemiyolojisinde farklılıklara yol açmakta ve buna bağlı olarak da tedavi protokolleri yakından etkilenmektedir. Ülkemizde rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında *H. influenzae* klinik izolatlarında antibiyotik direnci farklı duyarlılık yöntemleri ve değerlendirme kriterleri kullanılarak çalışılmaktadır. Literatürde *H. influenzae* izolatlarında özellikle beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı saptanan direnç verilerinde CLSI ve EUCAST kriterleri kullanımının farklılıklara yol açtığını gösteren az sayıda çalışma bulunmaktadır (43, 97). Çalışmamızda CLSI ve EUCAST kriterlerinin *H. influenzae* direnç oranlarına ne ölçüde yansıdığı karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir.

H. influenzae'da beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç, bir beta-laktamaz üretimine veya beta-laktamaz negatif ampisiline dirençli (BLNAR) suşlarda olduğu gibi PBP3 transpeptidaz enzimini kodlayan *ftsI* geninde oluşan mutasyonlar sonucunda beta-laktamlara karşı afinitenin azalmasına bağlıdır. Suşların çok küçük bir kısmı her iki mekanizmaya da sahiptir ve beta-laktamaz pozitif amoksisilin-klavulanik aside dirençli (BLPACR) suşlar olarak adlandırılırlar. EUCAST'ın beta-laktam direnç mekanizmalarının saptanmasında benzilpenisilin G tarama testinin kullanımına yönelik oluşturduğu akış şemasına göre, hem benzilpenisilin G (1 ünite) ve amoksisilin-klavulanik asit disk difüzyon sonuçları hem de nitrosefin diski kullanılarak elde edilen beta-laktamaz test sonuçları birlikte dikkate alınmalıdır (35). Ancak CLSI'nin *H.*

influenzae'da beta-laktam direnç mekanizmalarının saptanmasına yönelik kapsamlı bir önerisi bulunmamaktadır. CLSI *H. influenzae* izolatlarının çoğunda ampisilin ve amoksisilin direncine sebep olarak TEM-tipi beta-laktamaz varlığını vurgulamaktadır ve buna yönelik olarak da beta-laktamaz testinin ampisilin ve amoksisilin direncini saptamada hızlı bir araç olarak kullanılabileceğini ifade etmektedir (36). Ancak sadece nitrosetin diskiyle elde edilen sonuçlar enzimatik aracılı olmayan direnç mekanizmalarını aydınlatmada yetersiz kalmaktadır. Nitekim CLSI kılavuzlarında da negatif beta-laktamaz test sonucunun diğer mekanizmalardan kaynaklanan direnci dışlayamayacağı belirtilmektedir (36).

Ülkemiz klinik izolatların antibiyotik duyarlılık sonuçlarının değerlendirilmesinde 2015 yılından itibaren kademeli olarak CLSI kriterlerinden EUCAST kriterlerinin kullanılmasına geçmiştir. CLSI ve EUCAST arasında duyarlılık test yöntemleri, besiyeri içerikleri ve duyarlılık sınır değerlerindeki farklılıklar nedeniyle, belirli bakterilerde bazı antibiyotikler için farklı duyarlılık sonuçları saptanmaktadır. Halen, ülkemizde birçok merkez *H. influenzae* izolatları için duyarlılık sonuçlarını CLSI kriterlerine göre vermektedir. Bu durumun nedeni EUCAST tarafından önerilen MH-F agar ve MH-F sıvı besiyerinin sağlanmasında ya da hazırlanmasında yaşanan güçlükler olabilir. MH-F agar besiyerini petride kullanıma hazır olarak ticari bir şekilde sağlayan yerel firma sayısı oldukça azdır ve firmalar tarafından sağlanan besiyerlerinde *H. influenzae* ATCC 49766 suşu yeterli üreme göstermemektedir. Bu besiyeri global üretici firmalardan temin edilmek istendiğinde ise yurtdışından transfer sürecindeki zaman kaybı nedeniyle iki ay gibi kısa bir raf ömrü olan besiyerleri kalite kontrolden geçememektedir. Ayrıca bu transfer sürecinin soğuk zincir şartlarına uygun olarak yapılmasını sağlamak da oldukça zordur. Güncel piyasa araştırmamız dahilinde, MH-F sıvı besiyerini tüpte kullanıma hazır olarak ticari bir şekilde sağlayan yerel firma bulunmamıştır. Global üreticilerin sağladığı besiyerlerinin maliyeti ise rutin laboratuvarlarda sürdürülebilir şekilde kullanılamayacak kadar yüksektir. Bu nedenlerle bu çalışmada kullanılan MH-F agar ve sıvı besiyeri kendi laboratuvarımızda hazırlanmıştır. Laboratuvar yapımı besiyerini hazırlamada en önemli sorun at kanı temini konusundadır. Ülkemizde at kanı sağlayan ticari firma sayısı oldukça azdır ve sağlayanların çoğu da defibrinasyon işlemini mekanik yöntemle değil sodyum sitrat katkı maddesini ekleyerek yapmaktadır ki bu durum EUCAST besiyeri hazırlama rehberindeki önerilere aykırı bir uygulamadır.

Sonuç olarak EUCAST koşullarını *H. influenzae* duyarlılık testleri için sağlamak güç olmakla birlikte, kurallara uygun olarak hazırlanan laboratuvar yapımı besiyerlerinin standartları sağlaması koşuluyla kullanımının özendirilmesi gerektiği söylenebilir.

Çalışmamızda EUCAST kriterlerine göre uygulanan disk difüzyon testine göre; izolatların %58,7'si benzilpenisilin G'ye, %35,3'ü ampisiline, %32,7'si amoksisilin-klavulanik aside, %38,9'u sefuroksime, %1,3'ü sefotaksime, %1,3'ü meropeneme, %6,7'si nalidiksik aside, %2'si tetrasikline ve %37,6'sı trimetoprim-sülfametoksazole dirençli bulundu. EUCAST kriterlerine göre uygulanan sıvı mikrodilüsyon testine göre; izolatların %24,3'ü ampisiline, %4,7'si sefotaksime dirençli bulundu. Ampisilin duyarlılık testlerinde disk difüzyon yönteminin sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle kategorik uyumu %85,8 olarak bulundu. Sefotaksim duyarlılık testlerinde disk difüzyon yönteminin sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle kategorik uyumu %95,9 olarak bulundu. Sefotaksim için kategorik uyum kabul edilebilir sınırlar içindeyken ampisilin için düşük bulunmuştur. EUCAST ve CLSI disk difüzyon sonuçları karşılaştırıldığında; ampisilin ve amoksisilin-klavulanik asit için direnç oranı EUCAST'e göre yapılan antibiyotik duyarlılık testlerinde daha yüksek bulunurken, tetrasiklin ve trimetoprim-sülfametoksazol için direnç oranının CLSI'a göre yapılan duyarlılık testlerinde daha yüksek olduğu görüldü. Meropenem için iki kılavuz arasındaki duyarlılık sonuçları benzerdi. Sefalosporinler açısından sefotaksim duyarlılık sonuçları benzerken, sefuroksim için direnç oranı EUCAST'e göre yapılan antibiyotik duyarlılık testlerinde dikkat çekici bir oranda daha yüksek bulundu. BLNAS izolatların %40'nın sefuroksime dirençli olması bu izolatlarda olası bir *ftsI* mutasyonuna bağlı olabilir, ancak çalışmamızda *ftsI* mutasyon analizi sadece BLNAR ve BLPACR izolatlarına yönelik olarak gerçekleştirildiğinden bu durum kanıtlanamamıştır. Literatürde özellikle 357. ve 532. pozisyonlardaki amino asit değişikliklerinin sefuroksim direnciyle ilişkilendirildiği ve ayrıca sefuroksimin BLNAR saptamada ampisilinden daha iyi bir belirteç olduğu ileri sürülmektedir (80). Çalışmamızda 357. ve 532. pozisyonlarda amino asit değişikliklerine sahip olan dört izolat disk difüzyon yöntemiyle sefuroksime dirençli olarak bulunmuştur. BLNAS izolatların da dahil edildiği daha geniş kapsamlı çalışmalarda sefuroksimin belirteç olarak değerlendirilmesi *H. influenzae* izolatlarında beta-laktam direncini belirlemede yol gösterici olabilir.

Antibiyotik kullanım verilerinin sunulduğu, DSÖ Avrupa Bölge Ofisi koordinatörlüğünde yapılan çok merkezli bir çalışmanın sonuçlarına göre Türkiye total olarak sefalosporinlerin ve özellikle 2. kuşak sefalosporinlerden sefuroksimin en yüksek oranda reçetelendiği ülke konumundadır (98). Çalışmamızda saptanan yüksek sefuroksim direncinin ve artan sefotaksim MİK değerlerinin ülkemizdeki yüksek sefalosporin kullanım oranına bağlı olarak dirençli *ftsI* mutantlarının seçiminden kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Bu durum, enzimatik olmayan direnç mekanizmasına sahip izolatların artmasıyla sonuçlanmaktadır.

Ülkemizde *H. influenzae* antibiyotik duyarlılığı için EUCAST kriterlerine göre değerlendirme yapılan çalışmalar nadirdir. Çaycı ve ark.nın (99) 2019 yılında 226 *H. influenzae* izolatını EUCAST kriterlerine göre disk difüzyon yöntemiyle değerlendirdiği çalışmada, izolatların %35'i ampisiline, %3'ü amoksisilin-klavulanik aside, %33'ü sefotaksime ve %4'ü siprofloksasine dirençli bulunmuştur. Aynı çalışmada izolatların %31'i beta-laktamaz pozitif olarak bulunmuştur. 2022 yılında Erciyes Üniversitesinde Yurttakal'ın (100) yaptığı bir çalışmada 49 *H. influenzae* izolatı EUCAST kriterlerine göre disk difüzyon yöntemiyle değerlendirilmiş ve izolatların %63,2'si benzilpenisilin G'ye, %44,8'i ampisiline, %20,4'ü sefotaksime, %16,3'ü nalidiksik aside, %28,5'i trimetoprim-sülfametoksazole dirençli bulunurken, amoksisilin-klavulanik asit, meropenem ve tetrasikline karşı direnç saptanmamıştır. Aynı çalışmada izolatların antibiyotik duyarlılık durumları sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle de değerlendirilmiş ve izolatların %28,5'i ampisiline, %2'si amoksisilin-klavulanik aside, %12,2'si siprofloksasine dirençli bulunurken, tetrasikline karşı direnç saptanmamıştır. Trimetoprim-sülfametoksazol için duyarlılık durumu ise gradiyent şerit yöntemiyle belirlenmiş ve izolatların %32,6'sı dirençli bulunmuştur. İzolatların %8,2'si beta-laktamaz pozitif olarak bulunmuştur. Bu çalışmada disk difüzyon testi ile sıvı mikrodilüsyon/gradiyent şerit sonuçları genel olarak uyumlu olmakla birlikte, ampisilin duyarlılık sonuçlarında yöntemler arası farklılıklar gözlenmiştir. Benzer şekilde çalışmamızda da ampisilin duyarlılık sonuçlarında yöntemler arasındaki fark dikkat çekicidir. Çalışmamızda disk difüzyon yöntemiyle izolatların %35,3'ü ampisiline dirençli saptanırken, sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle %24,3'ü dirençli bulundu. *ftsI* geni dizi analizi sonucu olan 49 izolatın dördünde bir mutasyon saptanmadı. Bu dört izolatın tümü BLPACR grubundaydı ve hem disk difüzyon hem de sıvı mikrodilüsyon

yöntemiyle ampisiline dirençliydi. Bu durum bu izolatlarda beta-laktamazla beraber AcrAB atım pompasının aşırı ekspresyonuna bağlı olabilir. Ayrıca çalışmamızda BLNAR ve BLPACR fenotipik grupları disk difüzyon sonuçlarına göre belirlendiği için bu dört izolatın amoksisilin-klavulanik asit disk difüzyon sonuçlarının tekrarlanması ya da sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle değerlendirilmesi uygun olacaktır.

Mutasyon saptanan 34 BLNAR izolatın sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle 15'i ampisiline dirençliyken, disk difüzyon yöntemiyle tümü ampisiline dirençliydi. Bu sonuçlara göre disk difüzyon yönteminin, sıvı mikrodilüsyon yöntemine göre direnci daha iyi saptadığı söylenebilir. Bu noktada sıvı mikrodilüsyon sonuçlarının okunmasındaki güçlüklerin de doğru MİK değerini belirlemede etkili olabileceği göz önünde tutulmalıdır. Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle ampisiline duyarlı olarak bulunan 19 BLNAR izolatın tümünün MİK değeri 1 µg/ml olup EUCAST'in önerdiği klinik sınır değer (1 µg/mL) duyarlı-dirençli ayrımını yapmakta yetersiz kaldığı sonucuna varılmıştır. Mutasyon saptanan 11 BLPACR izolatının ise tümü hem sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle hem de disk difüzyon yöntemiyle ampisiline dirençli olarak bulunmuştur. 2022 yılında İstanbul Üniversitesinde Miralizade'nin (101) yaptığı bir çalışmada ise 60 *H. influenzae* izolatı EUCAST kriterlerine göre disk difüzyon yöntemiyle değerlendirilmiş ve izolatların %10'u ampisiline, %13,3'ü sefuroksime, %8,3'ü nalidiksik aside, %6,7'si tetrasikline dirençli bulunurken, amoksisilin-klavulanik aside karşı direnç saptanmamıştır. Aynı çalışmada izolatların %6,7'si beta-laktamaz pozitif olarak bulunmuştur.

Ülkemizde *H. influenzae* izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarıyla ilgili çalışmalarda ağırlıklı olarak CLSI kriterlerinin kullanıldığı görülmektedir. 2020 yılında Gür ve Hazirolan'nın (102) yaptığı çalışmada, 480 *H. influenzae* izolatı CLSI kriterlerine göre disk difüzyon yöntemi kullanılarak değerlendirilmiş ve izolatların %16,2'si ampisiline, %4,8'i amoksisilin-klavulanik aside, %3,7'si sefuroksime, %1'i siprofloksasine, %6,2'si tetrasikline, %30,4'ü trimetoprim-sülfametoksazole dirençli bulunurken, meropenem ve sefotaksime karşı direnç saptanmamıştır. Akyar ve ark.nın (103) 2015 yılında 363 *H. influenzae* izolatını CLSI kriterlerine göre disk difüzyon yöntemiyle değerlendirdiği çalışmada ise izolatların %36,6'sı ampisiline, %10,7'si sefuroksime ve %38,3'ü trimetoprim-sülfametoksazole dirençli bulunmuştur. Alışkan ve ark.nın (104) 2016 yılında 117 *H. influenzae* izolatını CLSI kriterlerine göre disk

difüzyon yöntemiyle değerlendirdiği çalışmada, izolatların %28,6'sı ampisiline, %29,3'ü sefuroksime, %43,9'u trimetoprim-sülfametoksazole dirençli bulunurken, sefotaksime karşı direnç saptanmamıştır. Aynı çalışmada izolatların %15,8'i betalaktamaz pozitif olarak saptanmıştır. Çalışmamızın sonuçlarıyla birlikte ülkemizde EUCAST veya CLSI kriterlerine göre yapılan çalışmaların sonuçları Tablo 29'da özetlenmiştir. Çalışmalar arasındaki farklılıkların suşların izolasyon yılları, hasta popülasyonu, suşların izole edildiği klinik örnek türleri ve değerlendirme kriterlerinin farklılığından kaynaklandığı düşünülebilir.

Tablo 29. Ülkemizde EUCAST veya CLSI kriterlerine göre yapılan çalışmaların sonuçları

Çalışmalar	Suşların izole edildiği yıllar	Suşların Direnç Oranları (%)								Kılavuz	Ref. No
		AMP	AMC	CXM	CTX	MEM	CIP	TET	SXT		
Çalışmamız	2018-2022	35,3	32,7	38,9	1,3	1,3	6,7*	2	37,6	EUCAST DD	
		24,3			4,7					EUCAST SMD	
Çaycı ve ark.	2015-2017	35	3		33		4			EUCAST DD	(99)
Yurttakal	2020-2021	44,8	0		20,4	0	16,3*	0	28,5	EUCAST DD	(100)
		28,5	2				12,2	0	32,6**	EUCAST SMD	
Miralizade	2021-2022	10	0	13,3			8,3*	6,7		EUCAST DD	(101)
Gür ve ark.	2018-2019	16,2	4,8	3,7	0	0	1	6,2	30,4	CLSI DD	(102)
Akyar ve ark.	2012-2014	36,6		10,7					38,3	CLSI DD	(103)
Alışkan ve ark.	2012-2015	28,6		29,3	0				43,9	CLSI DD	(104)

CIP, siprofloksasin

* CIP'e yönelik nalidiksik asit tarama testi uygulanmıştır.

** SXT duyarlılığını test etmede gradiyent şerit yöntemi uygulanmıştır.

Avrupa'da EUCAST kriterlerine göre *H. influenzae* için antibiyotik duyarlılık profilinin değerlendirildiği çok sayıda çalışma mevcuttur. Daha önceden bahsedilen, İtalya'da 2023 yılında Giufrè ve ark.nın (93) yaptığı çalışmada 392 *H. influenzae* izolatı EUCAST kriterlerine göre gradiyent şerit yöntemi kullanılarak değerlendirilmiş ve izolatların %21,7'si ampisiline, %4,3'ü amoksisilin-klavulanik aside, %1'i sefotaksime ve %1,5'i siprofloksasine dirençli bulunurken meropeneme karşı direnç saptanmamıştır. Polonya'da 2022 yılında Kiedrowska ve ark.nın (105) yaptığı çalışmada 1481 *H. influenzae* izolatı EUCAST kriterlerine göre sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak değerlendirilmiş ve izolatların %12,6'sı ampisiline, %0,2'si amoksisilin-klavulanik aside, %17,1'i sefuroksime, %1,6'sı tetrasikline, %24,7'si trimetoprim-sülfametoksazole ve %0,1'i siprofloksasine dirençli bulunmuştur. Almanya'da 2021 yılında Nürnberg ve ark.nın (56) yaptığı çalışmada 2432 *H. influenzae* izolatı EUCAST

kriterlerine göre gradient şerit yöntemi kullanılarak değerlendirilmiş ve izolatların %21,9'u ampisiline, %1,1'i sefotaksime dirençli bulunmuştur. Fransa'da 2022 yılında Taha ve ark.nın (106) yaptığı çalışmada 608 *H. influenzae* izolatu EUCAST kriterlerine göre gradiyent şerit yöntemi kullanılarak değerlendirilmiş ve izolatların %62,5'i ampisiline, %47,2'si amoksisilin-klavulanik aside, %39,3'ü sefotaksime, %33,2'si trimetoprim-sülfametoksazole ve %8,2'si siprofloksasine dirençli bulunmuştur. Araştırmacılar ampisilin, amoksisilin-klavulanik asit ve sefotaksime direnç oranlarında literatürdeki diğer çalışmalara göre, dikkat çekici bir şekilde fark olmasını Fransa'da PBP3 aracılı direncin diğer ülkelere göre yüksek düzeyde olmasına bağlamışlardır. Norveç'te 2022 yılında Tønnessen ve ark.nın (107) yaptığı çalışmada 113 *H. influenzae* izolatu EUCAST kriterlerine göre gradiyent şerit yöntemi kullanılarak değerlendirilmiş ve izolatların %18,6'sı ampisiline, %1,8'i amoksisilin-klavulanik aside, %9,7'si sefuroksime, %21,2'si trimetoprim-sülfametoksazole, %2,7'si tetrasikline dirençli bulunurken siprofloksasin, sefotaksim ve meropenem direnç saptanmamıştır. Çalışmamızda ise izolatların %35,3'ü ampisiline, %32,7'si amoksisilin-klavulanik aside, %38,9'u sefuroksime, %1,3'i sefotaksime, %1,3'ü meropenem, %6,7'si nalidiksik aside, %2'si tetrasikline ve %37,6'si trimetoprim-sülfametoksazole dirençli bulundu. Çalışmamızda elde edilen sefotaksim, meropenem, nalidiksik asit, tetrasiklin ve trimetoprim-sülfametoksazole direnç oranları Avrupa ülkelerinin verileriyle genel olarak uyumlu olmakla birlikte, ampisilin, amoksisilin-klavulanik asit ve sefuroksim için direnç oranları çalışmamızda dikkat çekici bir şekilde yüksek bulundu. Çalışmamızın sonuçlarıyla birlikte Avrupa genelinde EUCAST kriterlerine göre yapılan çalışmaların sonuçları Tablo 30'da özetlenmiştir.

Tablo 30. Avrupa'da EUCAST kriterlerine göre yapılan çalışmaların sonuçları

Çalışmalar	Suşların izole edildiği yıllar	Suşların Direnç Oranları (%)								EUCAST	Ref. No
		AMP	AMC	CXM	CTX	MEM	CIP	TET	SXT		
Çalışmamız	2018-2022	35,3	32,7	38,9	1,3	1,3	6,7*	2	37,6	Disk difüzyon	
		24,3			4,7					Sıvı mikrodilüsyon	
Giufre ve ark.	2017-2021	21,7	4,3		1	0	1,5			Gradient şerit	(93)
Kiedrowska ve ark.	2005-2019	12,6	0,2	17,1			0,1	1,6	24,7	Sıvı mikrodilüsyon	(105)
Nürnberg ve ark.	2016-2019	21,9			1,1					Gradient şerit	(56)
Taha ve ark.	2017-2021	62,5	47,2		39,3		8,2		33,2	Gradient şerit	(106)
Tønnessen ve ark.	2017-2021	18,6	1,8	9,7	0	0	0	2,7	21,2	Gradient şerit	(107)

* CIP'e yönelik nalidiksik asit tarama testi uygulanmıştır.

Güncel literatür dikkate alındığında ülkemizde, *H. influenzae* izolatlarında antibiyotik duyarlılık durumlarının CLSI ve EUCAST kriterlerine göre karşılaştırmalı değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Söyletir ve ark.nın (108) yaptığı çok merkezli bir çalışmada, 2011-2013 yılları arasında izole edilen *H. influenzae* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları CLSI kriterlerine göre gradiyent şerit yöntemiyle belirlenmiştir. Çalışmaya dahil olan 339 *H. influenzae* izolatının %15,9'u ampisiline, %8,3'ü amoksisilin-klavulanik aside, %2,1'i sefuroksime dirençli bulunurken, seftriaksona karşı direnç saptanmamıştır. Araştırmada izolatlar ayrıca EUCAST sınır değerlerine göre de değerlendirilmiş ve izolatların %21,5'i ampisiline, %12,1'i amoksisilin-klavulanik aside, %15,3'ü sefuroksime, %2,1'i seftriaksona dirençli bulunmuştur. Aynı çalışmada izolatların %93,2'si nitrosefin testiyle beta-laktamaz negatif olarak bulunmuştur. Araştırmada EUCAST sınır değerleri kullanılarak 50 izolat (%14,7) ve CLSI sınır değerleri kullanılarak 31 izolat (%9,1) BLNAR olarak belirlenmiştir. Torumkuney ve ark.nın (109) yaptığı çok merkezli bir çalışmada ise, 2015-2017 yılları arasında izole edilen *H. influenzae* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları CLSI kriterlerine göre sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir. Çalışmaya dahil olan 239 *H. influenzae* izolatının %13'ü ampisiline, %0,8'i amoksisilin-klavulanik aside, %1,3'ü sefuroksime, %32,6'sı trimetoprim-sülfametoksazole dirençli bulunmuştur. Araştırmada izolatlar ayrıca EUCAST sınır değerlerine göre de değerlendirilmiş ve izolatların %13'ü ampisiline, %7,1'i amoksisilin-klavulanik aside, %96,2'si sefuroksime, %28'i trimetoprim-sülfametoksazole dirençli bulunmuştur. Ancak her iki çok merkezli çalışma CLSI kriterleri doğrultusunda gerçekleştirilmiş ancak elde edilen sonuçlar, CLSI ve EUCAST sınır değerleriyle değerlendirilmiştir. Bu nedenle bu çalışmaların tam olarak CLSI ve EUCAST kriterlerine göre antibiyotik duyarlılık testlerinin uygulandığı ve karşılaştırmanın yapıldığı çalışmalar olduğu söylenemez. İki çalışmada da bizim çalışmamızla paralel olarak amoksisilin-klavulanik asit direncinin EUCAST kriterleriyle daha yüksek oranda saptandığı görülmektedir. Özellikle Torumkuney ve ark.nın (109) çalışmasında CLSI ve EUCAST sınır değerlerine göre sefuroksim duyarlılık sonuçları arasındaki fark dikkat çekicidir. Çalışmamızda da iki kılavuzun sonuçları arasında en büyük fark sefuroksimde görülmüştür. Bu durum iki kılavuzun sefuroksim için önerdiği sınır değerler arasındaki farktan kaynaklanıyor olabilir. EUCAST sefuroksim için 25 mm altını dirençli kabul

ederken, CLSI 16 mm ve altını dirençli kabul etmektedir. Aynı çalışmada izolatların %90,4'ü nitrosetin testiyle beta-laktamaz negatif olarak bulunmuştur. Bu araştırmada EUCAST sınır değerleri kullanılarak 11 izolat (%4,6) ve CLSI sınır değerleri kullanılarak 5 izolat (%2,1) BLNAR olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda ise izolatların %88'i beta-laktamaz negatifti. EUCAST'e göre BLNAR olarak saptanan 35 izolattan ikisinin ampisilin için CLSI sonucu olmadığından karşılaştırmaya dahil edilmedi. Buna göre EUCAST sınır değerleri kullanılarak 33 izolat (%22,6), CLSI sınır değerleri kullanılarak 23 izolat (%15,8) BLNAR olarak saptandı. Sonuçlarımız EUCAST kriterleri kullanıldığında BLNAR saptama oranının CLSI kriterleri uygulanmasına göre daha yüksek olduğunu gösterdi. BLNAR olarak belirlenen bu izolatların tümünde *ftsI* mutasyonu saptanmış olması nitrosetin testiyle belirlenen beta-laktamaz negatifliğinin izolatların beta-laktam duyarlılığını belirlemede yetersiz kalabileceğinin önemli bir göstergesidir.

H. influenzae'da beta-laktamaz aracılı direnç mekanizmasının en yaygın nedeni TEM-1 beta-laktamaz üretimi olup ROB-1 beta-laktamaz nadir olarak görülmektedir. 2225 beta-laktamaz pozitif *H. influenzae* izolatının değerlendirildiği küresel bir araştırmada coğrafî çeşitliliğe rağmen, izolatların %93,7'si TEM-1 pozitif. İzolatların %4,6'sı ROB-1 pozitif, %1,2'si her iki gen için de negatif, %0,04'ü her iki gen için de pozitif. ROB-1 Kuzey Amerika dışında nadiren saptanırken, beta-laktamaz pozitif izolatlar arasında prevalansı Meksika, ABD ve Kanada'da sırasıyla %31,6, %13,2 ve %9,2'ydi (50). Søndergaard ve ark.nın (110) 2015 yılında yaptığı bir çalışmada ise yeni beta-laktamazlardan olan TEM-15 beta-laktamaz üretiminin, *H. influenzae*'da sefotaksim direncine yol açtığı ve nitrosetin hidrolizi açısından, TEM-15'in TEM-1'e göre daha az verimli bir enzim olduğu gösterilmiştir.

H. influenzae kökenleri, beta-laktam antibiyotiklere direnç açısından genotipik olarak farklı şekilde tanımlanmaktadır. Direnç fenotipinden bağımsız olarak genotipik tanımlama; *bla*_{TEM-1}, *bla*_{ROB-1} genlerinin araştırılması ve *ftsI* geninin dizi analizi ile yapılmaktadır. gBLNAR; β-laktamaz genleri negatif, PBP3'te önemli amino asit değişikliği olan suş olarak tanımlanırken, gBLPACR; β-laktamaz genleri pozitif, PBP3'te önemli amino asit değişikliği olan suş olarak tanımlanır. Dünyada *H. influenzae* izolatlarında antibiyotik duyarlılık durumlarının CLSI ve EUCAST kriterlerine göre karşılaştırmalı değerlendirdiği çalışmalar az sayıdadır ve bu konudaki

çalışmalar belirli genotipik gruplarda, az sayıdaki bazı antibiyotikler üzerinde karşılaştırma yapmak üzere tasarlanmıştır. İsviçre’de 2009-2014 yılları arasında izole edilen 124 *H. influenzae* kökeninin dahil edildiği bir çalışmada, EUCAST ve CLSI kriterlerine göre gradiyent şerit yöntemi kullanılarak değerlendirme yapılmış ve gBLNAR ve gBLPACR izolatlarda iki kılavuza ait sonuçlar karşılaştırılmıştır. gBLNAR izolatların %32’si her iki kılavuza göre ampisiline duyarlı olarak saptanmıştır. EUCAST’e göre izolatların %68’i dirençliyken, CLSI’ya göre izolatların %68’i orta duyarlı kategorisinde yer almıştır. gBLPACR izolatların tamamı her iki kılavuzla ampisiline dirençli olarak bulunmuştur. Amoksisilin-klavulanik asit için EUCAST’e göre gBLNAR izolatların %36’sı dirençliyken CLSI’a göre dirençli izolat saptanmamıştır. gBLPACR izolatların %15’i her iki kılavuzla amoksisilin-klavulanik aside dirençli olarak bulunmuştur. Bu çalışmaya göre EUCAST ve CLSI sonuçları arasındaki en büyük fark sefuroksimde gözlenmiştir. Sefuroksim için gBLNAR izolatların EUCAST’e göre %72’si dirençliyken, CLSI’a göre %21’i, gBLPACR izolatların ise EUCAST’e göre %75’i dirençliyken, CLSI’a göre %25’i dirençli bulunmuştur (43). Sefuroksim için belirlenen bu belirgin farklılığın EUCAST ve CLSI sınır değerleri arasındaki farktan kaynaklandığı düşünülmektedir. Amoksisilin-klavulanik asit ve sefuroksim ülkemizde de özellikle otitis media ve sinüzitte sıklıkla başvurulan antibiyotiklerden olup, EUCAST kriterlerinin kullanımıyla birlikte daha yüksek direnç oranlarının raporlanmasının tedaviye olan etkileri klinik araştırmalarla açığa çıkarılmalıdır.

H. influenzae izolatlarında aminopenisilin direncinin saptanması ve beta-laktam direncinin ortak bir tanımının oluşturulması için altın standart bir yöntem henüz belirlenmemiştir. Çok sayıda çalışma disk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleri arasındaki zayıf korelasyon, sınır değerler etrafında kümelenme ve çakışan ampisilin MİK aralıkları nedeniyle genotipik olarak dirençli suşları sokak tipi suşlarından fenotipik olarak ayırmanın güçlüğü ve beta-laktam direncini doğru bir şekilde tespit etmenin zorluklarını vurgulamıştır (97). Avustralya’da Fernando ve ark.nın (97) 2017 yılında 100 *H. influenzae* izolatı üzerinde yaptıkları bir çalışmada, izolatlar disk difüzyon yöntemiyle EUCAST ve CLSI kriterleri doğrultusunda değerlendirilmiştir. Bu çalışmada BLNAR saptama oranları EUCAST için %18 ve CLSI için %5 olarak bulunmuştur ve bu sonuç kullanılan disk difüzyon yöntemine göre *H. influenzae*

izolatlarında beta-laktam direncinin saptanmasındaki değişkenliği göstermektedir. Çalışmada ayrıca EUCAST disk difüzyon yöntemi ile fenotipik olarak BLNAR olan izolatların tümünün gBLNAR olduğu kanıtlanmıştır, böylece gBLNAR'ın saptanması için EUCAST disk difüzyon yönteminin özgülüğü doğrulanmıştır. Bu çalışmada araştırmacılar, CLSI yönteminin yüksek konsantrasyona sahip ampisilin ve amoksisilin-klavulanik asit disklerinin ve daha yüksek MİK sınır değerlerinin aminopenisilin direncini saptama konusunda yetersiz kaldığını ifade etmiştir. Çalışmada BLPACR saptama oranı EUCAST için %14 olarak bulunmuştur. Uluslararası sürveyans çalışmaları ise BLPACR insidansını yaklaşık %0,07-11 aralığında bildirmektedir (111, 112). Fernando ve ark.nın (97) yaptığı çalışmada *ftsI* gen analizinde, gBLPACR olmayan beş BLPACR izolatının tümünün sınır değerin 1 mm altında amoksisilin-klavulanik asit zon çaplarına sahip olduğu gösterilmiştir. Amoksisilin-klavulanik asit inhibisyon zonu içinde ince kolonilerin, puslu üremenin ve çift zonların varlığı, besiyerinde zon çapının ölçümünü zorlaştırmaktadır. Çalışmamızda da disk difüzyon yöntemiyle BLPACR olarak saptanan dört izolatın *ftsI* gen analizinde bir mutasyon saptanmamıştır. Bu izolatların amoksisilin-klavulanik asit için zon çaplarına bakıldığında, iki izolatın zon çapı sınır değerin 1 mm altındayken, diğer iki izolatın zon çapları sınır değerin 2 mm ve 5 mm altındadır. Fernando ve ark.nın (97) yaptığı çalışmada ayrıca EUCAST kriterlerine göre sıvı mikrodilüsyon yöntemi de uygulanmıştır. Buna göre, sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle gözden kaçan altı BLNAR izolatından beşinin disk difüzyon yöntemiyle elde edilen zon çaplarının sınır değerin 1 mm altında kümelendiği bulunmuştur. Araştırmacılar bu sonuca göre katı besiyerinde görülebilen puslu üremenin sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle aynı doğruluk derecesinde tespit edilemeyeceğini vurgulamışlardır. Avustralya'da klasik olarak düşük düzey dirençli BLNAR izolatlar daha sık görülürken, yüksek düzey aminopenisilin ve geniş spektrumlu sefalosporin direncinin tespiti, *H. influenzae*'nin beta-laktam direnç paternlerindeki değişimini göstermektedir. Bu sonuçlar grup III aminopenisilin direncinin yeterince tanınmadığına işarettir (97).

Türkiye'de daha önceki yıllarda yapılan çalışmalar, beta-laktam direncini ağırlıklı olarak beta-laktamaz varlığına bağlamaktaydı. Ülkemizde pek çok laboratuvar *H. influenzae* izolatlarında yalnızca beta-laktamaz üretimini test etmektedir ve *ftsI* gen mutasyonlarına bağlı olabilecek beta-laktam direnci bu durumda gözden

kaçabilmektedir (94). Altun ve Gür'ün (113) 2008 yılında 861 *H. influenzae* izolatu üzerinde yaptıkları çalışmada BLNAR oranı %1,6 olarak bulunmuştur. Alışkan ve ark.nın (104) 2016 yılında 117 *H. influenzae* izolatu üzerinde yaptıkları çalışmada BLNAR oranı %8,6 olarak bulunmuştur. Gür ve Hazırolan'nın yaptığı çalışmada (102) izolatların %7,9'u BLNAR ve %1,9'u BLPACR olarak belirlenmiştir. Daha önce bahsedilen Erciyes Üniversitesi'ndeki çalışmada (100) izolatların %34,7'si BLNAR, %2'si BLPACR olarak saptanırken İstanbul Üniversitesi'ndeki çalışmada (101) izolatların %25'i BLNAR olarak saptanmış ve BLPACR izolatu tespit edilmemiştir. Çalışmamızda ise izolatların %23,3'ü BLNAR ve %10,7'si BLPACR olarak saptanmıştır. Çalışmamızın verileri ülkemizde daha önceki yıllarda elde edilen verilerle birlikte değerlendirildiğinde yıllar içinde BLNAR ve BLPACR oranlarında artış olduğu dikkat çekmektedir.

PBP3 aracılı dirence sahip *H. influenzae* izolatları, *ftsI* genindeki spesifik mutasyonlara bağlı amino asit değişikliklerine göre genotipik gruplara ayrılır (Grup I, IIa, IIb, IIc, IId, III, III benzeri, III+ ve III benzeri+). Grup I ve II düşük düzey dirençli izolatları temsil ederken, grup III ve grup III benzeri yüksek düzey dirençli izolatları gösterir. S385T mutasyonu, sefotaksim MİK değerinin artmasıyla ilişkilidir ve yüksek düzey dirençli izolatları düşük düzey dirençli olanlardan ayırır. Ek olarak L389F mutasyonu varlığı, yüksek düzey dirençli izolatlarda direnç seviyelerinin daha da artmasıyla ilişkilidir (53). Çalışmamızda *ftsI* geninin dizi analizinde en sık görülen amino asit değişiklikleri; D350N, M377I, G490E, A502V ve N526K mutasyonlarıydı. *ftsI* mutasyonları temel alınarak oluşturulan genotipik sınıflandırmalara göre, grup I'de bir izolat, grup IIa'da dokuz izolat, grup IIb'de 25 izolat, grup IIc'de iki izolat, grup IId'de üç izolat, grup III benzerinde dört izolat, grup III+'da bir izolat vardı. Direnç mutasyonu görülen 34 BLNAR izolatın 31'i düşük düzey dirençli BLNAR (grup I ve II) olarak bulunurken, üçü yüksek düzey dirençli (grup III) olarak bulundu. Direnç mutasyonu görülen 11 BLPACR izolatın dokuzu düşük düzey dirençli BLPACR olarak bulunurken, ikisi yüksek düzey dirençli BLPACR olarak bulundu. Grup III benzeri bir izolatta diğer grup III benzeri izolatlardan farklı olarak saptanan E493D değişimi belirlendi. Güncel literatür incelendiğinde E493D mutasyonu olan ve yüksek ampisilin ve sefotaksim MİK değeri bildirilen bir veriye rastlanmamıştır. Bulgularımız PBP3

yapısındaki değişikliklerin beta-laktam direnci ile yakından ilişkili olduğunu ve *H.influenzae* izolatlarında PBP3 varyantlarının izlenmesinin önemini vurgulamaktadır.

İtalya'da 37 BLNAR izolatın *ftsI* gen mutasyonları açısından değerlendirildiği bir çalışmada, izolatların %51,4'ü grup Iİb içerisinde yer almıştır (93). Çalışmamızda 34 BLNAR izolatın %64,7'si grup Iİb içerisindedir. Bu sonuç, literatürde BLNAR izolatlarında daha önce rapor edilen ve en sık görülen amino asit değişikliklerinin A502V ve N526K (grup Iİb) olarak bildirildiği diğer çalışmalarla da uyumludur (41, 51). Almanya'da sefotaksim direnci saptanan 27 *H. influenzae* izolatının *ftsI* gen mutasyonları açısından değerlendirildiği bir çalışmada, izolatların büyük çoğunluğunun grup III+ (n=8) ve grup III benzeri+ (n=10) içerisinde yer aldığı görülmüştür (56). Çalışmamızda sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle yedi izolatta sefotaksim direnci saptanmıştır. Bu yedi izolatın üçü grup III benzerinde, biri grup III+'da, biri grup Iİb'de yer aldı. Geri kalan iki izolat BLNAS grubunda olduğu için bu izolatlara dizi analizi yapılmamıştır. Sefotaksim direnci saptanan ve beta-laktamaz negatif olan bu iki izolatta TEM-1 dışı bir beta laktamaz olabileceği veya zayıf ekspresyona sahip TEM-1 geni olabileceği düşünöldü. Bu sonuçlara göre, sefotaksim direncinin saptanmasında MİK değerinin belirlenmesi kritik önem arz etmektedir. Sefotaksim MİK'lerinin artışı ile karakterize, grup III benzeri ve grup III+'da bulunan toplam beş izolatın sefotaksim MİK değerlerine bakıldığında dört izolatın MİK değerinin 0,25 µg/ml olduğu ve bir izolatın MİK değerinin 0,125 µg/ml olduğu gözlendi. Çoğu coğrafi bölgede ağırlıklı olarak düşük düzey dirençli izolatlar hakimken, yüksek düzey dirençli izolatlar Japonya ve Güney Kore'de yaygındır. Avrupa ölkeleri ve Kanada'dan elde edilen epidemiyolojik veriler ise sefotaksim dirençli izolatların neden olduğu sporadik vakalarda ve grup II dirençli izolatlarda kademeli bir artış olduğunu göstermektedir (72).

Yüksek düzey BLNAR ve BLPACR dirençle ilişkilendirilen *ftsI* gen mutasyonlarının varlığı, *H. influenzae* izolatlarında beta-laktam direncini saptamada kullanılan nitrosefin testi ve antibiyotik duyarlılık testlerinin performansının gözden geçirilmesi gerektiğini göstermektedir. Bu tür sınırlı yaklaşımların veya CLSI disk difüzyon metodolojisinin devam eden kullanımının hem düşük hem de yüksek düzey ampisilin direncini tespit etmekte başarısız olacağı düşünölmektedir. *H. influenzae*'nın değişen epidemiyolojisi ve artan direnç oranları için sörveyansın sağlam, kolay uygulanabilir ve uygun maliyetli bir metodoloji ile desteklenmesi gerekmektedir. Direnç

mekanizmalarının çeşitli olması, üreme paternlerinin değişkenliği, genotip ile fenotip arasındaki korelasyonun tutarsızlığı gibi faktörler, antibiyotik duyarlılık testinin tekrarlanması durumunda zon çaplarının değişmesine ve sınır değerler etrafında kümelenmeye neden olabilir. Antibiyotik duyarlılığı açısından yanlış tanımlanan izolatların tedavi başarısızlıklarına yol açarak morbidite, mortalite ve ayrıca hasta maliyetinde artışa neden olabileceği akılda tutulmalıdır.

Çalışmamızın verileri *H. influenzae* izolatlarında EUCAST önerileri doğrultusunda çalışıldığında beta-laktam direncinin daha yüksek oranda saptandığını göstermiştir. Özellikle PBP3 değişikliklerine bağlı olarak gelişen ve tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de sıklığı giderek artan beta-laktam direnci altta yatan *ftsI* mutasyonlarının gösterilmesiyle de doğrulanmıştır. CLSI yerine EUCAST kriterleri uygulandığında özellikle sefuroksim için elde edilen daha yüksek direnç durumunun tedavi protokolleri üzerine etkisi klinik çalışmalarla değerlendirilmelidir. Sefotaksim kullanımını gerektirebilecek invazif *H. influenzae* enfeksiyonlarında ise MİK değerinin saptanması tedavi başarısı açısından değerli olacaktır.

6. SONUÇLAR

1. Çalışmamızda 2018-2022 yılları arasında klinik örneklerden elde edilen *H. influenzae* izolatlarının %71,3'ü NTHi olarak bulunmuştur.

2. EUCAST kriterleri doğrultusunda gerçekleştirilen disk difüzyon testine göre; izolatların %58,7'si benzilpenisilin G'ye, %35,3'ü ampisiline, %32,7'si amoksisilin-klavulanik aside, %38,9'u sefuroksime, %1,3'ü sefotaksime, %1,3'ü meropeneme, %6,7'si nalidiksik aside, %2'si tetrasikline ve %37,6'si trimetoprim-sülfametoksazole dirençli bulundu. Sefotaksim, meropenem, nalidiksik asit, tetrasiklin ve trimetoprim-sülfametoksazol direnç oranlarımız Avrupa verileriyle genel olarak uyumlu olmakla birlikte, Avrupa genelinde farklılık gösteren ampisilin, amoksisilin-klavulanik asit ve sefuroksim için direnç oranları çalışmamızda dikkat çekici bir şekilde yüksek bulundu.

3. CLSI ve EUCAST disk difüzyon testi sonuçları karşılaştırıldığında, ampisilin ve amoksisilin-klavulanik asit direnç oranlarının EUCAST kriterleri ile daha yüksek olduğu, tetrasiklin ve trimetoprim-sülfametoksazol direnç oranlarının ise CLSI kriterleri ile daha yüksek olduğu görüldü. Sefalosporinler açısından sefotaksim duyarlılık sonuçları benzerken, sefuroksim için direnç oranı EUCAST kriterleri ile dikkat çekici bir oranda daha yüksek bulundu. Meropenem için iki kılavuz arasındaki duyarlılık sonuçları benzerdi. Çalışmamızda sefuroksim duyarlılık sonuçları arasındaki farklılığın, iki kılavuzun sefuroksim için önerdiği sınır değerler arasındaki farktan kaynaklanıyor olabileceği düşünüldü.

4. Çalışmamızda CLSI sonucu olan izolatlar dikkate alındığında, EUCAST sınır değerleri kullanılarak 33 izolat, CLSI sınır değerleri kullanılarak 23 izolat BLNAR olarak saptanmıştır. Buna göre, CLSI'ya kıyasla EUCAST kriterlerine göre BLNAR saptama oranının daha fazla olduğu sonucuna varılmıştır.

5. İzolatların %12'si beta-laktamaz pozitif olarak bulunmuştur. Bu sonuç ülkemizde yapılan geniş kapsamlı süveyans çalışmalarının sonuçlarıyla uyumludur.

6. BLNAR (%23,3) ve BLPACR (%10,7) izolatlar toplam izolatların %34'ünü oluşturmaktadır. Yüksek düzey BLNAR ve BLPACR dirençle ilişkilendirilen *ftsI* gen mutasyonlarının varlığı, *H. influenzae* izolatlarında beta-laktam direncini saptamada CLSI tarafından önerilen nitrosefin testinin tek başına yetersiz olduğunu göstermektedir. EUCAST kriterleri doğrultusunda ilk basamakta 1 ünite benzilpenisilin G ile tarama testi ve takibinde dirençli izolatlar için uygulanacak beta-laktamaz testi ve amoksisilin-

klavulanik asit (2-1 µg) disk difüzyon testinin daha yüksek antibiyotik direnciyle ilişkilendirilen BLNAR ve BLPACR izolatların saptanmasını sağladığı gösterilmiştir.

7. EUCAST kriterleri doğrultusunda gerçekleştirilen sıvı mikrodilüsyon testine göre; izolatların %24,3'ü ampisiline, %4,7'si sefotaksime dirençli bulundu. Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle ampisiline duyarlı olarak bulunan 19 BLNAR izolatın tümünün MİK değeri 1 µg/ml olup EUCAST'in önerdiği klinik sınır değer (1 µg/mL) duyarlı-dirençli ayırımını yapmakta yetersiz kaldığı sonucuna varıldı.

8. Çalışmamızda 34 BLNAR izolatın %64,7'si *ftsI* mutasyonlarına grup IIB içerisindedir. Bu sonuç, literatürde BLNAR izolatlarında daha önce rapor edilen ve en sık görülen amino asit değişikliklerinin A502V ve N526K (grup IIB) olarak bildirildiği diğer çalışmalarla uyumludur. Grup III benzeri bir izolatta ise diğer grup III benzeri izolatlardan farklı olarak saptanan E493D değişimi belirlendi. Güncel literatür incelendiğinde E493D mutasyonu olan ve yüksek ampisilin ve sefotaksim MİK değeri bildirilen bir veriye rastlanmamıştır.

9. Çalışmamızda grup III benzeri ve grup III+'da (sefotaksim MİK'lerinin artışı ile karakterize olan gruplar) bulunan toplam beş izolatın sefotaksim MİK değerlerinin 0,125-0,25 µg/ml olduğu izlenmiştir. Ciddi enfeksiyonlarda verilecek tedaviyi doğru yönlendirmek için özellikle BLNAR ve BLPACR *H. influenzae* izolatlarının sefotaksim MİK değerlerinin belirlenmesi önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Pfeiffer R. I.—Preliminary Communication on the Exciting causes of Influenza. British medical journal. 1892;1(1620):128.
2. Eyler JM. The state of science, microbiology, and vaccines circa 1918. Public Health Reports. 2010;125(3_suppl):27-36.
3. Neal JB, JACKSON HW, Appelbaum E. Meningitis Due to the Influenza Bacillus of Pfeiffer (Hemophilus Influenzae): A Study of One Hundred and Eleven Cases, with Four Recoveries. Journal of the American Medical Association. 1934;102(7):513-8.
4. Cohen I. La méningite cérébro-spinale septicémique. 1909.
5. Smith W, Andrews C, Laidlaw P. A virus from influenza patient. Lancet, ii. 1933:666-8.
6. Winslow C-E, Broadhurst J, Buchanan R, Krumwiede Jr C, Rogers L, Smith G. The families and genera of the bacteria final report of the committee of the society of American bacteriologists on characterization and classification of bacterial types. Journal of bacteriology. 1920;5(3):191-229.
7. Pittman M. Variation and type specificity in the bacterial species *Hemophilus influenzae*. The Journal of experimental medicine. 1931;53(4):471-92.
8. Özmert EN. Dünya’da ve Türkiye’de aşılama takvimindeki gelişmeler. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi. 2008;51(3):168-75.
9. Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. science. 1995;269(5223):496-512.
10. Nørskov-Lauritsen N. Classification, identification, and clinical significance of *Haemophilus* and *Aggregatibacter* species with host specificity for humans. Clinical microbiology reviews. 2014;27(2):214-40.
11. Nørskov-Lauritsen N, Kilian M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2006;56(9):2135-46.
12. Jorgensen JH, Carroll KC, Funke G. '*Haemophilus*' Manual of Clinical Microbiology. 11th ed. 2015. p. 667-84.

13. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda GS, Koneman GS, Schreckenberger PC, et al. 'Zor Üreyen Çeşitli Gram-Negatif Basiller' Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology (Türkçe Baskısı) 7. baskı 2017. p. 475-88.
14. Ulusal Mikrobiyoloji Standartları: Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi. Türkiye Halk Sağlığı Kurumu, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 934, Ankara, 2014.
15. Ryan KJ, Ray CG '*Haemophilus* and *Bordetella*' Sherris Medical Microbiology. 6th Edition. 2014. Chapter 31. p. 551-58.
16. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA '*Haemophilus* and Related Bacteria' Medical Microbiology. 8th edition. 2016. p.243-50.
17. Murphy TF. '*Haemophilus* Species, Including *H. influenzae* and *H. ducreyi*' 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. p. 2575-83.
18. Centers for Disease Control and Prevention 'Epidemiology and Prevention of Vaccine-Preventable Diseases: *Haemophilus influenzae*' [cited 2023 August]. Available from: <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/hib.html#print>.
19. Peltola H. Worldwide *Haemophilus influenzae* type b disease at the beginning of the 21st century: global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates. Clinical microbiology reviews. 2000;13(2):302-17.
20. European Centre for Disease Prevention and Control. *Haemophilus influenzae*. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2018. Stockholm: ECDC; 2020. ECDC Solna.
21. Collins S, Ramsay M, Campbell H, Slack MP, Ladhani SN. Invasive *Haemophilus influenzae* type b disease in England and Wales: who is at risk after 2 decades of routine childhood vaccination? Clinical infectious diseases. 2013;57(12):1715-21.
22. Whittaker R, Economopoulou A, Dias JG, Bancroft E, Ramliden M, Celentano LP. Epidemiology of invasive *Haemophilus influenzae* disease, Europe, 2007–2014. Emerging infectious diseases. 2017;23(3):396.
23. Centers for Disease Control and Prevention '*Haemophilus influenzae* Disease (Including Hib)' [cited 2023 August]. Available from: <https://www.cdc.gov/hi-disease/surveillance.html>
24. Carrera-Salinas A, González-Díaz A, Calatayud L, Mercado-Maza J, Puig C, Berbel D, et al. Epidemiology and population structure of *Haemophilus influenzae* causing invasive disease. Microbial Genomics. 2021;7(12).
25. WHO. News Release. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. 2017 [cited 2023 July]. Available from:

<https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

26. Kostyanev TS, Sechanova LP. Virulence factors and mechanisms of antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae*. Folia Med (Plovdiv). 2012;54(1):19-23.

27. Nicola J. High, Feinan Fan, Joseph D. Schwartzman '*Haemophilus influenzae*' Chapter 97, Molecular Medical Microbiology (Second Edition) Volume 3, 2015, Pages 1709-1728.

28. Hansen E, Gonzales F, Chamberlain N, Norgard M, Miller E, Cope L, et al. Cloning of the gene encoding the major outer membrane protein of *Haemophilus influenzae* type b. Infection and immunity. 1988;56(10):2709-16.

29. 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.

30. Candel FJ, Salavert M, Basaras M, Borges M, Cantón R, Cercenado E, et al. Ten Issues for Updating in Community-Acquired Pneumonia: An Expert Review. Journal of Clinical Medicine. 2023;12(21):6864.

31. Burillo A, Candel FJ, Canut-Blasco A. Value of syndromic panels in the management of severe community-acquired pneumonia. Revista Española de Quimioterapia. 2022;35(Suppl 1):15.

32. Couturier MR, Mehinovic E, Croft AC, Fisher MA. Identification of HACEK clinical isolates by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. Journal of clinical microbiology. 2011;49(3):1104-6.

33. Van Veen S, Claas E, Kuijper EJ. High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories. Journal of clinical microbiology. 2010;48(3):900-7.

34. Branda JA, Rychert J, Burnham C-AD, Bythrow M, Garner OB, Ginocchio CC, et al. Multicenter validation of the VITEK MS v2. 0 MALDI-TOF mass spectrometry system for the identification of fastidious gram-negative bacteria. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2014;78(2):129-31.

35. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0, 2023. <http://www.eucast.org>.

36. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 33rd ed. <https://clsi.org>.

37. CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

38. Yeh S. Epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, and treatment of *Haemophilus influenzae*. UpToDate. 2019.
39. European Centre for Disease Prevention and Control 'Factsheet about Invasive *Haemophilus influenzae* disease' [cited 2023 September]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/invasive-haemophilus-influenzae-disease/facts>.
40. Dennis L. Kasper, and Anthony S. Fauci. 'Chapter 47 *Haemophilus* infections' Harrison's Infectious Diseases, McGraw Hill, 2010.
41. Tristram S, Jacobs MR, Appelbaum PC. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. Clinical microbiology reviews. 2007;20(2):368-89.
42. Skaare D, Anthonisen IL, Caugant DA, Jenkins A, Steinbakk M, Strand L, et al. Multilocus sequence typing and *ftsI* sequencing: a powerful tool for surveillance of penicillin-binding protein 3-mediated beta-lactam resistance in nontypeable *Haemophilus influenzae*. BMC microbiology. 2014;14:1-16.
43. Cherkaoui A, Diene S, Emonet S, Renzi G, Francois P, Schrenzel J. Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* isolates in Geneva: serotype, antimicrobial susceptibility, and β -lactam resistance mechanisms. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2015;34:1937-45.
44. Puig C, Calatayud L, Marti S, Tubau F, Garcia-Vidal C, Carratalà J, et al. Molecular epidemiology of nontypeable *Haemophilus influenzae* causing community-acquired pneumonia in adults. PloS one. 2013;8(12):e82515.
45. Kishii K, Chiba N, Morozumi M, Hamano-Hasegawa K, Ubukata K, Kurokawa I, et al. Diverse mutations in the *ftsI* gene in ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* isolates from pediatric patients with acute otitis media. Journal of infection and chemotherapy. 2010;16(2):87-93.
46. Hoshino T, Sato Y, Toyonaga Y, Hanaki H, Sunakawa K, Disease D-RPSGiPI. Nationwide survey of the development of drug resistance in the pediatric field in 2007 and 2010: drug sensitivity of *Haemophilus influenzae* in Japan (second report). Journal of Infection and Chemotherapy. 2013;19(3):495-503.
47. Galán J-C, Morosini M-I, Baquero M-R, Reig M, Baquero F. *Haemophilus influenzae* *bla* ROB-1 mutations in hypermutagenic Δ ampC *Escherichia coli* conferring resistance to cefotaxime and β -lactamase inhibitors and increased susceptibility to cefaclor. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2003;47(8):2551-7.
48. Reist J, Linnik J, Schibli U, Egli A, Hinić V. Impact of different amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 on beta-lactam susceptibility in *Haemophilus influenzae*. bioRxiv. 2019:846428.
49. San Millan A, Garcia-Cobos S, Escudero JA, Hidalgo L, Gutierrez B, Carrilero L, et al. *Haemophilus influenzae* clinical isolates with plasmid pB1000 bearing *bla*

ROB-1: fitness cost and interspecies dissemination. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(4):1506-11.

50. Farrell D, Morrissey I, Bakker S, Buckridge S, Felmingham D. Global distribution of TEM-1 and ROB-1 β -lactamases in *Haemophilus influenzae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005;56(4):773-6.

51. Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, Chiba N, Hasegawa K, Takeuchi Y, et al. Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with β -lactam resistance in β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(6):1693-9.

52. Jakubu V, Malisova L, Musilek M, Pomorska K, Zemlickova H. Characterization of *Haemophilus influenzae* strains with non-enzymatic resistance to β -lactam antibiotics caused by mutations in the PBP3 gene in the Czech Republic in 2010–2018. *Life*. 2021;11(11):1260.

53. Skaare D, Anthonisen IL, Kahlmeter G, Matuschek E, Natås OB, Steinbakk M, et al. Emergence of clonally related multidrug resistant *Haemophilus influenzae* with penicillin-binding protein 3-mediated resistance to extended-spectrum cephalosporins, Norway, 2006 to 2013. *Eurosurveillance*. 2014;19(49).

54. Dabernat H, Delmas C, Seguy M, Pelissier R, Faucon G, Bennamani S, et al. Diversity of β -lactam resistance-conferring amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 of *Haemophilus influenzae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002;46(7):2208-18.

55. García-Cobos S, Campos J, Lázaro E, Román F, Cercenado E, García-Rey Cs, et al. Ampicillin-resistant non- β -lactamase-producing *Haemophilus influenzae* in Spain: recent emergence of clonal isolates with increased resistance to cefotaxime and cefixime. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007;51(7):2564-73.

56. Nürnberg S, Claus H, Krone M, Vogel U, Lâm T-T. Cefotaxime resistance in invasive *Haemophilus influenzae* isolates in Germany 2016–19: prevalence, epidemiology and relevance of PBP3 substitutions. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2021;76(4):920-9.

57. Ubukata K, Chiba N, Morozumi M, Iwata S, Sunakawa K, Meningitis WGoNSfB. Longitudinal surveillance of *Haemophilus influenzae* isolates from pediatric patients with meningitis throughout Japan, 2000–2011. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2013;19(1):34-41.

58. Park C, Kim K-H, Shin N-Y, Byun J-H, Kwon E-Y, Lee J-W, et al. Genetic diversity of the *ftsI* gene in β -lactamase-nonproducing ampicillin-resistant and β -lactamase-producing amoxicillin-/clavulanic acid-resistant nasopharyngeal *Haemophilus influenzae* strains isolated from children in South Korea. *Microbial Drug Resistance*. 2013;19(3):224-30.

59. Hagiwara E, Baba T, Shinohara T, Nishihira R, Komatsu S, Ogura T. Antimicrobial resistance genotype trend and its association with host clinical characteristics in respiratory isolates of *Haemophilus influenzae*. *Chemotherapy*. 2013;58(5):352-7.
60. Resman F, Ristovski M, Forsgren A, Kaijser B, Kronvall G, Medstrand P, et al. Increase of β -lactam-resistant invasive *Haemophilus influenzae* in Sweden, 1997 to 2010. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(8):4408-15.
61. Skaare D, Allum A-G, Anthonisen I, Jenkins A, Lia A, Strand L, et al. Mutant *ftsI* genes in the emergence of penicillin-binding protein mediated β -lactam resistance in *Haemophilus influenzae* in Norway. *Clinical microbiology and infection*. 2010;16(8):1117-24.
62. Shuel ML, Tsang RS. Canadian β -lactamase-negative *Haemophilus influenzae* isolates showing decreased susceptibility toward ampicillin have significant penicillin binding protein 3 mutations. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2009;63(4):379-83.
63. Dabernat H, Delmas C. Epidemiology and evolution of antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae* in children 5 years of age or less in France, 2001–2008: a retrospective database analysis. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 2012;31:2745-53.
64. Barbosa AR, Giufre M, Cerquetti M, Bajanca-Lavado MP. Polymorphism in *ftsI* gene and β -lactam susceptibility in Portuguese *Haemophilus influenzae* strains: clonal dissemination of β -lactamase-positive isolates with decreased susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011;66(4):788-96.
65. Kaczmarek FS, Gootz TD, Dib-Hajj F, Shang W, Hallowell S, Cronan M. Genetic and molecular characterization of β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* with unusually high resistance to ampicillin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(5):1630-9.
66. Witherden EA, Montgomery J, Henderson B, Tristram SG. Prevalence and genotypic characteristics of β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* in Australia. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011;66(5):1013-5.
67. Sevillano D, Giménez M-J, Cercenado E, Cafini F, Gené A, Alou L, et al. Genotypic versus phenotypic characterization, with respect to β -lactam susceptibility, of *Haemophilus influenzae* isolates exhibiting decreased susceptibility to β -lactam resistance markers. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(1):267-70.
68. Ubukata K. Problems associated with high prevalence of multidrug-resistant bacteria in patients with community-acquired infections. *Journal of infection and chemotherapy: official journal of the Japan Society of Chemotherapy*. 2003;9(4):285-91.

69. Shuel M, Hoang L, Law DK, Tsang R. Invasive *Haemophilus influenzae* in British Columbia: non-Hib and non-typeable strains causing disease in children and adults. *International Journal of Infectious Diseases*. 2011;15(3):e167-e73.
70. Van Eldere J, Slack MP, Ladhani S, Cripps AW. Non-typeable *Haemophilus influenzae*, an under-recognised pathogen. *The Lancet infectious diseases*. 2014;14(12):1281-92.
71. García-Cobos S, Arroyo M, Pérez-Vázquez M, Aracil B, Lara N, Oteo J, et al. Isolates of β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* causing invasive infections in Spain remain susceptible to cefotaxime and imipenem. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014;69(1):111-6.
72. Ferjani S, Sassi I, Saidani M, Mhiri E, Ghariani A, Boubaker IBB, et al. Polymorphism of *ftsI* gene in *Haemophilus influenzae* and emergence of cefotaxime resistance in two Tunisian hospitals. *New Microbes and New Infections*. 2020;36:100690.
73. Thegerström J, Matuschek E, Su Y-C, Riesbeck K, Resman F. A novel PBP3 substitution in *Haemophilus influenzae* confers reduced aminopenicillin susceptibility. *BMC microbiology*. 2018;18(1):1-7.
74. Atkinson CT, Kunde DA, Tristram SG. Acquired macrolide resistance genes in *Haemophilus influenzae*? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015;70(8):2234-6.
75. Roberts MC, Soge OO, No DB. Characterization of macrolide resistance genes in *Haemophilus influenzae* isolated from children with cystic fibrosis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011;66(1):100-4.
76. Seyama S, Wajima T, Yanagisawa Y, Nakaminami H, Ushio M, Fujii T, et al. Rise in *Haemophilus influenzae* with reduced quinolone susceptibility and development of a simple screening method. *The Pediatric infectious disease journal*. 2017;36(3):263-6.
77. Corkill J, Percival A, McDonald P, Bamber A. Detection of quinolone resistance in *Haemophilus* spp. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1994;34(5):841-4.
78. 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. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(1):461-6.
79. 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. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2014;20(4):250-5.
80. Su P-Y, Cheng W-H, Ho C-H. Molecular characterization of multidrug-resistant non-typeable *Haemophilus influenzae* with high-level resistance to cefuroxime,

levofloxacin, and trimethoprim-sulfamethoxazole. BMC microbiology. 2023;23(1):1-13.

81. Mohd-Zain Z, Kamsani N, Ahmad N. Molecular insights of co-trimoxazole resistance genes in *Haemophilus influenzae* isolated in Malaysia. Trop Biomed. 2013;30(4):584-90.

82. 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. Clinical Microbiology and Infection. 2020;26(7):944. e1-. e7.

83. T.C. Sağlık Bakanlığı Aşı Portalı '*Haemophilus influenzae* Tip b (Hib) Hastalığı' <https://asi.saglik.gov.tr/liste/5-haemophilus-influenzae-tip-b-hib-hastal%C4%B1%C4%9F%C4%B1-nedir.html>.

84. IOF S. Susceptibility Testing of Infectious Agents and Evaluation of Performance of Antimicrobial Susceptibility Test Devices—Part 1: Broth Micro-Dilution Reference Method For Testing the in Vitro Activity of Antimicrobial Agents Against Rapidly Growing Aerobic Bacteria Involved in Infectious Diseases. 2019.

85. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 31st ed. <https://clsi.org>.

86. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Preparation of agar plates and broth for EUCAST AST. Version 7, January 1, 2022. <http://www.eucast.org>.

87. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Disk diffusion-Reading guide v 10.0 (2 January, 2023). <http://www.eucast.org>.

88. Tenover FC, Huang MB, Rasheed JK, Persing DH. Development of PCR assays to detect ampicillin resistance genes in cerebrospinal fluid samples containing *Haemophilus influenzae*. Journal of clinical microbiology. 1994;32(11):2729-37.

89. Wang XL, Xie J, Guo YB, Zhu BQ, Shao ZJ, Guo HM, et al. Lower respiratory tract isolates of non-typeable *Haemophilus influenzae* in Western Sichuan, China: antimicrobial susceptibility, mechanisms of β -lactam resistance and decade changes. Journal of Global Antimicrobial Resistance. 2020;21:324-30.

90. Food, Administration D. Guidance for industry and FDA. Class II special controls guidance document: antimicrobial susceptibility test (AST) systems. Center for Devices and Radiological Health, Food and Drug Administration, US Department of Health and Human Services, Silver Spring, MD. 2009.

91. Ceyhan M, Ozsurekci Y, Tanır Basaranoglu S, Gurler N, Sali E, Keser Emiroglu M, et al. Multicenter hospital-based prospective surveillance study of bacterial agents causing meningitis and seroprevalence of different serogroups of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* type b, and *Streptococcus pneumoniae* during 2015 to 2018 in Turkey. MSphere. 2020;5(2):10.1128/msphere.00060-20.

92. Bertran M, D'Aeth JC, Hani E, Amin-Chowdhury Z, Fry NK, Ramsay ME, et al. Trends in invasive *Haemophilus influenzae* serotype a disease in England from 2008–09 to 2021–22: a prospective national surveillance study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2023.
93. Giufrè M, Cardines R, Marra M, Carollo M, Cerquetti M, Stefanelli P. Antibiotic Susceptibility and Molecular Typing of Invasive *Haemophilus influenzae* Isolates, with Emergence of Ciprofloxacin Resistance, 2017–2021, Italy. *Microorganisms*. 2023;11(2):315.
94. Budak F, Ocak Z, Gür D. Prevalence and Genotypic Characteristics of Beta-Lactamase Negative-Ampicillin-Resistant *Haemophilus influenzae* in a Children's Hospital in Turkey/Türkiye'de Bir Çocuk Hastanesinde Beta-Laktamaz Negatif Ampisilin Dirençli *Haemophilus influenzae*'ların Prevalansı ve Genotipik Özellikleri. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*. 2016;36(2):86.
95. TMC HACEK Çalışma Grubu *Haemophilus influenzae* Çalışmayı Sonuç Bildirgesi 28 Ekim 2022 İstanbul. <https://www.tmc-online.org/index.php?func=Content&ID=16>.
96. Wen S, Feng D, Chen D, Yang L, Xu Z. Molecular epidemiology and evolution of *Haemophilus influenzae*. *Infection, Genetics and Evolution*. 2020;80:104205.
97. Fernando S, Pang S, McKew G, Phan T, Merlino J, Coombs G, et al. Evaluation of the *Haemophilus influenzae* EUCAST and CLSI disc diffusion methods to recognize aminopenicillin and amoxicillin/clavulanate resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2020;75(9):2594-8.
98. Versporten A, Bolokhovets G, Ghazaryan L, Abilova V, Pyshnik G, Spasojevic T, et al. Antibiotic use in eastern Europe: a cross-national database study in coordination with the WHO Regional Office for Europe. *The Lancet infectious diseases*. 2014;14(5):381-7.
99. Çaycı Y, Avan T, Bilgin K, Birinci A. Alt solunum yolu örneklerinden izole edilen *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* ve *Moraxella catarrhalis* suşlarının antibiyotik duyarlılığının değerlendirilmesi. *Turkish Journal of Clinics and Laboratory*. 2019;10(3).
100. Hatice Hanım Yurttakal “Klinik Örneklerden İzole Edilen *Haemophilus* Türlerinin Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi ve Moleküler Karakterizasyonu”. Uzmanlık tezi. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kayseri 2022.
101. Nigar Miralizade “Klinik Örneklerden İzole Edilen *Haemophilus influenzae*'da Duyarlılık Testleri ve Beta-laktamaz Direnç Mekanizmalarının Fenotipik, Genotipik Yöntemlerle Saptanması”. Yüksek Lisans tezi. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, İstanbul 2022.

102. Gür H, Hazirolan G. *Haemophilus influenzae* suşlarının antibiyotik duyarlılık profillerinin ve beta-laktamaz aktivitesinin araştırılması. ANKEM Derg. 2020;34(1):18-24.
103. Beşli Y, Karatuna O, Akyar I. 2012-2014 yıllarında alt solunum yolu örneklerinden izole edilen *Streptococcus pneumoniae* ve *Haemophilus influenzae* suşlarında antibiyotiklere duyarlılığın yıllara ve yaş gruplarına göre değerlendirilmesi. ANKEM Derg 2015;29(3):114-121.
104. Alışkan H, Çolakoğlu Ş, Göçmen J. Solunum yolu örneklerinden izole edilen *Streptococcus pneumoniae* ve *Haemophilus influenzae* suşlarının antibiyotiklere dirençlerinin belirlenmesi. Cukurova Med J 2016;41(2):201-207.
105. Kiedrowska M, Forys WJ, Gołębiewska A, Waśko I, Ronkiewicz P, Kuch A, et al. Antimicrobial resistance among *Haemophilus influenzae* isolates responsible for lower respiratory tract infections in Poland, 2005–2019. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2022;41(6):961-9.
106. Taha A, Adeline F, Taha M-K, Deghmane A-E. *Haemophilus influenzae* drug resistance in France from 2017 to 2021: consideration for treatment of otitis media. Journal of Global Antimicrobial Resistance. 2022;31:222-7.
107. Tønnessen R, García I, Debech N, Lindstrøm JC, Wester AL, Skaare D. Molecular epidemiology and antibiotic resistance profiles of invasive *Haemophilus influenzae* from Norway 2017–2021. Frontiers in Microbiology. 2022;13:973257.
108. Soyletir G, Altinkanat G, Gur D, Altun B, Tunger A, Aydemir S, et al. Results from the survey of antibiotic resistance (SOAR) 2011–13 in Turkey. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2016;71(suppl_1):i71-i83.
109. Torumkuney D, Tunger A, Sancak B, Bıçakçığıl A, Altun B, Aktas Z, et al. Results from the Survey of Antibiotic Resistance (SOAR) 2015–17 in Turkey: data based on CLSI, EUCAST (dose-specific) and pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) breakpoints. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2020;75(Supplement_1):i88-i99.
110. 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*. Microbial drug resistance. 2016;22(4):247-52.
111. 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. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2004;48(5):1509-14.
112. Jacobs MR, Felmingham D, Appelbaum PC, Grüneberg RN. The Alexander Project 1998–2000: susceptibility of pathogens isolated from community-acquired

respiratory tract infection to commonly used antimicrobial agents. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2003;52(2):229-46.

113. Altun B, Gür D. Hacettepe Üniversitesi Çocuk Hastanesi'nde Klinik Örneklerden İzole Edilen *Haemophilus influenzae* Suşlarının Antibiyotiklere Direnç Durumu (2002-2007)/Antimicrobial Resistance in *Haemophilus influenzae* Strains Isolated From Various Clinical Samples in Hacettepe University Children's Hospital (2002-2007). Çocuk Enfeksiyon Dergisi. 2008;2(2):50.