T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS

# KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN HAEMOPHİLUS İNFLUENZAE DUYARLILIK TESTLERİ VE BETA-LAKTAMAZ DİRENÇ MEKANİZMALARININ FENOTİPİK, GENOTİPİK YÖNTEMLERLE SAPTANMASI.

NİGAR MİRALİZADE

DANIŞMAN
PROF. DR. NEVRİYE GÖNÜLLÜ

TİBBİ MİKROBİOLOJİ ANABİLİM DALI
MİKROBİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İSTANBUL-2022

**TEZ ONAYI**

| Doküman No | İlk Yayın Tarihi | Revizyon No | Revizyon Tarihi | Sayfa No |
|---|---|---|---|---|
| 414.1.17F | 04.03.2020 | 00 | 00.00.0000 | 1/1 |

Bu çalışma 09.06.2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ

Prof Dr. Nevriye GÖNÜLLÜ
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Prof Dr. Ömer KÜÇÜKBASMACI
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Özden BORAL
İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi

# İTHAF

Ablam Afer MİRALİZADE'ye ithaf ediyorum.

# TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitim hayatım boyunca benimle bilgi ve tecrübelerini paylaşan ve yardımlarını esirgemeyen değerli ve dikkatli hocam Anabilim dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Ömer KÜÇÜKBASMACI'ya teşekkür ederim.

Bana deneyimleri ile her zaman yol gösteren, tez çalışmamın her aşamasında bilgi birikimini ve mesleki tecrübesini benden esirgemeyen sabırını, sevgisini, manevi desteğini ve güvenini her zaman hissettiğim değerli danışman hocam Prof. Dr. Nevriye GÖNÜLLÜ'ye teşekkür ederim.

Eğitimim süresince deneyimlerinden yararlandığım, üzerimde emeği bulunan Anabilim Dalımızın değerli öğretim üyeleri, Sayın Prof. Dr. Bekir S. KOCAZEYBEK, Prof. Dr. ARİF KAYGUSUZ, Prof. Dr. Kenan MİDİLLİ, Prof. Dr. Hrisi BAHAR TOKMAN, Prof. Dr. Fatma KÖKSAL ÇAKIRLAR, Prof. Dr. Sevgi ERGİN, Doç. Dr. ERDAL POLAT, Doç. Dr. Suat SARIBAŞ, Doç. Dr. Mert Ahmet KUŞKUCU'ya, teşekkür ederim.

Tez sürecinde yoğun desteklerini gördüğüm, yaşamımda maddi manevi hep yanımda olan PhD. Sinem ÖZDEMİR, MSc Huriye yıldız ve MSc Zeynep YAZGAN'a teşekkür ederim.

Hayatımın her anında yanımda olan, güvenlerini, desteklerini bana hissettiren annem Ragiba CAHANGİROVA, babam Sadig MAMMADOV, ablam Gülnar MİRALİZADE KAYA, kardeşim Muhammad MAMMADLİ'ye teşekkür ederim.

Ayrıca eniştem Emre KAYA, hayatımı güzelleştirdikleri, bana sabır ve sevgi gösterdikleri için yeğenlerim Muhammad Emir KAYA ve Meva Meryem Kaya'ya teşekkür ederim.

Zorlu geçen dönemlerimde beni yalnız bırakmayan manevi desteklerini ve güler yüzlerini benden esirgemeyen dostum Ofelia İSMAYILOVA, sevgili arkadaşlarım MSc Özge AKSU, YLÖ Özge KURT, YLÖ Rüveyda AKÇIN, YLÖ Neşe ARSLAN, MSc Metin YALÇIN' a teşekkür ederim.

Tez süresince bana her zaman yardım eden, destek olan ve yanımda olduğunu hissettiren sevgili PhD. Zeynep GÜNGÖRDÜ DALAR'a teşekkürlerimi bildiriyorum.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2019-33645

# İÇİNDEKİLER

İTHAF ..... İİİ
TEŞEKKÜR ..... İV
İÇİNDEKİLER ..... İ
TABLOLAR LİSTESİ ..... İİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... İV
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... V
ÖZET ..... Vİİ
ABSTRACT ..... Vİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ ..... 1
2. GENEL BİLGİLER ..... 4
2.1 Hemofilusların Sınıflandırılması ve Morfolojik Özellikleri ..... 4
2.2. *Haemophilus influenzae.*Tarihçe ..... 6
2.3. *Haemophilus influenzae* ..... 7
2.3.1 Morfoloji ..... 7
2.3.2. Kültür ..... 7
2.4. Patogenez ..... 7
2.5. Epidemiyoloj ..... 7
2.6. Klinik Tanı ..... 9
2.7. Laboratuvar Tanı ..... 10
2.7.1. *Haemophilus influenzae* Suşlarının Tanısı ..... 10
2.7.2. Serotiplendirilme ..... 10
2.8. Antibiyotik Direnci ..... 10
2.8.1. Beta-laktamaz Direnci ..... 10
2.8.2. Penisilin Bağlayan Proteinlerdeki Değişikliklere Bağlı Direnç ..... 12
2.9. Tedavi ve Korunma ..... 12
2.9.1 Tedavi ..... 12
2.9.2. Korunma ..... 13

3. GEREÇ VE YÖNTEM ..... 14
3.1. Bakteri İzolatları ..... 14
3.1.1. İzolatların Çalışılması ..... 14
3.1.2. X ve V faktörü ile suşların doğrulanması ..... 14
3.1.3. Serotiplendirmenin Yapılması ..... 14
3.2. Antibiyotik testleri ..... 14
3.2.1. Nitrosefin testi ..... 16
3.2.2. Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değerlerinin belirlenmesi ..... 16
3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ..... 17
3.3.2. PCR Protokolu ..... 18
3.3.3 PCR siklusları ..... 19
4. BULGULAR ..... 20
4.1 Çalışmaya alınan suşlar ..... 20
4.2 Örneklerin Dağılımı ..... 20
4.3 Serotiplendirme ..... 21
4.4 PCR sonuçlarının değerlendirilmesi ..... 22
4.5. Antibiyotik Sonuçları ..... 24
4.6. Çoğul direnç ..... 26
4.7. EUCAST tarama disk testinin ve E test striplerinin değerlendirilmesi ..... 26
5. TARTIŞMA ..... 28
6. SONUÇ VE ÖNERİLR ..... 34
KAYNAKLAR ..... 35
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI ..... 52

# TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1. *Haemophilus* cinsi bakterilerin ayırt edici özellikleri gösterilmişdir ..... 5
Tablo 3-1. *Haemophilus influenzae* kullanılan primer çiftleri ..... 18
Tablo 4-1. *Haemophilus influenzae* kökenlerin örnek tiplerine göre dağılımı ..... 20
Tablo 4-2. Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları ..... 26
Tablo 4-3 BLNAR ve BLPAR Haemophilus influenzae suşlarının beta-laktam, PCR ve hastaların demografik bilgileri ..... 27

# ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 3-1. Disk Difüzyon Yöntemi Antibiyotik duyarlılık testi..... 15
Şekil 3-2. E test Yöntemi ile Antibiyotiklerin MİK değerlerinin belirlenmesi ..... 17
Şekil 4-1. *Haemophilus influenzae* serotip tayini ..... 21
Şekil 4-2. Beta-laktamaz pozitif ampisilin dirençli kökenlerin TEM-1 primerleri kullanılarak yapılan PCR sonuçları ..... 23
Şekil 4-3. Beta-laktamaz pozitif ampisilin dirençli kökenlerin ROB-1 primerleri kullanılarak yapılan PCR sonuçları ..... 23
Şekil 4-4. Beta-laktamaz negatif ampisiline dirençli kökenlerin PBP primerleri ile yapılan PCR sonuçları ..... 24

## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

**AM:** Ampisilin

**AMC:** Amoksisilin klavulanik asit

**CRO:** Seftriakson

**CPD:** Sefpodoksim

**CXM:** Sefuroksim

**CFM:** Sefiksim

**NA:** Nalidiksik Asid

**TE:** Tetrasiklin

**ATCC:** American Type Culture Collection

**BAL:** Bronkoalveolar lavaj

**MDR:** Multidrug-resistant

**KOAH:** Kronik obstrüktif akciğer hastalığının

**KF:** Kistik fibroz

**DSÖ:** Dünya Sağlık Örgütü

**D:** Değisken

**KKA:** Koyun Kanlı Agar

**IgA:** İmmunglobulin A

**HIV:** Human Immunodeficiency Virus

**U:** Unit

**ETA:** Endotrakeal aspirat

**EUCAST:** European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

**CDC:** Centers for Disease Control and Prevention

**CLSI:** Clinical and Laboratory Standarts Institute

**DNA:** Deoksiribo nükleik asit

**E-test:** Epsilometer test

**NTHi:** Non-typeable Haemophilus influenzae

**µl:** Mikrolitre

**mg:** Miligram

**µm:** Mikrometre

**PCR:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu

**PBP:** Penisilin Bağlayan Protein

**SOAR:** Survey of Antibiotic Resistance

**PROTECT:** Prospective Resistant Organism Tracking and Epidemiology for the Ketolide Telitthromycin

# ÖZET

MİRALİZADE, N. (2022). Klinik örneklerden izole edilen *Haemophilus influenzae* duyarlılık testleri ve beta-laktamaz direnç mekanizmalarının fenotipik, genotipik yöntemlerle saptanması. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvar'ında çalışılan 60 *H. influenzae* kökeni fenotipik yöntemlerle idantifiye edildi. Serotiplendirilmesi lam aglütinasyon yöntemi ile yapıldı. Antimikrobiyal ilaçlara duyarlılıkları EUCAST kriterlerine uygun olarak disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. BLNAS'ı BLNAR izolatlarından ayırmak için Benzilpenisilin diski (1 U) tarama testi yapılarak dirençli olan suşlar ileri incelemeye alındı. Antibiyotik duyarlılık testleri ve TEM-1, ROB-1, *ftsl* genleri için PCR yapıldı.

Çalışılan 60 *H. influenzae* sekiz (%13,3) tip a, 25 (%41,7) tip b, 14 (%23,3) tip d, dörd (%6,7) tip f olarak tiplendirilmiş olup kalan dokuz (%15) köken tiplendirilememiştir. 60 *Haemophilus influenzae* kökenleri amoksisilin klavulanik aside %100 duyarlı olarak tespit edilmiştir. Ampisilin %10, sefuroksim %13,3, seftriakson %10, sefpodoksim %8,3, sefiksim %8,3, nalidiksik asid %8,3, tetrasiklin %6,7 dirençli olarak bulunmuştur. Beta-laktamaz pozitif ampisiline dirençli dört kökende TEM-1 beta-laktamaz tespit edildi. Çalışmamızda ROB-1 enzimi bulunmamıştır.

Sonuç olarak hastanemizden izole edilen *H. influenzae* suşlarında amoksisilin klavulanik asid, sefpodoksim ve sefiksime (<%90) hala düşük düzeylerde direnç olduğunu, beta laktamaz pozitif, ampisiline dirençli suş sayısında artış olmadığını göstermektedir. Bu çalışma da ROB-1 genini taşıyan *H. influenzae* suşu bulunmaması sevindirici bir durumdur. Ayrıca moleküler çalışmalarından elde edilen bilgilere göre PCR ile PBP3 negatif bulunan bazı BLNAR *H. influenzae* suşları, PBP3 geninde mutasyon meydana gelmiş olabileceğine veya daha önce tanımlanamayan bir enzimin sorumlu olduğunu düşündürmektedir. Bu hipotezi desteklemek için daha geniş çaplı araştırmalar yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: *ftsI, Haemophilus influenzae*, PBP-3, ROB-1, TEM-1

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TYL-2021-35163

## ABSTRACT

MİRALİZADE, N. (2022). Susceptibility tests for Haemophilus influenzae isolated from clinical specimens and determination of beta-lactamase resistance mechanisms by phenotypic and genotypic methods. Istanbul University-Cerrahpaşa Graduate Education Institute, Department of Medical Microbiology. Master Thesis. Istanbul.

60 *H. influenzae* strains studied in Istanbul University-Cerrahpaşa Medical Faculty Microbiology Laboratory were identified by phenotypic methods. Serotyping was done by slide agglutination method. Their susceptibility to antimicrobial drugs was determined by disc diffusion method in accordance with EUCAST criteria. Benzylpenicillin disk (1 U) screening test was performed to distinguish BLNAS from BLNAR isolates and this was further confirmed for BLNAR with *ftsI* sequencing. Beta-lactamase enzymes involved in resistance to beta-lactam antibiotics in ampicillin-resistant isolates were determined by PCR method. Studied of the type a 60 H. influenzae 13.3%, type b 41.7% and 41.7%, 23.3 were typed as type d, 6.7% were typed as type f, and the remaining 15% strains could not be typed.

60 Haemophilus influenzae strains were identified as 100% susceptible to amoxicillin clavulanic acid. Ampicillin 10%, cefuroxime 13.3%, ceftriaxone 10%, cefpodoxime 8.3%, cefixime 8.3%, nalidixic acid 8.3%, tetracycline 6.7% were found as resistant. TEM-1 beta-lactamase was detected in four beta-lactamase positive ampicillin-resistant strains. ROB-1 enzyme was not found in our study. As a result, it shows that amoxicillin/clavulanic acid, cefpodoxime and cefixime (<90%) are still at low levels in H. influenzae strains isolated from our hospital, and there is no increase in the number of beta-lactamase positive, ampicillin-resistant strains. It is pleasing that there isn’t H. influenzae strain carrying the ROB-1 gene in this study. In addition, according to the information obtained from molecular studies, some beta-lactamase-negative H. influenzae strains that are PBP3 negative suggest that a mutation occurs in the PBP3 gene or that a previously unidentified enzyme is responsible. The more extensive research is needed to support this hypothesis.

Keywords: *ftsI, Haemophilus influenzae*, PBP-3, ROB-1, TEM-1

This work was supported by the Scientific Research Projects Unit of Istanbul University. Project No: TYL-2021-35163

# 1. GİRİŞ VE AMAÇ

*Haemophilus influenzae* Gram negatif, sporsuz, hareketsiz kokobasil şeklinde insan ve hayvanların mukozal yüzeyinde kolonize halde bulunan bakterilerdir [1]. Polisakkarit kapsülün varlığına veya yokluğuna göre tiplendirilebilir ve tiplendirilemeyen suşlara ayrılır. Kapsüllü olan tiplendirilebilir suşlar, polisakkarit kapsüllere karşı antiserumlar ile reaksiyona girmelerine göre altı serotipe (a-f) sınıflandırılır. Polisakkarit kapsülü, *H. influenzae*'nın ana virülans faktörlerinden biridir. Bakterinin kapsülü bakteriyi nötrofiller tarafından opsonizasyona karşı korunmasında yardımcı olur ve buda kapsüllü suşların daha virülant olmasını sağlar.

Hi serotip b (Hib) daha çok invazif enfeksiyonlarla ilişkilendirilmiştir. Dünya genelinde invazif Hib hastalığı özellikle çocuklarda önemini korumaktadır. Bununla birlikte, 1980'lerde ve 1990'larda Hib aşılamasını yapmaya başlayan ülkeler invazif Hib vakalarının insidansını göze çarpacak derecede azaltmıştır. Aşılamadan sonra yaşlılarda ve yenidoğan çocuklarda NTHi enfeksiyonlarında artış olduğu gözlemlenmiştir [2].

*H. influenzae*'ye karşı ana tedavi, beta-laktamların bir üyesi olan ampisilindir [3]. İlk ampisiline direnç 1972'de bildirilmiş ve CDC tarafından onaylanmıştır [4]. Zamanla *H. influenzae* enfeksiyonunun tedavisi için ikinci veya üçüncü kuşak sefalosporinler veya kinolonlar daha uygun seçenek olmuştur [2]. Ancak *H. influenzae* amoksisilin-klavulanat, florokinolonlar, ikinci veya üçüncü kuşak sefalosporinler ve makrolidlere karşı direnç geliştirdiğinden, klinisyenler antibiyotik seçiminde daha dikkatli olmalıdır. Bu nedenle gerekirse karbapenemlerin kullanımı veya kombinasyon tedavisi ampirik olarak düşünülebilir [5].

Genellikle üç veya daha fazla antimikrobiyal gruplarından en az bir ajana karşı direnç olarak tanımlanan çoklu ilaca dirençli (MDR) *H. influenzae* [6], ilk olarak 1980'de Batı Almanya'da rapor edilmiştir [7]. Bu raporda, iki suş ampisilin, kloramfenikol ve tetrasikline duyarlı değildi. MDR *H. influenzae*'nın ortaya çıkışı, dünya çapında halk sağlığı yetkilileri, tıp toplulukları ve araştırmacılar arasında yaygın bir endişeye neden olmuştur. Risk faktörlerini, yeterli yönetim kontrolünü, önlemeyi ve edinilmiş MDR aktivitesinin altında yatan mekanizmaları belirlemeye yönelik çok çaba sarf edilmiştir [8-10].

NTHi enfeksiyonların da ilk tedavi seçeneği olarak beta-laktamlar kullanılmıştır. Bununla birlikte, son yıllarda, beta-laktamlara dirençli suşlar tüm dünyada yaygınlaşmıştır [11].

*H. influenzae'*da en önemli direnç beta-laktam antibiyotiklerine karşı direnci oluşturan beta-laktamaz üretimidir. TEM-1 veya ROB-1 tip beta-laktamaz üretimi beta-laktamlara karşı direncin artmasına neden olur. En yaygın olan beta-laktamaz TEM-1'dir, bazen ise ROB-1 görülür. Beta-laktamaz üreten suşlar, aminopenisilinlere dirençli olup, sefaklora duyarlılığı ise azdır. TEM-1 beta laktamaz aktivitesi nitrosefin yöntemiyle belirlenir. İkinci direnç ise septal peptidoglikan sentezinde yer alan ve *ftsI* geni tarafından kodlanan penisilin bağlayıcı protein 3'ün (PBP3) afinitesinin azalmasına dayanır. Bunlar beta-laktamaz-negatif ampisiline dirençli (BLNAR) suşlardır. İkinci mekanizma tarafından direnç, *ftsI* genindeki tipine ve mutasyonların sayısına göre penisilinler, penisilin ve penisilinaz inhibitörleri, sefalosporinler ve karbapenemleri etkiliyor [12, 13].

Hib, menenjit ve sepsis dahil olmak üzere yüksek invaziv Hib enfeksiyonlarına neden olan serotiptir. Hib aşısı 1980'lerin sonlarında ve 1990'ların başlarında ülkelerde tanıtılmaya başlandı. Buna karşılık, Hib aşısı tarafından hedef alınmayan diğer *H. influenzae* ve NTHi serotipleri şu anda enfeksiyonların önemli nedenleri olarak kabul edilmektedir. Özellikle, NTHi, sağlıklı bireylerde üst solunum yollarında yaygın bir bakteridir. Çocuklarda orta kulak iltihabı (OM), konjonktivit, sinüzit ve alt solunum yolu enfeksiyonları dahil olmak üzere çok sayıda akut ve kronik solunum yolu enfeksiyonlarından sorumludur; yetişkinlerde kronik obstrüktif akciğer hastalığının (KOAH) ve kistik fibrozun (KF) alevlenmesi ve yenidoğanlarda, bağışıklığı baskılanmış yetişkinlerde ve yaşlılarda sepsisten sorumludur. Ek olarak, ampisiline dirençli *H. influenzae* ile birlikte *H. influenzae'*nın antimikrobiyal direnci artmaktadır ve DSÖ'nün acilen ihtiyaç duyulan yeni antibakteriyel ajanların küresel öncelik listesinde yer almaktadır. Ayrıca son yıllarda florokinolonlara dirençli *H. influenzae* sayısı çarpıcı bir şekilde artmış ve dünya çapında yayılmıştır [14].

Mevcut antimikrobiyal direnç krizini kontrol etmeye yönelik önemli bir girişim, beta-laktamaz ve karbapenemaz inhibitörlerinin geliştirilmesidir [15].

Antibiyotik direncinin artması tedavi protokollerinde antibiyotiklerin güncellenmesini gerektirir. Bunun için hastanemizde farklı klinik örneklerden izole edilen *H. influenzae* suslarının antibiyotik duyarlılıklarına bakılacak ve ampisiline

dirençli suşlarda beta-laktamaz enzimlerinden sorumlu olan TEM-1, ROB-1 genleri ve PBP3 üretiminden sorumlu *ftsl* genleri polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile araştırılacaktır.

# 2. GENEL BİLGİLER

## 2.1 Hemofilusların Sınıflandırılması ve Morfolojik Özellikleri

*Pasteurellaceae* ailesinde *Haemophilus, Actinobacillus, Aggregatibacter* ve *Pasteurella* olmak üzere dört önemli cins vardır. *Haemophilus* bakterileri, *Pasteurellaceae* ailesindeki çok çeşitli hastalıklardan insanların mukoz membranlarında bulunan küçük gram negatif pleomorfik ve fakültatif anaerobik çomaklardır [16].

*Haemophilus* türleri yaşamı tehdit eden invazif hastalıklardan, solunum yolu enfeksiyonlarına kadar geniş bir patojenite yelpazesine neden olur.

*Haemophilus parainfluenzae*, ağız boşluğu ve farenksin tüm alanlarında en bol bulunan ve fırsatçı enfeksiyonlardan sorumlu olarak bilinen aktif türlerden biridir. *Haemophilus ducreyi* , cinsel yolla bulaşan hastalıkların önde gelen nedenidir ve şankroide neden olur. *Pasteurellaceae* türleri arasında en önemli fırsatçı insan patojeni *H. influenzae'*dır. *H. influenzae* serotip b aşısı, invazif *H. influenzae* hastalığının yükünü önemli ölçüde azaltmasına rağmen, aşılanmamış çocuklar risk altındadır. Kapsüllsüz *H. influenzae* suşları, yaygın çocukluk çağı enfeksiyonlarına ve kronik obstrüktif akciğer hastalığına neden olabilir [17].

Üreaz, hemoliz, katalaz, galaktosidaz, laktoz, ornitin dekarboksilaz üretimi *Haemophilus* türlerini tanımlamak için kullanılan yardımcı fenotipik özelliklerdir. Bununla birlikte, bu tür fenotipik özellikler, türlerin hem tür içinde hem de türler arasında yanlış tanımlanmalara neden olabilmektedir [18].

X ve V faktörü ve biyokimyasal etkinliğine göre sınıflandırılması Tablo 2-1'de gösterilmiştir.

**Tablo 2-1. Haemophilus cinsi bakterilerin ayırt edici özellikleri**

| | ÜREME FAKTÖRLERİ | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Organizma** | **X** | **V** | **üreaz** | **hemoliz** | **Katalaz** | **galaktoz** | **laktoz** | **Ornitin Dekarboksilaz** |
| *H. influenzae* | + | + | D | - | + | - | - | D |
| *H. aegyptius* | + | + | + | - | + | - | - | - |
| *H.haemolyticus* | + | + | + | + | + | - | - | - |
| *H.parainfluenzae* | - | + | D | D | D | D | - | D |
| *H.parahaemolyticus* | + | - | + | + | D | + | - | - |
| *H.paraphrohaemolyticus* | - | + | + | + | D | + | - | - |
| *H. sputorum* | - | + | + | + | D | + | - | - |
| *H. pitmaniae* | - | + | - | + | D | + | - | - |
| *H. ducreyi* | + | - | - | D | - | - | - | - |

D= Değisken

*Haemophilus* türlerinin sınıflandırılmasında karbonhidrat kullanımı ve gaz üretimi de kullanılmaktadır. *H. ducreyi* dışındaki tüm *Haemophilus* türleri glukozdan gaz üretir.

Katalaz ve oksidaz *Haemophilus* türlerinin ayrımında önemlidir. *H. aphrophilus* ve *H. ducreyi* oksidaz negatif iken *H. influenzae* oksidaz pozitiftir.

## 2.2. *Haemophilus influenzae.*Tarihçe

**1883:** İlk kez Robert Koch, Mısır'da konjunktival materyalinde olan ve günümüzde *H. aegyptius* olarak bilinen bakteriyi tespit etti.

**1889-1909:** Slawyk, *H. influenzae*'nın neden olduğu menenjit vakalarını bildirdi ve Cohen, 1909'da menenjit hastaları üzerine beyin omurilik sıvısından *H. influenzae* üretti.

**1892:** Richard Pfeiffer Avrupa influenza pandemisinde ölen hastaların balgam örneklerinden ilk kez *H. influenzae* izole etmiştir**.** Bu kokobasiller aynı zamanda Pfeiffer basili olarak da adlandırılmışdır.

**1919:** Pritchett ve Stillman, X ve V faktörlerini gerektiren ve hemolize neden olan gram-negatif basili keşfettiler.

**1920:** Amerikan Bakteriyoloji Derneği, bakterinin adını ihtiyaç duyduğu faktörlerden esinlenerek *H. influenzae* olarak değiştirmiştir.

**1935:** Fothergill ve Wright, *H. influenzae* Hib hastalığının yaş ile serum antikor seviyeleri arasındaki ilişkisini tanımlamıştır.

**1950:** Kloramfenikolün kullanımı Hib enfeksiyonlardan ölüm oranını azalttığı gösterilmiştir.

**1974:** Peltola Finlandiya'da yapılan bir aşı çalışmasında PRP'nin Hib enfeksiyonuna karşı 18 aylıktan büyük 100.000 çocuk üzerinde koruyucu olduğunu göstermiştir.

**1980:** *H. influenzae* aşılama çalışmaları ile ilgili yayınlarda oliribozil ribotil fosfatın (PRP) 18 aylıktan küçük çocuklarda immünojeniteyi artırmak için çeşitli proteinlere konjuge edilmesi gerektiği gösterilmiştir.

**1986-1987:** Polisakkarit-difteri toksoid (PRP-D) konjugatı deneysel olarak bebeklerin %50'sine uygulandı.

**1988-89:** Tüm bebeklerin %50'si PRP-D ile ve %50'si başka bir konjuge aşı olan CRM197 oligosakkarit protein konjugatı (HbOC) ile aşılanmıştır.

**1990:** Üçüncü bir konjuge aşı olan polisakkarit tetanoz toksoid (PRP) -T) tüm bebeklere rutin olarak verilmiştir.

**2007:** Ülkemizde *H. influenzae* tip b'ye karşı aşı rutin aşılama takvimine dahil edilmiştir.

[19-33].

## 2.3. *Haemophilus influenzae*

### 2.3.1 Morfoloji

*H.influenzae* genellikle pleomorfik, uzun filamentli formlarda ve kokobasil gibi görülebilir. Tedavi edilmemiş *H. influenzae* menenjitinin beyin omurilik sıvısından (BOS) yapılan preparatlarda çeşitli şekillerde (kokoid, kokobasil, kısa çomak, uzun çomak, filamantöz) bulunabilir [34].

### 2.3.2. Kültür

*H. influenzae*, aerob veya fakültatif anaerob bakteridir. Adi besiyerlerinde üreyemez. Aerob koşullar altında üremesi için ortamda X ve V faktörlerini gereksinim duyarlar [35].

Çikolatamsı agar üzerinde bu bakterilerin kapsüllsüz türlerinin kolonileri genellikle grimsi renktedir, şeffaf pürüzsüz bir yüzeye ve dışbükey görünüme sahiptir. [36, 30].

*H. influenzae* 37°C'de ve 7,4-7,6 pH'ta iyi büyür ve % 5-10 $CO_2$ ortamına ihtiyaç duyar [37].

## 2.4. Patogenez

Bu bakteriler, bir kişinin üst solunum yolunun mukoza zarını kolonize eder, lokal olarak yayılabilir, orta kulak iltihabı ve sinüzit gibi hastalıkların yanı sıra alt solunum yolunda bronşit ve zatürreye neden olur. Hib, nadiren üst solunum yolunda aşılanmamış çocuklarda görülür ve menenjit, epiglotit (obstrüktif larenjit), selülit gibi hastalıklara neden olur [38, 39].

## 2.5. Epidemiyoloj

Hib aşısının piyasaya sürülmesinden önce, *H. influenzae* enfeksiyonlarının %95'den fazlasının Hib'den kaynaklandığı gösterilmiştir [40]. *H. influenzae* nadiren konjonktival ve genital yolu mukozasını kolonize eder [16]. Birçok popülasyonda, çocukların aşılanmasından sonra oluşan antikorlar nedeniyle Hib önemli ölçüde azalmıştır [41-43]. Hib sistemik hastalığa neden olmasına rağmen *H. influenzae* aşısı uygulanmadan önce de sağlıklı çocuklarda nadiren izole edildiği bilinmektedir [44, 45].

**Risk faktörleri**

Özellikle Hib enfeksiyonlarında hastalığa zemin hazırlayan konakçı ve çevresel faktörler vardır.

**Konak faktörleri**

**Yaş:** Antikor titreleri 3-6 aylıkken minimuma ulaşır ve daha sonra Hib veya çapraz reaksiyona giren antijenlere sahip diğer mikroorganizmalarla doğal temasla yükselir. Hib insidansı orta ve erken çocukluk döneminde en yüksektir. Hib öncelikle 3 ay ile 5 yaş arasındaki çocuklarda görülmektedir. İnvaziv hastalık riskinin en yüksek olduğu dönem 6 ila 23 aydır [46].

**Cinsiyet:** Genel olarak, Hib enfeksiyonları için cinsiyet dağılımı, pnömoni ve epiglottit dışında aynıdır [47].

**Genetik:** Eskimolar ve Amerikan Yerlilerinde Hib enfeksiyonu insidansı yüksektir. Ancak bu durumun kalabalık bir ortamda kötü hijyenik koşullarda yaşama ile ilişkili olması mümkündür [48].

**Çevresel Faktörler**

**Kalabalık Faktörü:** ABD'deki araştırmalar, kalabalık faktörlerinin Hib enfeksiyonu insidansını artırdığını göstermiştir. Ailede yaşayan insan sayısına (özellikle erkek ve kız kardeş sayısının çokluğuna) ve evdeki oda sayısının az olmasına bağlıdır. Kreşe ve anaokullarına devam eden çocuklarda hastalık riski artdığı gözlemlenmiştir [49].

**Üst solunum yolu viral enfeksiyonları:**

Solunum salgılarının üretimini ve dağılımını artırarak *H. influenzae* enfeksiyonunun gelişmesine zemin hazırlar [49].

**Anne sütü:** Emzirme, 6 aylıktan küçük bebeklerde invaziv *H. influenzae* hastalığına karşı %90'ın üzerinde koruma sağlar; bu muhtemelen anne sütündeki antikorların nazofarenkste *H. influenzae* kolonizasyonuna karşı profilaktik etkisinden kaynaklanmaktadır [47].

**Sigara:** Sigara dumanına ve diğer solunum yolu tahriş edici maddelere maruz kalma, hava yolu kolonizasyonunu teşvik ederek invaziv *H. influenzae* hastalığı riskini artırır [47].

### 2.6. Klinik Tanı

**a. Menenjit:** *H. influenzae* menenjit vakalarının çoğu, 3 ila 36 aylık çocuklarda görülür ve enfeksiyon oranları yaklaşık 6-7 ayda zirveye ulaşır [50]. Ancak konjuge aşıların kullanıma girmesiyle bu durum değişmiştir. Menenjit genellikle, bağışıklığı olmayan hastalarda mikroorganizmaların nazofarenksten kan dolaşımına yayılmasının bir sonucu olarak ortaya çıkar. En sık görülen semptomlar ateş ve merkezi sinir sisteminin fonksiyonlarındaki değişikliklerdir. Hastalık ilerledikçe konvülsiyonlar veya koma gelişebilir; Bu bazen hızlı ölüme neden olabilir. Uygun tedavi ile mortalite %5'in altında kalır ve geri dönüşü olmayan sonuçlar nadiren ortaya çıkmaktadır [34, 51].

**b. Epiglottit:** Subraglotik bölgede Hib selülit sonucu oluşur. Epiglottit akut hava yolu obstrüksiyonu (4-6) sonucu hızla gelişen hastalıktır. *H. influenzae* menenjitinin aksine erişkinlerde de görülebilmektedir. Nefes darlığı, yutma güçlüğü ve yorgunluk önemli bulgulardan bazılarıdır. Uygun tedavi olmadığında ani ölüm meydana gelebilir. Ölüm sadece hava yolu obstrüksiyonuna bağlı olmayıp, akut sepsis sonucu da oluşabilir. Aşının kullanıma girmesiyle epiglotit insidansı önemli ölçüde azalmıştır [34, 51].

**c. Pnömoni:** Kış aylarında 4 ila 48 aylık çocuklarda Hib kaynaklı pnömoni görülmektedir. Sağlıklı insanların solunum yollarının florasında bulunan kapsüllü suşlar arasında a, c, d veya e serotipleri doğal olarak oluşsa da bazen enfeksiyonlara neden olabilmektedir [40, 52].

**d. Bakteriyemi:** Hib'nin neden olduğu hastalık tablosunda, çocuklar toksik bir görünüme sahiptir ve enfeksiyon odağı olmadan bakteriyemi gelişebilmektedir. En sık 6-36 aylık bebeklerde görülür. Ateş, iştahsızlık ve uyuşukluk yaygındır. Bu kişiler için erken teşhis ve tedavi çok önemlidir. [53, 47].

**e. Septik Artrit:** *S. aureus* kaynaklı artrit ile küçük çocuklarda oluşan Hib kaynaklı artrit birbirinden tamamen ayırt edilemez. Enfeksiyon özellikle kalça ekleminde ve büyük eklemlerde kendini gösterir. Hastalık genellikle pediatrik yaş grubunda görülür ve nadiren erişkinlerde ve daha büyük çocuklarda görülür [34].

Bu hastalıklara ek olarak Hib perikardit, orbital sellülit, endoftalmi, idrar yolu enfeksiyonları, yenidoğan sepsisi, şant enfeksiyonları, beyin apsesi, epididimit, akciğer apsesi ve bakteriyel trakeite neden olur [54].

### 2.7. Laboratuvar Tanı

#### 2.7.1. *Haemophilus influenzae* Suşlarının Tanısı

*H. influenzae*, %5 $CO_2$'li etüvde 37 °C'de çikolatamsı agar üzerinde 24-48 saat sonra pürüzsüz kenarlı, S-şekilli koloniler oluşturur. *H. influenzae* X ve V faktörüne gereksinim duyarlar. Bu yüzden diğer *Haemophilus* türlerinden ayırt etmek için besiyerine X ve V faktörleri içeren diskler eklenebilmektedir. Gram boyamada, gram-negatif kokobasiller 0.3-0.5 mikron genişliğinde ve 0.5-2.0 mikron uzunluğunda gram negatif yuvarlak çift kısa zincirler ve kümeler gözlenmektedir.

#### 2.7.2. Serotiplendirilme

Lam aglütinasyon testi *H. influenzae* için yapılan klasik serotiplendirme yöntemidir. Kapsüle özgü antiserumlar kullanılarak kapsüllü Hia-Hif suşları altı farklı serotipe ayrılmaktadır [55].

### 2.8. Antibiyotik Direnci

Antimikrobiyal direnç gelişimi tedavide önemli bir konudur. Bazı *Haemophilus* suşları konjugatif plazmitler kazanmalarından dolayı ampisilin, beta-laktam antibiyotikler, kloramfenikol ve tetrasiklinlere karşı direnç kazanmıştır [56, 57].

#### 2.8.1. Beta-laktamaz Direnci

*H. influenzae*'daki yaygın direnç mekanizması penisilin sınıfı beta-laktamları hidrolize eden dar spektrumlu beta-laktamazların üretimidir [58]. ROB-1 ve TEM-1, *H. influenzae*'da bulunan ampisilin ve diğer aminopenisilinlere yüksek düzeyde direnç sağlayan farklı beta-laktamazlardır [59]. Beta-laktam antibiyotik direnci genellikle bir veya iki mekanizma yoluyla gelişir; beta-laktam halkasının beta-laktamazlar (genellikle

TEM-1 veya ROB-1) tarafından hidrolize edilmesiyle yoluyla beta-laktamaz pozitif ampisiline dirençli *H. influenzae* (BLPAR) suşları olarak adlandırılır. Başka bir mekanizma beta-laktam afinitesinin azalması *ftsI* genindeki mutasyonları takiben penisilin bağlayıcı proteinlerdeki (PBP'ler) amino asit değişmesine bağlı olarak gelişir ve bu suşlar, beta-laktam negatif ampisiline dirençli *H. influenzae* (BLNAR) olarak adlandırılır [60]. Bugüne kadar, beta-laktam üretimi bu suşlar arasında en yaygın direnç mekanizması olarak kabul edilmektedir. 1980'lerin başında, ilk beta-laktam negatif, ampisiline dirençli (BLNAR) izolatlar rapor edilmiştir [61]. Oral sefalosporinler ve amoksisilin klavulanik asit kullanımı, PBP'ler amino asit değişmesi nedeniyle beta-laktam direncinin yayılmasına katkıda bulundu ve BLNAR'a neden oldu. Beta-laktamaz üretimi ve PBP3'teki değişikliklerin kombinasyonu, beta-laktamaz üreten bir amoksisilin-klavulanik aside dirençli (BLPACR) fenotipine yol açmıştır [62]

**TEM tip beta-laktamaz**

TEM-1 ve TEM-2 iki beta-laktamaz arasında sadece bir amino asit farkı vardır; TEM-1'de 37. amino asit glisin iken, TEM-2'de glisin yerine lizin bulunur. İki beta-laktamaz arasındaki diğer bir fark, promotör bölgeleriyle ilgilidir. Bu bölgedeki Regülatör Tabanı 32, *bla*TEM-1'de sitozin ve *bla*TEM-2'de timindir. Bu fark, *bla*TEM-2'nin daha güçlü bir promotöre sahip olması ve dolayısıyla daha fazla sentezlenmesile ile sonuçlanır. *Bla*TEM-2, transpozon 1 (Tn1), blaTEM-1 ise Tn2 ve Tn3 ile iletilir [63].

Araştırmalar, *bla*TEM'in *Haemophilus* türlerine *Enterobacteriaceae*'den plazmitler yoluyla bulaştığına inanıldığını göstermiştir. *Bla*TEM-1'deki C32T mutasyonu sonucunda enzim miktarı artar ve ampisilin direnci gelişir [63, 64].

*H. influenzae*'da TEM ile ilişkili iki farklı plazmit grubu vardır. Küçük (<10 kb) konjugatif olmayan plazmitler *bla*TEM'i kodlar ve yalnızca direnç belirteçleridir. Ancak büyük (40 kb) konjugatif plazmitler, birçok antibiyotik direnç genine (kloramfenikol, tetrasiklin gibi) ek olarak beta-laktamaz kodlar. Daha büyük plazmitler daha yaygındır ve *H. influenzae* 'da *bla*TEM genlerinin yayılması için çok daha önemlidir [63, 64].

**b)ROB tip beta-laktamaz**

ROB-1 ilk olarak 1981 yılında menenjite neden olan Hib ile bağlantılı bulunmuştur. İnsanlardaki bu enzim *Pasteurella multocida* ve *Haemophilus ducreyi*'dir;

hayvanlarda *Pasteurella multocida, Pasteurella haemolytica, Pasteurella aerogenes* ve *Actinobacillus pleuropneumoniae* gibi birçok bakteride de bulunmuştur. Pozitif beta-laktamaz ROB-1'li suşlarda sefaklorun MIC'leri de yüksek tespit edilmiştir [63].

### 2.8.2. Penisilin Bağlayan Proteinlerdeki Değişikliklere Bağlı Direnç

Ampisiline dirençli suşlar ilk olarak 1974'te rapor edilmiştir. 1980'den sonra ampisiline dirençli beta-laktamaz negatif (BLNAR) suşlar tanımlanmıştır. BLNAR suşlarının direnci, beta-laktam antibiyotiklerin penisilin bağlayıcı proteinlere (PBP) afinitesi azaldığında ortaya çıkar. BLNAR suşları, sadece ampisiline değil, aynı zamanda diğer beta-laktam antibiyotiklere, özellikle sefalosporinlere karşı da azalmış duyarlılık sergiler [65].

*H. influenzae* suşları genotipik olarak 4 gruba ayrılır [66, 67].

1. Beta-laktamaz negatif ampisiline duyarlı suşlar (BLNAS)

- *ftsI* geninde aminoasit değişikliği olmayan ve *bla* geni negatif olan suşlar

2. Beta-laktamaz negatif suşlar, ampisiline dirençli suşlar (BLNAR)

- *ftsI* geninde aminoasit değişiklikleri ve negatif *bla* geni olan izolatlar

3. Beta-laktamaz pozitif ampisiline dirençli suşlar (BLPAR)

- *ftsI* geninde aminoasit değişikliği olmayan ve *bla* geni için pozitif olan izolatlar

4. Beta-laktamaz pozitif amoksisilin-klavulanata dirençli suşlar (BLPACR)

- *ftsI* geninde aminoasit değişiklikleri olan ve *bla* geni için pozitif olan suşlar olarak

sınıflandırılmış.

## 2.9. Tedavi ve Korunma

### 2.9.1 Tedavi

Aminopenisilinler ve sefalosporinler, *H. influenzae* enfeksiyonlarının tedavisinde ilk tercih edilen ilaçlardır [68]. Ampisilin, alınan klinik örnekte kültür üremesi görüldüğünde antibiyogram sonucuna göre tedavide kullanılabilir. Ancak beta-laktamaz üretimine yada penisilin bağlayıcı proteinlerin düzeyindeki değişikliklerden dolayı çok tercih edilmemektedir [69].

Tedavide genellikle üçüncü kuşak sefalosporinler (sefotaksim ve seftriakson) ve ikinci kuşak sefalosporinler (sefuroksim) tercih edilmektedir [70].

### 2.9.2. Korunma

Yenidoğanlar, plasenta ve anne sütünden geçen IgG antikorları tarafından korunur. Antikapsüler antikorlar, Hib (nazofaringeal kolonizasyon) ile temastan veya diğer çapraz etkili antijenlerle temastan sonra oluşmaya başlar [71].

Hib için 2. aydan itibaren uygulanabilen saflaştırılmış PRP antijenleri içeren konjuge aşı uygulanmaya başlanılmıştır. Konjuge aşıların kullanıma sunulmasıyla birlikte, Hib enfeksiyonları için en büyük risk altında olan küçük yaşlardakı çocuklarda bağışıklık sağlanmıştır [34, 51].

# 3. GEREÇ VE YÖNTEM

## 3.1. Bakteri İzolatları

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi kliniklerinden 2021-2022 tarihleri arasında, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalına gönderilen klinik örneklerden toplam 60 *H. influenzae* suşu çalışmaya alınmıştır. Suşların antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemiyle çalışılmıştır.

### 3.1.1. İzolatların Çalışılması

Hastanemizin Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen *H. influenzae* suşları çalışılana kadar brucella broth içerisinde -20°C'de saklanıldı.

### 3.1.2. X ve V faktörü ile suşların doğrulanması

*H. influenzae* olabileceği düşünülen koloniler Müeller Hinton besiyerine pasaj yapılarak hazır X, V, X+V faktörlerini içeren kağıt diskler yerleştirilmiş ve 36°C'de 16-20 saat inkübasyondan sonra üremeleri değerlendirilmiştir. Yalnız X+V faktörü etrafında üreyen kökenler *H. influenzae* olarak tanımlanmıştır.

### 3.1.3. Serotiplendirmenin Yapılması

Malzemeler : *H. influenzae* antiserum Type a, *H. influenzae* antiserum Type b, *H. influenzae* antiserum Type d ve *H. influenzae* antiserum Type f.

*H. influenzae* antisera'yı hidrate etmek için, 1 mL steril saf su ekleyip çözülmüştür.

**Prosedür Adımları**

Bir aglütinasyon lamına test etmek üzere bir damla *H. influenzae* antiserum koyulmuş, antiserum damlasına bir öze dolusu test organizması aktarıp, iyice karıştırılmış ve lam hafif haraketlerle döndürülerek bir dakika sonunda lamda aglütinasyon görülmesi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

## 3.2. Antibiyotik testleri

Duyarlılık testleri EUCAST standartlarına uygun olarak %5 at kanlı agar (Şekil 3-1) disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Antibiyotikler ampisilin (2mg), amoksisilin klavulanat asit (2-1mg), sefuroksim (30mg), seftriakson (30mg),

sefpodoksim (10mg), tetrasikline (30mg), nalidiksik asid (30mg), sefiksim (5mg) diskleri yerleştirilip 35ºC'de % 5-10 $CO_2$'li ortamda 16-20 saat inkübasyona bırakıldı. Zon çapları ölçülerek sonuçlar yorumlandı. Ampisilin (2 µg), amoksisilin/klavulanat (2/1 µg) ve benzilpenisilin (1 U) ile disk difüzyon yöntemi ile tarama testi yapıldı. Benzilpenisilin (1 U) ile yapılan ilk taramada inhibisyon zonu ≥12 mm diski olan suşlar duyarlı kabul edildi. <12 mm inhibisyon zonları gösteren suşlar beta-laktamaz varlığı nitrosefin diskiyle araştırılmıştır. Nitrosefin için negatif bir test sonucu, BLNAR'ın tanımlanmasına eşitti, nitrosefin pozitif sonuçlar ise şemada gösterildiği gibi test edilmiştir ve sonda ajanın MIC değeri belirlenerek klinik sınır değerine göre yorumlanmıştır. Sonuçlar, 2022 Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi (EUCAST) standartlarına göre değerlendirilmiştir.



**Şekil 3-1. Disk Difüzyon Yöntemi Antibiyotik duyarlılık testi**

### 3.2.1. Nitrosefin testi

Beta-laktamaz varlığı üçün distile su ile ıslatılmış nitrosefin diskinin üzerine 5-6 koloni bakteri sürülmüştür. Pembe renk değişikliği pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Nitrosefin diskini kontrol etmek için pozitif kontrol olarak E.coli ATCC 35218, negatif kontrol olarak *H. influenzae* ATCC 49247 kökenleri kullanılmıştır.

### 3.2.2. Minimum İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değerlerinin belirlenmesi

AMP, CRO, CXM, CFM antibiyotiklerinin MİK değerleri, E test stripleri kullanılarak belirlenmiştir (Şekil 3-2). 0.5 McFarland standardına uygun hazırlanan bakteri suspansiyonları %5 at kanlı besiyerlerine ekim yapıldıktan sonra, E test stripleri yerleştirilip, 35°C'de %5-10 $CO_2$'li etüvde 16-20 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra sonuçlar EUCAST standartlarına göre değerlendirildi.



**Şekil 3-2. E test Yöntemi ile Antibiyotiklerin MİK değerlerinin belirlenmesi**

### 3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Kökenlerin 24 saatlik taze kültür plağından iki öze dolusu bakteri 200 µl steril distile suya eklenerek 0,5 McFarland yoğunluğunda homojen bir bakteri süspansiyonu, 1 x PCR buffer solusyonu ile hazırlandıktan sonra bu süspansiyonlar koloni PCR işlemi için hedef olarak kullanılmıştır.

#### 3.3.1. Kullanılan Primerler

Eva-Green tabanlı real time PCR reaksiyonlarının gerçekleştirilmesi için Biorad CFX96 (BioRad, Almanya) cihazı kullanılmıştır. Kullanılan primer çiftleri tablo 3-1'te verilmiştir.

**Tablo 3-1.** ***Haemophilus influenzae*** **kullanılan primer çiftleri**

| Primer Adı (Gen)* | Primer | Primer dizisi (5' – 3') | Primer uzunluk | Amplikon uzunluğu (bp) |
|---|---|---|---|---|
| TEM-1 (bla) | Forward | TTGCCGGGAAGCTAGAGTAA | 20 | 302 |
| | Reverse | GCGCATCTAAGATTTGAACG | 20 | |
| ROB-1 (bla) | Forward | CTAATCCGCAGCCTGCTAGT | 20 | 192 |
| | Reverse | ACAACGCCTTGAAAGTGGAC | 20 | |
| PBP3-INT (ftsI) | Forward | GATACTACGTCCTTTAAATTAAGCG | 25 | 554 |
| | Reverse | CCCGCAGTAAATGCCACATATTTC | 21 | |

*TEM-1 primeri; TEM-1 beta-laktamazı kodlayan bla gen bölgesi,

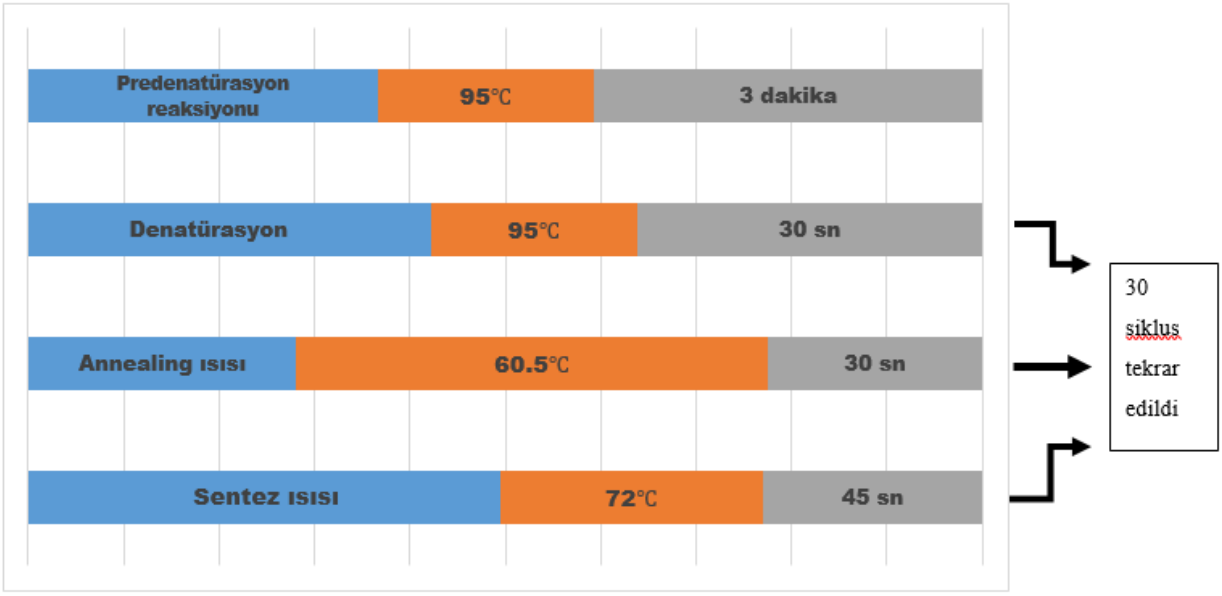
*ROB-1 primeri; ROB-1 beta-laktamazı kodlayan bla gen bölgesi,

*PBP-3 INT primeri; fts-1 gen bölgesi.

### 3.3.2. PCR Protokolu

| PCR karışımı | 1 reaksiyon için |
|---|---|
| PCR buffer | 2.5 $\mu l$ |
| Primer F | 0.5 $\mu l$ |
| Primer R | 0.5 $\mu l$ |
| dNTP | 0.5 $\mu l$ |
| Eva green (boya) | 1 $\mu l$ |
| dH2O | 18 $\mu l$ |
| Taq DNA Polimeraz | 0.125 $\mu l$ |
| Bakteri | 2 $\mu l$ |

### 3.3.3 PCR siklusları



# 4. BULGULAR

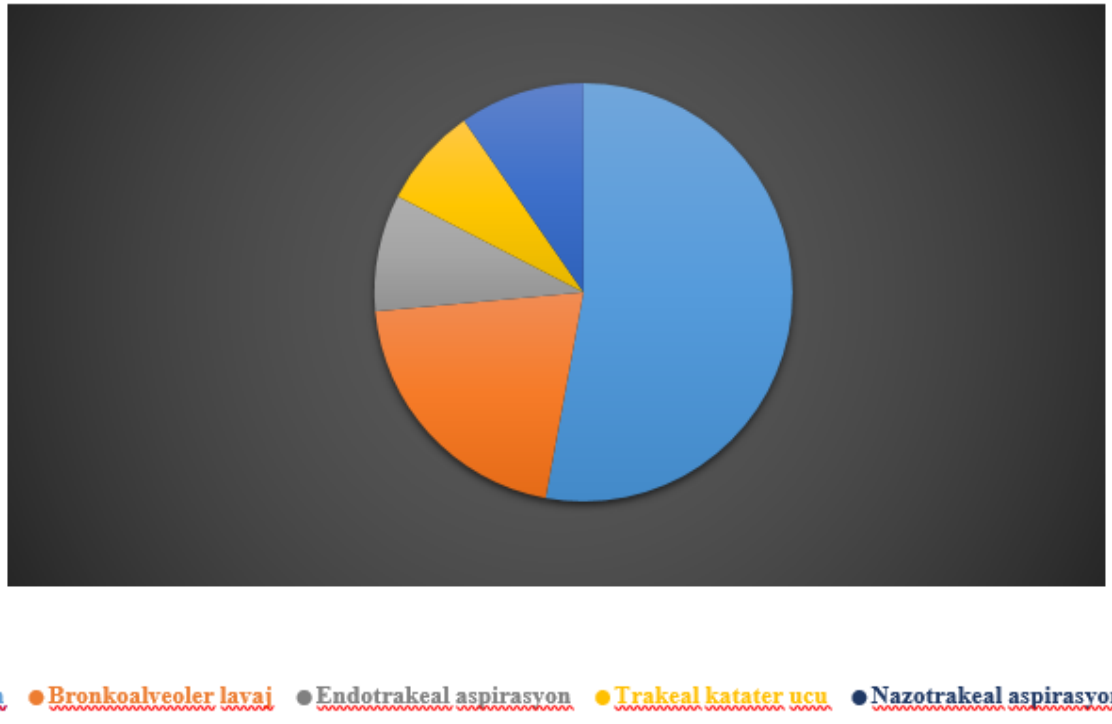
## 24.1 Çalışmaya alınan suşlar

Solunum örneklerinden izole edilen 60 *H. influenzae* kökeni çalışmaya alındı. Bunların 32'i (%53.3) erişkin, 28'i (%46.7) çocuk hastadan izole edildi. Hastaların yaşı bir ile 92 yaş arasındaydı. Örneklerin izole edildiği servislere göre dağılımı ; 18'i (%30) göğüs hastalıkları polikliniği, 30'u (%50) çocuk acil hastalıkları, iki'i (%3.3) acil servis, beş'i (%8,3) yoğun bakım üniteleri, dörd'ü (%6.7) iç hastalıkları onkoloji polikliniği, bir'i (%1.7) genel cerrahi idi.

## 4.2 Örneklerin Dağılımı

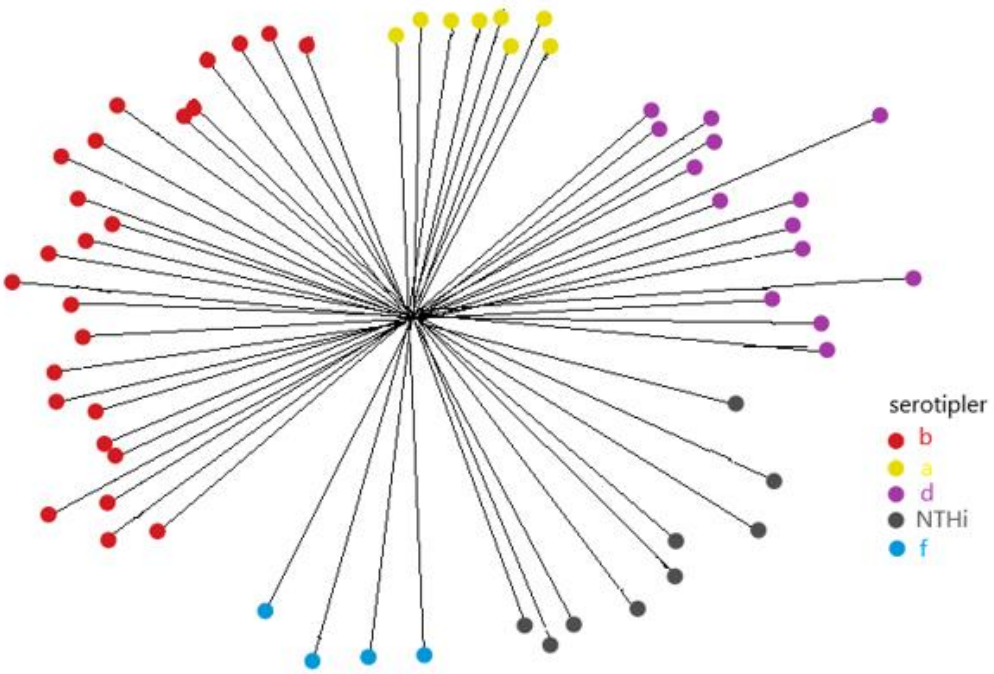
İzole edilen kökenlerin örnek tiplerine göre dağılımı tablo 4-1'de verilmektedir. Toplam 60 adet kökenin, 42'si balgam, sekiz'i bronkoalveolar lavaj (BAL), yedi'si endotrakeal aspirat (ETA), iki'si trakeal katater ucu, bir'i nazotrakeal aspirat materyalidir.

**Tablo 4-1. *Haemophilus influenzae* kökenlerin örnek tiplerine göre dağılımı**



### 4.3 Serotiplendirme

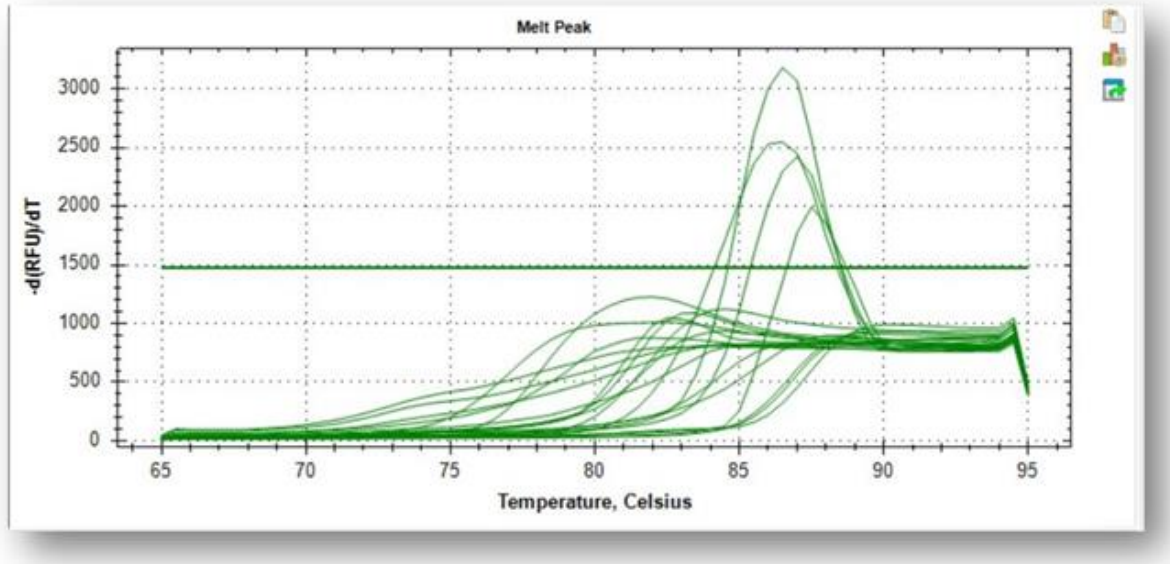
Toplam kökenin sekiz'i (%13.3) tip a, 25'i (%41.7) tip b, 14'ü (%23.3) tip d, dörd'ü (%6.7) tip f olarak tiplendirilmiştir (Şekil 4-1). Çalışmamızda eksik yanlarından birisi ekonomik nedenler dolayısıyla c ve e tiplerinin çalışmasının yapılmamış olmasıdır. Bundan dolayı kalan dokuz (%15) köken tiplendirilememiştir. Kökenlerden tip b'nin çoğunun çocuk olduğu tespit edilmiştir.



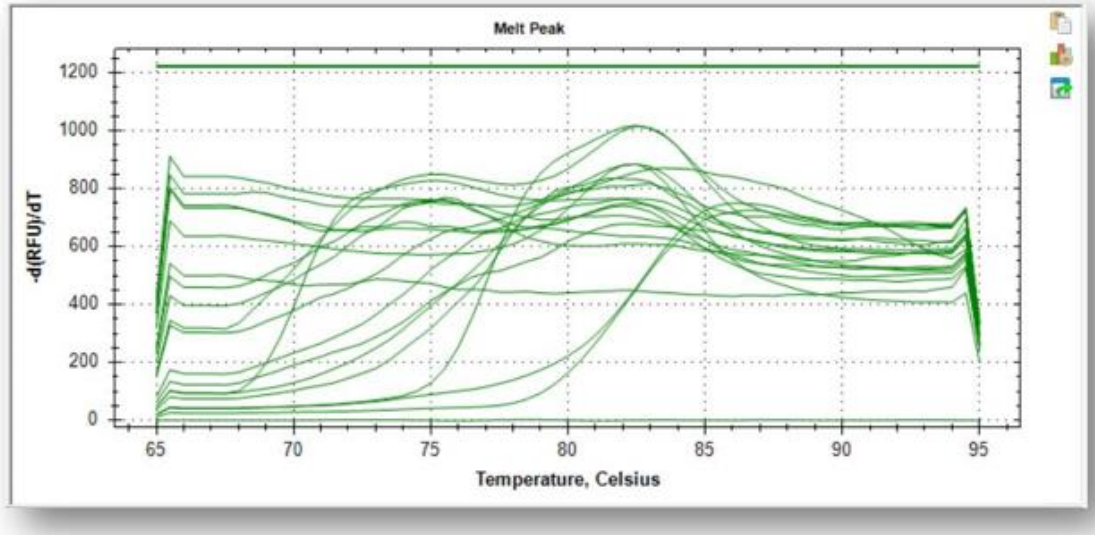

**Şekil 4-1.** ***Haemophilus influenzae*** **serotip tayini**

### 4.4 PCR sonuçlarının değerlendirilmesi

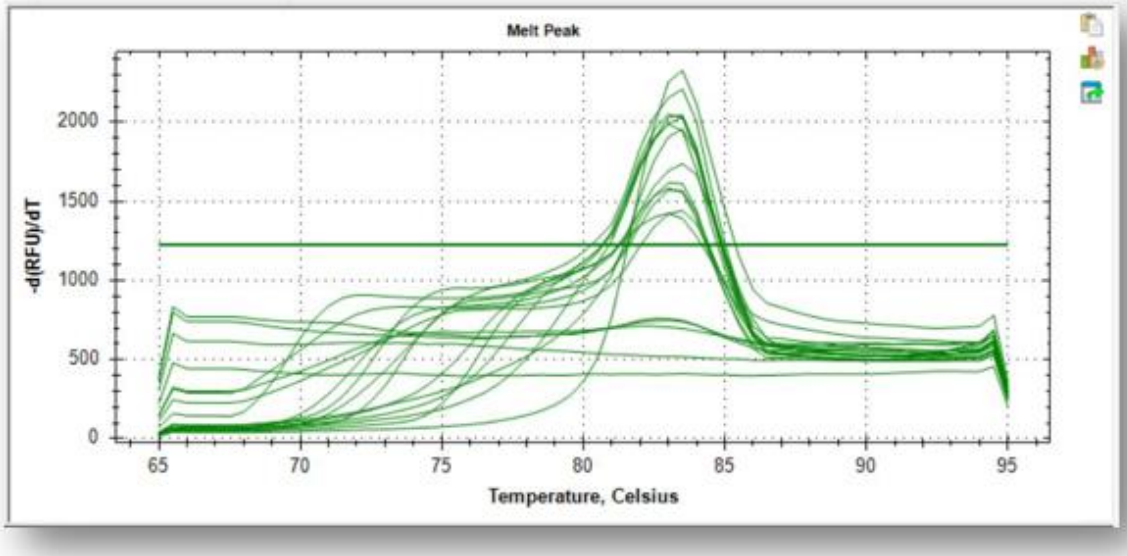
Beta-laktamaz pozitif, ampisilin dirençli dörd kökene hem TEM-1 hem de ROB-1 primerleri ile ayrı ayrı primerler kullanılarak Eva-Green tabanlı real time PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Real time PCR işlemleri için Biorad CFX96 (BioRad, Almanya) cihazı kullanılmıştır. Şekil 4-2'de gösterildiği gibi, beta-laktamaz pozitif ampisilin dirençli kökenlerde TEM-1 pozitif olarak değerlendirilmiştir. Şekil 4-3'te de ROB-1 primerleri ile yapılan PCR sonuçları görülmektedir. Bu sonuca göre ROB-1 pozitif beta-laktamaz saptanmadı. Beta-laktamaz negatif, ampisilin dirençli olan kökenlere PBP3 primerleri ile PCR yapıldı. Sonuçlar Şekil 4-4'te sunulmuştur.




**Şekil 4-2. Beta-laktamaz pozitif ampisilin dirençli kökenlerin TEM-1 primerleri kullanılarak yapılan PCR sonuçları**




**Şekil 4-3. Beta-laktamaz pozitif ampisilin dirençli kökenlerin ROB-1 primerleri kullanılarak yapılan PCR sonuçları**




**Şekil 4-4. Beta-laktamaz negatif ampisiline dirençli kökenlerin PBP primerleri ile yapılan PCR sonuçları**

### 4.5. Antibiyotik Sonuçları

Ampisiline duyarlılık: 60 izolattan 54'ü (%90) ampisiline duyarlı , altı'sı (%10) dirençli bulunmuştur.

Amoksisilin klavulanik aside duyarlılık: Suşların hepsi amoksisilin klavulanik asit'e duyarlı olarak tespit edilmiştir.

2. ve 3. Kuşak sefalosporinlere Duyarlılık: 2.kuşak sefalosporinler : sefuroksime ; 48'i (%80) duyarlı, sekiz'i (%13,3) dirençli, dörd'ü (%6,7) orta duyarlı. 3. kuşak sefalosporinler ; seftriakson ; 54'ü (%90) duyarlı, altı'sı (%10) dirençli; sefpodoksime 55'i (%91,7) duyarlı, beş'i (%8,3) dirençli; sefiksime 55'i (%91,7) duyarlı, beş'i (%8,3) dirençli; olarak tespit edildi.

Nalidiksik aside Duyarlılık : Toplam suşun 55'i (%91,7) duyarlı, beş'i (%8,3) dirençli olarak bulundu.

Tetrasikline Duyarlılık : 60 suşdan 56'ı (%93,3) duyarlı, dörd'ü (%6,7) dirençli, bulundu. Antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo 4-2'de verilmiştir.

60 suştan 41'i de (%68.3) beta-laktamaz üretimi ve PBP3 değişiklikleri göstermedi ve BLNAS olarak kabul edildi, Ampisiline dirençli dörd suşta (%6.7) beta-laktamaz üretimi saptandı (BLPAR). 15 izolatta (%25) beta-laktamaz negatif olduğu tespit edilerek PCR yöntemiyle PBP3 değişiklikleri görüldü ve BLNAR olarak adlandırıldı. Çalışma sırasında hiçbir BLPACR izolatı tespit edilmedi.

**Tablo 4-2. Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları**

| Antibiyotik | Duyarlı [n (%)] | Orta duyarlı [n (%)] | Dirençli [n (%)] |
|---|---|---|---|
| AMP | 54 (90) | 0 | 6 (10) |
| AMC | 100 (100) | 0 | 0 |
| CRO | 54 (90) | 0 | 6 (10) |
| CPD | 55 (91.7) | 0 | 5 (8.3) |
| CXM | 48 (80) | 4 (6.7) | 8 (13.3) |
| CFM | 55 (91.7) | 0 | 5 (8.3) |
| NA | 55 (91.7) | 0 | 5 (8.3) |
| TE | 56 (93.3) | 0 | 4 (6.7) |

**Not: AM: Ampisilin, AMC: Amoksisilin/Klavulanik Asit, CRO: Seftriakson, CPD: Sefpodoksim, CXM: Sefuroksim, CFM: Sefiksim, NA: Nalidik Asid, TE: Tetrasiklin.**

### 4.6. Çoğul direnç

İki suşta ampisiline, sefuroksime, sefiksime, seftriaksona ve sefpodoksime , nalidiksik asid ve tetrasikline de direnç saptanmıştır.

### 4.7. EUCAST tarama disk testinin ve E test striplerinin değerlendirilmesi

Benzilpenisilin diski (1 U), duyarlı *H.influenzae* suşlarını ayırt etmekte yardımcı olmuştur. Algoritmaya göre, 41 (%68.3) kökende beta-laktamlara (BLNAS) direnç gösteren herhangi bir mekanizma(lar) saptanmadı. Ekonomik nedenler dolayısıyla çalışmamızda E test striplerini şüpheli gördüğümüz kökenlerde BLNAR ve BLNAS izolatları arasındaki sınırı netleştirmek için kullanılmıştır. Tablo 4-3'de görüldüğü gibi 15 suş BLNAR olarak kabul edilerek, kalan dörd suş pozitif olarak bulunmuştur.

**Tablo 4-3. BLNAR ve BLPAR Haemophilus influenzae suşlarının beta-laktam, PCR ve hastaların demografik bilgileri**

| No | ÖRNEK | YAŞ | CİNSİYET | Amp | AMC | CRO | CPD | CXM | CFM | NA | TE | Beta lak. | a-f suşlar | TEM | PBP | ROB |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | BALGAM | 56 | ERKEK | R | S | R | R | R | R | R | R | pozitif | yok | pozitif | pozitif | negatif |
| 2 | BALGAM | 22 | ERKEK | R | S | S | S | S | S | S | S | pozitif | a | pozitif | pozitif | negatif |
| 3 | BAL | 92 | KADIN | S | S | S | S | I | S | S | S | negatif | b | | pozitif | negatif |
| 4 | BALGAM | 8 | KADIN | S | S | S | S | S | S | S | R | negatif | b | | pozitif | negatif |
| 5 | BALGAM | 5 | ERKEK | R | S | S | R | R | R | R | R | pozitif | d | pozitif | | negatif |
| 6 | BAL | 41 | ERKEK | S | S | S | S | S | S | S | S | pozitif | d | pozitif | pozitif | negatif |
| 7 | BAL | 2YAŞ 1AY | KADIN | S | S | S | S | I | S | S | S | negatif | b | | pozitif | negatif |
| 8 | BALGAM | 63 | ERKEK | S | S | R | S | S | S | S | S | negatif | b | | pozitif | negatif |
| 9 | BALGAM | 57 | ERKEK | S | S | R | R | R | S | S | S | negatif | a | | negatif | negatif |
| 10 | BALGAM | 50 | KADIN | S | S | R | S | S | S | S | S | negatif | a | | pozitif | negatif |
| 11 | BALGAM | 7 | KADIN | S | S | S | R | R | R | S | S | negatif | b | | negatif | negatif |
| 12 | BALGAM | 10 | ERKEK | S | S | S | S | S | S | R | S | negatif | yok | | pozitif | negatif |
| 13 | BALGAM | 70 | ERKEK | S | S | S | S | R | S | R | S | negatif | b | | pozitif | negatif |
| 14 | TKU | 3YAŞ 7AY | ERKEK | S | S | R | S | S | S | S | S | negatif | yok | | negatif | negatif |
| 15 | BALGAM | 11 | ERKEK | S | S | S | S | R | S | R | S | negatif | d | | pozitif | negatif |
| 16 | BALGAM | 3YAŞ 5AY | KADIN | R | S | S | S | R | S | S | S | negatif | b | | negatif | negatif |
| 17 | BALGAM | 2YAŞ 8AY | KADIN | S | S | S | S | I | R | S | R | negatif | b | | pozitif | negatif |
| 18 | BALGAM | 41 | KADIN | R | S | R | R | R | R | S | S | negatif | yok | | pozitif | negatif |
| 19 | BALGAM | 65 | KADIN | S | S | S | S | I | S | S | S | negatif | yok | | pozitif | negatif |

# 5. TARTIŞMA

*H. influenzae*'ya karşı hızla artan antibiyotik direnci tedavi başarısızlığına yol açmakta ve bu da toplumlara ciddi yükler getirmektedir [72]. Pediatrik pnömokok konjuge aşısının yaygın kullanımı, toplumdan edinilmiş solunum yolu enfeksiyonlarında pnömokoklara kıyasla NTHi'de nispi bir artışa yol açmıştır. Bu nedenlerle, bu suşların duyarlılık durumunun sürekli epidemiyolojik olarak izlenmesi gerekmektedir [73].

Türkiye'de *H. influenzae* tip b'ye (Hib) karşı aşı, 1 Ocak 2007'de rutin bağışıklama programına dahil edilmiştir [74]. Ceyhan ve ark. [75] tarafından yapılan çalışmada Hib aşısının piyasaya sürülmesinden sonra, Hib ile ilişkili menenjit vakaları %20,6'dan (2005-2006) %2,4'e (2015-2018) düştüğü gösterilmiştir. Hib bağışıklamasının yaygın olarak tanıtılmasından bu yana, invaziv Hib enfeksiyonu insidansı belirgin bir şekilde azalmış ve NTHi, aşılanmış çocuklarda invaziv *H. influenzae* enfeksiyonunun önemli bir nedeni haline gelmiştir [76]. Budak ve ark. [77] tarafından yapılan bir diğer çalışmada 139 *H. influenzae* izolatında Hib (%13,7), Hia (%6,4), Hid (%1,4), Hif (%1,4) ve Hic (%0,7) olarak saptanmış olup en sık serotipin NTHi (%75,5) olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda, ekonomik nedenlerden dolayı Hic ve Hie suşları çalışılmamış olup tiplendirelememiştir. Bu yüzden tiplendirilemeyen kökenleri (%15) olarak bulduk. Ancak bu kökenlerin çoğunun NTHi olduğunu düşünmekteyiz. Bulgularımızda kökenlerin çoğunu Hib (%41.7) oluşturuyor ve buda olguların çoğunun yatan hasta olduğundan kaynaklandığı düşünülüyor. Türkiye de yapılan çalışmalar ile verilerimizi karşılaştırdığımızda Hia (%13.3) ve Hid (%23.3) suşlarında artış olduğu dikkate alınmıştır.

2009-2015 yılları arasında, ABD'den 4368 (%88.7) izolat serotiplendirilmiş olup; bunlardan NTHi %71,6, Hif %16,3, Hia %5,8, Hie %4,5, Hib %1,8 ve Hid %0,1 olarak bulunmuştur. Buna göre; serotipler arasında serotip a'nın, beş yaş altı çocuklarda etkili olduğu gözlemlenirken, serotip c ise beş yaş altı çocuklarda saptanmamıştır [78]. 2007-2014 yılları arasında Whittaker ve ark. [79] 12 Avrupa ülkesinde invaziv *H. influenzae* hastalığına ilişkin verileri analiz etmişlerdir. Çalışılan toplam 8781 suşun 6853'de (%78) NTHi tespit edilmiştir. Aynı çalışmada Hie %3, Hif %9 iken bunu Hib %9 ile

takip etmiştir. Bununla birlikte, Hib beş yaş altı çocuklarda %19'unda (250/1343) saptanarak en yüksek orana sahip olduğu bildirilmiştir. Ancak, Hib vakalarının birçoğu 40 yaşın üzerindeki olgularda meydana gelmektedir. Tüm bebek yaş gruplarında vakaların çoğuna NTHi neden olmuştur; en önemlisi ise NTHi suşları, bir aylıktan küçük bebekler arasındaki vakaların %97'e (263/271) sebep olmuştur.

Kanada'da, NTHi'nin yaklaşık %54,6'sı, 2007 ve 2014 yılları arasında tüm invaziv *H. influenzae* vakalarına tespit edilmiş olup, a (%23,1) ve b (%8,3) serotiplerinden daha fazla olduğu bildirilmiştir [80]. 2014-2018 yılları arasında Kanada'da invaziv *H. influenzae'*nin epidemiyolojisi ve antimikrobiyal duyarlılığı laboratuvar tabanlı veriler ile rapor edilmiştir. Ayrıca, *H. influenzae* vakalarının çoğunluğunda NTHi (%74,2) ve çok daha az oranında ise Hia (%8,9) ve Hif (%10,2) tespit edilmiştir. Sadece bir Hid vakası (%0,1) ve 48 Hie vakası (%3,8) bulunmuştur. NTHi insidansı 2014'ten 2018'e 100.000 nüfus başına 1,29 vakadan 1,53 vakaya yükselmiştir. Bununla birlikte, a'dan f'ye kadar olan serotiplerin insidansı sabit kalırken yine 2014'ten 2018'e kadar genel Hib insidansı ise, 0,04 olarak tespit edilip düşük bulunmuştur [81].

Hib sonrası aşı döneminde, Kuzey Amerika Arktik bölgesinde, batı Kanada'da, kuzeybatı Ontario'da, Kanada'da ve ABD'nin güneybatı bölgelerinde invaziv Hia hastalığının varlığı rapor edilmiştir. Bu hastalık Brezilya ve Avustralya'da görülmüştür [82]. Brezilya'da yapılan bir çalışmada *H. influenzae* izolatlarının 483'ünde (%93) slayt aglütinasyonu ile serotiplendirilmiştir, buna göre; 483 izolatın 467'si (%96,7) Hib, 13'ü (%2,7) Hia, iki'si (%0,4) NTHi ve bir'i (%0,2) Hif olarak bulunmuştur. İzolatlar aşı öncesi ve aşı sonrası dönem olarak karşılaştırılmıştır. Hia vakalarının oranının, rutin Hib aşılamasının başlamasından sonra yükseldiği gözlemlenmiştir [83]. Bununla beraber, İngiltere ve Galler'de *H. influenzae* ile yapılan çalışmada %2,3 Hib, %12,7 diğer serotipler (Hia, Hid, Hie ve Hif) ve %85,0 NTHi olarak bulunmuştur [62].

Yıllar geçtikçe, solunum yolu enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılabilecek antibiyotik sayısı önemli ölçüde değişmiştir. Fernando ve ark. [84] bir Avustralya hastane laboratuvarında, CLSI disk difüzyon ile EUCAST disk difüzyonu karşılaştırmıştır. Bu çalışma genotipik olarak tanımlanmış beta-laktam direncinin saptanması için EUCAST disk difüzyonun daha güvenilir fenotipik yöntem olduğunu doğrulamıştır.

Bir enfeksiyona beta-laktamaz pozitif suşlar neden oluyorsa, amoksisilin ve ampisilin tedavisinin başarısız olması muhtemeldir. Bu nedenle *H. influenzae* enfeksiyonunun amoksisilin ve ampisilin ile tedavisinde ampirik tedavinin başarısının temel belirleyicisi beta-laktamaz üretiminin varlığı veya yokluğudur [85].

Türkiye'de 2002-2009 SOAR verilerine göre, test edilen 930 *H. influenzae* izolatında ampisilin duyarlılığı (%90,8-95,5) bulunmuştur [68]. Farklı yıllarda Türkiyede yapılan çalışmalar incelendiğinde ampisilin direnci %24,3, %3,3, %8, %35 olarak bildirilmiştir [86, 149, 127, 150]. Çalışmamızda ampisiline %10 direnç bulunmakta olup Türkiye verileriyle uyumludur.

Ampisilin duyarlılığı Fransa'da %75,6; ABD'de %73,7, İtalya'da %10,5, Çin'de %35 olarak tespit edilmiştir [87, 88].

2011-2013 SOAR-Türkiye çalışmasında 339 *H. influenzae* izolatında BLPAR %6,8 iken, BLNAR %9,1 olarak bulunmuştur [89]. Belçika'da yapılan bir çalışmada *H. influenzae*'de ampisilin duyarlılık testi verilerinin %93,2'si BLNAS ve %6,8'i BLNAR olarak tespit edilmiştir [90]. Ülkelere göre BLPAR oranları değişmektedir; Kore'de %52,4 ise Türkiye'de daha düşük gözükmektedir %6,8 [91, 92]. Ancak buna karşın Türkiyede BLNAR suş oranı yüksek bulunmuştur %9,1 [92, 93]. Bizim çalışmamızda BLPAR %6.7 saptanırken, 15 izolatta ise (%25) beta-laktamaz üretimi saptanmadı, PCR yöntemiyle PBP3 değişiklikleri görüldü ve BLNAR olarak adlandırıldı.

21. yüzyılın başlarında Çin'de BLNAR suşları nadir tespit edilmiştir. 2008'de Şanghay'da *H. influenzae* ile ilişkili toplum kökenli solunum yolu enfeksiyonlarının %29,8, 2016 ile 2017 yılları arasında ise Guangzhou'da %22,1 olarak bildirilmiştir [94, 95]. Japonya'da beta-laktamaz üretiminin yaygınlığı düşük olarak tespit edilmiştir (%13,9). Ancak, BLNAR suşlarının prevalansı %28,8 [67], ABD ve Avrupa'da ise nadir gözükmektedir (<%1) [96, 97]. Tunus'da çok merkezli yapılan bir çalışmada BLPAR suşların prevalansı 1999'da %17,3'ten 2017'de %36,6'ya yükseldiği gözlemlenmiştir. BLNAR izolatlarına bakıldıkta 2006'da düşük bir sıklıkta ortaya çıkmış ve 2007'de %2,9'dan önemli bir artış göstermiştir. 2017'de ise %8,2'ye yükselmiştir [12].

*H. influenzae* TEM-1 ve ROB-1'de beta-laktamaz kodlayan iki ana genden TEM-1 çok daha yaygın hale gelmiştir. ROB-1 ise dünya çapındaki suşların sadece %10'nu içermektedir [98]. Hem TEM-1 hem de ROB-1 için pozitif olan suşlar nadir görülmektedir. Farrell ve ark. [99] 2000'den fazla beta-laktamaz pozitif suşun küresel

bir araştırmasında, önceki sonuçlara benzer şekilde %93,7 TEM-1 ve %4,6 ROB-1 prevalansı bulmuşlardır. Özellikle, BLPAR ROB-1 prevalansı coğrafi bölgeye göre büyük farklılıklar göstermekte olup, en yüksek oranlar Meksika'da (%30), onu Amerika Birleşik Devletleri (%13,2) ve Kanada (%9,4) izlemektedir. Fransa ve Almanya'da %98, İtalya'da %97, Türkiye, İsrail, İsveç ve İngiltere'de %100, İspanya'da %97,9, Japonya ve ABD'de %97,3 ve Kanada'da %88 TEM-1 pozitif olarak tespit edilmiştir. [100, 101].

Kuvat ve ark. [102] İstanbul'da yaptığı çalışmada ampisiline dirençli *H. influenzae* izolatları %11 olarak bulunmuştur, bunların %73'ünde beta-laktamaz pozitifti ve TEM-1 geni tespit edilmiştir. Hiçbir izolatta ROB-1 genine rastlanılmamıştır.

BLNAR suşları, *H. influenzae* suşları arasında en yaygın olmasına rağmen, Japonya'da küçük çocuklardan alınan nazofaringeal sürüntülerde BLPACR izolasyon oranları 2007'den beri hızla artmıştır [103]. İtalya'da yapılan çalışmada çocuk hastaların solunum yollarında amoksisilin klavulanik asit direnç gelişimi gözlenmemiştir [88]. Çin'de yapılan bir çalışmada BLNAR saptanan bazı suşlarda amoksisilin/klavulanik asit, direnci %100 olarak bulunmuştur [104]. İstanbul'da 2003-2006 yılları arasında yapılan çalışmada BLPAR suşların arttığı, 2005 yılında % 8'e, 2006 %7 olarak bulunmuştur. Ancak hiçbir amoksisilin/klavulanik asit direnci görülmemiştir [105]. Bizim çalışmamızda dörd suş %6,7 beta laktamaz pozitif olarak belirlendi. Bunların hiçbiri amoksisilin/klavulanik asit direnci göstermedi ve BLPACR izolatı bulunmadı.

Çalışmamızda moleküler yöntemlerle bulduğumuz PBP3 geni için negatif olan dörd BLNAR suşunda, PBP3 geninde mutasyon meydana gelmiş olabileceğine veya daha önce tanımlanamayan bir enzimin sorumlu olduğunu düşündürmektedir.

*H. influenzae*'nin sefalosporin direnci kromozomaldir ve genellikle *ftsI* geni tarafından kodlanan PBP3'deki karakteristik değişikliklerden kaynaklanmaktadır [106].

Cobos ve ark. [107] sefuroksime 2014 yılında %25 direnç tespit etmişlerdir. Çin'de 2017-2019 yıllarında yapılan çalışmada sefuroksim direnci %51 olarak görülmüştür [108, 109]. Li ve ark. [110] 2017 yılında sefuroksime %72,1 yüksek direnç bulmuştur. 2020 yılında yapılan başka bir çalışmada ise sefuroksimin direnç oranı %29,41 olarak gözlemlenilmiştir. Bizim çalışmamızda *H. influenzae* izolatlarının sefuroksime sekiz'i (%13,3) dirençli, dörd'ü (%6,7) orta duyarlı olarak bulunmuştur.

*H. influenzae* suşları, üçüncü kuşak sefalosporinlere karşı oldukça duyarlıdır. Kiedrowska ve ark. [111] tarafından Polonya'da 2012 yılında yapılan bir çalışmada, *H. influenzae* izolatının *in vitro* antibiyotik duyarlılığını değerlendirdi ve tüm izolatların seftriakson'a duyarlı olduğunu bulmuşlardır.

Shooraj ve ark. [112] İran'dan seftriakson için %80 duyarlılık olarak rapor edilmiştir. Boroumand ve ark. [113], seftriakson %50, Etiyopya'da ise seftriaksona %28,6 karşı daha düşük direnç bildirilmiştir [114]. İrlanda'da yapılan geniş kapsamlı çalışmada seftriaksona karşı test edilen 394 izolatta seftriakson direnci oluşmadığı gözlemlenmiştir. Çalışmamızda seftriakson direnci %10 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, seftriakson'un *H. influenzae* enfeksiyonlarının tedavisinde etkili olabileceğini ve tedavi için birincil ampirik antibiyotik olması gerektiğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, diğer ülkeler üçüncü kuşak sefalosporinlere direnç bildirdiğinden, seftriakson duyarlılığının daha fazla izlenmesi gerekmektedir [115-117]. Han ve ark. [118] sefpodoksim'e %81.1 direnç tespit etmişler. Sefiksim, *in vitro* antibakteriyel aktivite spektrumuna sahip aktif bir sefalosporindir. İran'da sefiksim için %62 direnç gözlemlenilmiştir [119]. Bizim verilerimizde sefpodoksime %8,3, sefiksime ise %8,3 dirençli olarak tespit edilmiştir.

Ülkemizdeki tetrasiklin direnci, %8,6 [120], %2,9 [121] olarak saptanmıştır. Şener ve ark. [122] 2007 yılında yaptıkları sürveyans çalışmasında, Ankara'da %17,1, Antalya'da %13,6, İstanbul'da %21, İzmir'de %10 ve Trabzon'da ise %52 olarak tetrasikline direnç tespit etmişler.

Tetrasiklin direnç oranları ülkelere göre de farklılık göstermektedir. Abdel-Rahman ve ark. [123] %7, Nag ve ark. [194] %5, Gordon ve ark. [124] %0,6, Ladhani ve ark. [125] ise %1,8 oranında tetrasiklin direnci bildirmişlerdir. Yunanistan 2009-2012 yıllarını kapsayan 4 yıllık sürveyans çalışmalarında tetrasiklin direncini %8 olarak bulmuştur [126].

Bizim çalışmamızda suşların dörd'ü (%6,7) tetrasikline direnç göstermişdir. Bunlardan ikisi aynı zamanda ampisiline, sefuroksime, sefiksime, seftriaksona, sefpodoksime ve nalidiksik aside de direnç gözlemlenmiştir. Tetrasikline dirençli diğer bir suşda sefuroksime orta duyarlı, sefiksime ise dirençli olarak saptanmıştır. Hem tetrasiklin hem de beta-laktam direncine sahip kökenlerde, direncin konjugatif plazmid ile aktarıldığı düşünülmektedir [127, 128].

Çalışmamızda nalidiksik aside dirençli iki suşta aynı zamanda sefuroksim direncide görülmüştür. EUCAST'a göre nalidiksik aside dirençli olarak sınıflandırılan izolatların siprofloksasin, levofloksasin, moksifloksasin ve ofloksasine dirençli olduğu bildirilmelidir. Tetrasikline dirençli olan kökenler de ise doksisiklin ve minosikline de dirençli olarak bildirilebilir.

Türkiye'de 2015–17 SOAR çalışmasın da *H. influenzae* izolatlarının çoğu beta-laktamaz negatif %90,4 olarak bulunmuştur. EUCAST sınır değerlerine göre seftriaksona orta duyarlı olarak %98,7 bulunmuştur. Sefiksim %94,1 , amoksisilin/klavulanik asit %92,9, sefuroksime %3,8, duyarlı olarak bulunmuştur [129]. Carrera ve ark. [130] yaptığı geniş kapsamlı bir çalışmada tüm suşlar amoksisilin/klavulanik asit, sefotaksim, seftriakson ve tetrasikline duyarlıydı. Buna karşılık %12,7 ampisiline, %2,0 siprofloksasine ve %0,7 sefuroksime dirençli olarak bulunmuştur

Bir İspanyol çalışmasında ampisiline karşı %14,3 direnç bildirilmiştir. İzolatların %8,6'sında beta-laktamaz pozitifliği bulunurken, amoksisilin/klavulanik asit , üçüncü kuşak sefalosporinlere direnç bulunamamıştır [131].

Çin'de çok kapsamlı bir çalışmada sefuroksim ve seftriakson direnç oranları 2014-2015 ile 2018-2019'da karşılaştırıldığında sırasıyla %31,6'dan %77,3'e ve %0,0'dan %59,1'e yükselmiştir [132].

Pakistan'da *H. influenzae* SOAR çalışmasında 2002-2015'ten elde edilen sonuçlar gözden geçirilmiştir. 2002-2003 *H. influenzae* izolatları (n = 93) amoksisilin/klavulanik asit, sefuroksim, sefiksim'e tamamen %100 duyarlı olarak bulunmuştur. 2007-2009 için (n = 99), Pakistan'daki *H. influenzae* izolatları arasında amoksisilin/klavulanik asit duyarlılığı %100'de kalmıştır. Tüm izolatlar sefuroksim ve sefiksim'e duyarlı olarak bildirilmiştir. 2014–2015 ( n = 38) Pakistan verilerine göre *H. influenzae* izolatlarının %100'ü amoksisilin/klavulanik asit duyarlı olarak tespit edilmiştir. Sefuroksim'e ise %2.6 direnç tespit edilmiştir [133].

Macaristan'da 14 yıllık retrospektif çalışmanın sonuçları olarak ampisiline direnç %14 bulunmuştur ve bunlardan %11'i amoksisilin/klavulanik asit dirençli olarak tespit edilmiştir. Üçüncü kuşak sefalosporinlere ve tetrasiklinlere direnç bulunmamıştır [117].

# 6. SONUÇ VE ÖNERİLR

Çalışmamızda direnç sırasıyla sefuroksime, seftriakson, ampisilin, sefpodoksim, sefiksim, nalidiksik asid ve tetrasikline görüldü. Amoksisilin/Klavulanik aside direnç bulunmadı. Türkiye, Avrupa'da en yüksek antibiyotik kullanımına sahip ülkedir; İlaç grubuna göre penisilinlerde dördüncü, sefalosporinlerde birinci ve en fazla kullanımı olan ülkedir. Antimikrobiyallerin aşırı kullanımı, direnç gelişimi için önemli bir tetikleyicidir [89].

Nitrosefin hidroliz testi, beta-laktamaz enzimi, TEM-1 için %90'a yakın bir duyarlılığa sahiptir. Çalışmamızda BLPAR olan tüm suşlarda TEM-1 tipi enzimin saptanması, nitrosefin testinin ülkemizde halen değerini koruduğunu gösteriyor. Çalışmamızda ROB-1 tipi enzim saptanmamıştır. Yamada ve ark. [134] ülkemizde ve dünyada artış eğilimi gösteren BLNAR suşları için bu suşların çoklu ilaç direnci kazanma eğiliminde olduğunu belirtmişlerdir. Bu tez çalışmasında *H. influenzae* BLPACR kökeni bulunamamıştır.

Çalışmamız Türkiye'deki antibiyotik direncinin moleküler epidemiyolojisi ve *H. influenzae* suşlarında hangi serotiplerin yaygın olduğu konusunda çok merkezli çalışmalara ihtiyaç olduğu, ampisilin direnç dinamiklerini anlamak için ülkeye özgü gözetim verilerine ihtiyaç olduğunu göstermektedir.

Sonuç olarak *H. influenzae* 'nin rutin laboratuvarlarda ampirik tedavide önemli bir yer tutan ampisilin direncinin araştırılmasının yanı sıra beta-laktamaz üretimi, beta-laktamaz çeşitlerinin ve dirence neden olan genlerin araştırılması faydalı olacağı düşünüldü.

## KAYNAKLAR

[1] A. Snødergaard, A. San Millan, A. Santos-Lopez, S. M. Nielsen, B. Gonzalez-Zorn, and N. Nørskov-Lauritsen, "Molecular organization of small plasmids bearing blaTEM-1and conferring resistance to β-lactams in Haemophilus influenzae," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 56, no. 9, pp. 4958–4960, Sep. 2012, doi: 10.1128/AAC.00408-12.

[2] A. Takla *et al.*, "Invasive haemophilus influenzae infections in Germany after the introduction of routine childhood immunization, 2001–2016," *Open Forum Infect. Dis.*, vol. 7, no. 10, pp. 1–9, Oct. 2020, doi: 10.1093/ofid/ofaa444.

[3] E. Heinz, "The return of pfeiffer's bacillus: Rising incidence of ampicillin resistance in haemophilus influenzae," *Microbial Genomics*, vol. 4, no. 9. Microbiology Society, Sep. 01, 2018, doi: 10.1099/mgen.0.000214.

[4] R. Vega, H. L. Sadoff, and M. J. Patterson, "Mechanisms of Ampicillin Resistance in Haemophilus influenzae Type B1," 1976.

[5] P. Y. Su, A. H. Huang, C. H. Lai, H. F. Lin, T. M. Lin, and C. H. Ho, "Extensively drug-resistant Haemophilus influenzae - Emergence, epidemiology, risk factors, and regimen," *BMC Microbiol.*, vol. 20, no. 1, Apr. 2020, doi: 10.1186/s12866-020-01785-9.

[6] A. P. Magiorakos *et al.*, "Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 18, no. 3, pp. 268–281, 2012, doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.

[7] I. Braveny and K. Machka, "Multiply Resistant Haemophilus Influenzae And Parainfluenzae In West Germany," *The Lancet*, vol. 316, no. 8197. Lancet, pp. 752–753, 1980, doi: 10.1016/S0140-6736(80)91980-7.

[8] M. Chanyangam, R. Degroot, A. L. Smith, F. C. Tenover, and R. Reig, "Genetic Relatedness of Antibiotic Resistance Determinants in Multiply Resistant Hemophilus Influenza Jos6 Campos," *J. Infect. Dis.*, vol. 160, no. 5, pp. 810–817, 1989, doi: 10.1093/infdis/160.5.810.

[9] D. Panna, W. A. G. Kraak, L. C. Anderson, W. W. Nichols, M. P. E. Slack, and D. W. Crook, “Molecular epidemiology of unrelated clusters of multiresistant strains of haemophilus influenzae,” *J. Infect. Dis.*, vol. 165, no. 6, pp. 1069–1075, 1992, doi: 10.1093/infdis/165.6.1069.

[10] J. Levy, G. Verhaegen, P. De Mol, M. Couturier, D. Dekegel, and J. P. Butzler, “Molecular Characterization of Resistance Plasmids in Epidemiologically Unrelated Strains of Multiresistant Haemophilus influenzae,” *J. Infect. Dis.*, vol. 168, no. 1, pp. 177–187, 1993, doi: 10.1093/infdis/168.1.177.

[11] E. Tanaka, T. Wajima, Y. Hirai, H. Nakaminami, and N. Noguchi, “Dissemination of quinolone low-susceptible Haemophilus influenzae ST422 in Tokyo, Japan,” *J. Infect. Chemother.*, Feb. 2021, doi: 10.1016/j.jiac.2021.02.007.

[12] S. Ferjani *et al.*, “Polymorphism of ftsI gene in Haemophilus influenzae and emergence of cefotaxime resistance in two Tunisian hospitals,” *New Microbes New Infect.*, vol. 36, p. 100690, Jul. 2020, doi: 10.1016/j.nmni.2020.100690.

[13] O. T. Dergisi *et al.*, ‘‘Serotyping strains of Haemophilus influenzae isolated from clinical specimens and investigating their susceptibilities towards certain antimicrobials,” *Ortadogu Tıp Derg*, vol. 11, no. 4, p. 497, 2019, doi: 10.21601/ortadogutipdergisi.544493.

[14] N. López-López, C. Gil-Campillo, R. Díez-Martínez, and J. Garmendia, “Learning from –omics strategies applied to uncover Haemophilus influenzae host-pathogen interactions: Current status and perspectives,” *Comput. Struct. Biotechnol. J.*, vol. 19, pp. 3042–3050, Jan. 2021, doi: 10.1016/j.csbj.2021.05.026.

[15] E. Heinz, “The return of pfeiffer’s bacillus: Rising incidence of ampicillin resistance in haemophilus influenzae,” *Microbial Genomics*, vol. 4, no. 9. Microbiology Society, Sep. 01, 2018, doi: 10.1099/mgen.0.000214.

[16] N. A. Hasan *et al.*, “Microbial Community Profiling of Human Saliva Using Shotgun Metagenomic Sequencing,” *PLoS One*, vol. 9, no. 5, p. e97699, May 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0097699.

[17] S. P. Szafrański *et al.*, “Diversity patterns of bacteriophages infecting Aggregatibacter and Haemophilus species across clades and niches,” *ISME J.*,

vol. 13, no. 10, pp. 2500–2522, Oct. 2019, doi: 10.1038/s41396-019-0450-8.

[18] T. M. Harris *et al.*, "Comparative genomic analysis identifies x-factor (Haemin)-independent haemophilus haemolyticus: A formal re-classification of 'haemophilus intermedius,'" *Microb. Genomics*, vol. 6, no. 1, 2020, doi: 10.1099/mgen.0.000303.

[19] Harrison L, Da Silva G, Pittman M, Fleming D, Vranjac A, Broome C. Epidemiology and clinical spectrum of Brazilian purpuric fever. Brazilian Purpuric Fever Study Group. Journal of clinical microbiology. 1989;27(4):599.

[20] R. R. Carpenter and R. G. Petersdorf, "The clinical spectrum of bacterial meningitis," *Am. J. Med.*, vol. 33, no. 2, pp. 262–275, Sep. 1962, doi: 10.1016/0002-9343(62)90024-4.

[21] Cohen I. La méningite cérébro-spinale septicémique. Université libre de Bruxelles, Faculté de Médecine – Médecine, Bruxelles,1909

[22] J. M. Eyler, "The state of science, microbiology, and vaccines circa 1918," *Public Health Reports*, vol. 125, no. SUPPL. 3. Association of Schools of Public Health, pp. 27–36, Apr. 01, 2010, doi: 10.1177/00333549101250s306.

[23] A. L. Erwin and R. S. Munford, "Comparison of lipopolysaccharides from Brazilian purpuric fever isolates and conjunctivitis isolates of Haemophilus influenzae biogroup aegyptius. Brazilian Purpuric Fever Study Group.," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 27, no. 4, 1989.

[24] L. D. Fothergill, "Observations on the presence of complement in the cerebrospinal fluid in various pathologic conditions of the central nervous system," *J. Pediatr.*, vol. 6, no. 3, pp. 374–381, Mar. 1935, doi: 10.1016/S0022-3476(35)80229-1.

[25] G. W. Prather and M. H. D. Smith, "Chloramphenicol in the treatment of hemophilus influenzae meningitis," *J. Am. Med. Assoc.*, vol. 143, no. 16, pp. 1405–1406, Aug. 1950, doi: 10.1001/jama.1950.02910510023005.

[26] D. Tietz, "Computer-assisted 2-D agarose electrophoresis of Haemophilus influenzae type B meningitis vaccines and analysis of polydisperse particle populations in the size range of viruses: A review," *Electrophoresis*, vol. 28, no.

4. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 512–524, Feb. 01, 2007, doi: 10.1002/elps.200600532.

[27] D. A. Clements, J. B. Rouse, W. L. London, W. S. Yancy, M. V. Moggio, And C. M. Wilfert, "Antibody response of 18 month old children 1 month and 18 months following Haemophilus influenzae type b vaccine administered singly or with DTP vaccine," *J. Paediatr. Child Health*, vol. 26, no. 1, pp. 46–49, Feb. 1990, doi: 10.1111/j.1440-1754.1990.tb02378.x.

[28] S. D. King *et al.*, "Safety And Immunogenicity Of A New Haemophilus Influenzae Type B Vaccine In Infants Under One Year Of Age," *Lancet*, vol. 318, no. 8249, pp. 705–709, Oct. 1981, doi: 10.1016/S0140-6736(81)91045-X.

[29] C. D. Berkowitz *et al.*, "Safety and immunogenicity of Haemophilus influenzae type b polysaccharide and polysaccharide diphtheria toxoid conjugate vaccines in children 15 to 24 months of age," *J. Pediatr.*, vol. 110, no. 4, pp. 509–514, Apr. 1987, doi: 10.1016/S0022-3476(87)80540-1.

[30] M. Kilian, "A taxonomic study of the genus Haemophilus, with the proposal of a new species," *J. Gen. Microbiol.*, vol. 93, no. 1, pp. 9–62, Mar. 1976, doi: 10.1099/00221287-93-1-9.

[31] A. H. Lucas, J. W. Larrick, and D. C. Reason, "Variable region sequences of a protective human monoclonal antibody specific for the Haemophilus influenzae type b capsular polysaccharide.," *Infect. Immun.*, vol. 62, no. 9, 1994.

[32] H. Peltola, T. Kilpi, M. Anttila, H. Peltola, and T. Kilpi, "Rapid disappearance of Haemophilus influenzae type b meningitis after routine childhood immunisation with conjugate vaccines," *Lancet*, vol. 340, no. 8819, pp. 592–594, Sep. 1992, doi: 10.1016/0140-6736(92)92117-X.

[33] R. D. Fleischmann *et al.*, "Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae Rd," *Science (80-. ).*, vol. 269, no. 5223, pp. 496–512, 1995, doi: 10.1126/science.7542800.

[34] Murray PR. Haemophilus and Related Bacteria. İn Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. St Louis; Elsevier Mosby: 2009. pp. 367-376

[35] Forbes BA SD, Weissfeld AS. Diagnostic Microbiology. 12 ed. Missouri: Mosby

Elseiver; 2007.

[36] Murray P, Baron E, Jorgensen J, Pfaller M, Yolken R. (2003) Manual of Clinical Microbiology. ASM, Washington, DC. 2007.

[37] “Impact of vaccines universally recommended for children--United States, 1990-1999.,” *Can. Commun. Dis. Rep.*, vol. 25, no. 14, pp. 122–127, 1999, doi: 10.1001/jama.281.16.1482-jwr0428-2-1.

[38] Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, douglas, and bennett's principles and practice of infectious diseases: 2-volume set: Elsevier Health Sciences; 2014.

[39] DeMaria T, Apicella M, Nichols W, Leake E. Evaluation of the virulence of nontypeable Haemophilus influenzae lipooligosaccharide htrB and rfaD mutants in the chinchilla model of otitis media. Infection and immunity. 1997;65(11):4431-5.

[40] D. C. Turk, “The pathogenicity of Haemophilus influenzae,” *J. Med. Microbiol.*, vol. 18, no. 1, pp. 1–16, Aug. 1984, doi: 10.1099/00222615-18-1-1.

[41] J. A. Karlowsky *et al.*, “Antimicrobial surveillance of Haemophilus influenzae in the United States during 2000-2001 leads to detection of clonal dissemination of a β-lactamase-negative and ampicillin-resistant strain,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 40, no. 3, pp. 1063–1066, 2002, doi: 10.1128/JCM.40.3.1063-1066.2002.

[42] A. K. Takala *et al.*, “Reduction of oropharyngeal carriage of Haemophilus influenzae type b (Hib) in children immunized with an Hib conjugate vaccine,” *J. Infect. Dis.*, vol. 164, no. 5, pp. 982–986, Nov. 1991, doi: 10.1093/infdis/164.5.982.

[43] M. L. Barbour, “Conjugate Vaccines and the Carriage of Haemophilus influenzae Type b,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 2, no. 3, pp. 176–182, 1996, doi: 10.3201/eid0203.960303.

[44] M. M. Farley *et al.*, “Invasive Haemophilus influenzae disease in adults. A prospective, population-based surveillance,” *Ann. Intern. Med.*, vol. 116, no. 10, pp. 806–812, 1992, doi: 10.7326/0003-4819-116-10-806.

[45] J. R. Kostman *et al.*, “Invasive Haemophilus influenzae Infections in Older Children and Adults in Seattle,” *Clin. Infect. Dis.*, vol. 17, no. 3, pp. 389–396,

Sep. 1993, doi: 10.1093/clinids/17.3.389.

[46] A. K. Takala *et al.*, “Preceding respiratory infection predisposing for primary and secondary invasive haemophilus influenzae type b disease,” *Pediatr. Infect. Dis. J.*, vol. 12, no. 3, pp. 189–195, 1993, doi: 10.1097/00006454-199303000-00003.

[47] O. S. Levine, B. Schwartz, N. Pierce, and M. Kane, “Development, evaluation and implementation of Haemophilus influenzae type b vaccines for young children in developing countries: Current status and priority actions,” in *Pediatric Infectious Disease Journal*, Sep. 1998, vol. 17, no. 9 SUPPL., doi: 10.1097/00006454-199809001-00003.

[48] D. B. Hall, M. K. W. Lum, L. R. Knutson, W. L. Heyward, and J. I. Ward, “Pharyngeal carriage and acquisition of anticapsular antibody to Haemophilus influenzae type b in a highrisk population in Southwestern Alaska,” *Am. J. Epidemiol.*, vol. 126, no. 6, pp. 1190–1197, 1987, doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a114758.

[49] E. D. Shapiro and J. I. Ward, “The epidemiology and prevention of disease caused by Haemophilus influenzae type b,” *Epidemiol. Rev.*, vol. 13, no. 1, pp. 113–142, Jan. 1991, doi: 10.1093/oxfordjournals.epirev.a036066.

[50] W. G. Adams *et al.*, “Decline of Childhood Haemophilus influenzae Type b (Hib) Disease in the Hib Vaccine Era,” *JAMA J. Am. Med. Assoc.*, vol. 269, no. 2, pp. 221–226, Jan. 1993, doi: 10.1001/jama.1993.03500020055031.

[51] Ward JI. Haemophilus influenzae. İn Feigin RD, Cherry JD, Demmler GJ, Kaplan SL, editörler. Textbook of Pediatric Infectious Diseases. 5th ed. Philadelphia: Saunders; 2004. pp. 1636-1663.

[52] E. V. Millar *et al.*, “Epidemiology of invasive Haemophilus influenzae type A disease among Navajo and White Mountain Apache children, 1988-2003,” *Clinical Infectious Diseases*, vol. 40, no. 6. Oxford Academic, pp. 823–830, Mar. 15, 2005, doi: 10.1086/428047.

[53] D. B. Hall, M. K. W. Lum, L. R. Knutson, W. L. Heyward, and J. I. Ward, “Pharyngeal carriage and acquisition of anticapsular antibody to Haemophilus influenzae type b in a highrisk population in Southwestern Alaska,” *Am. J. Epidemiol.*, vol. 126, no. 6, pp. 1190–1197, Dec. 1987, doi:

10.1093/oxfordjournals.aje.a114758.

[54] D. L. Goldenberg, “Septic arthritis,” *Lancet*, vol. 351, no. 9097. Elsevier B.V., pp. 197–202, Jan. 17, 1998, doi: 10.1016/S0140-6736(97)09522-6.

[55] Koneman EW, Allen SD, Janda WN, Schreckenberger PC, Winn WC. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology [5th ed.]. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1997:363-384.

[56] R. R, G. T, Y. Y, T. P, K. P, and A. W, “Laboratory and clinical evaluations of media for the primary isolation of Haemophilus species,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 30, no. 8, pp. 1917–1921, 1992, doi: 10.1128/JCM.30.8.1917-1921.1992.

[57] B. AL, F. PC, and P. MA, “Susceptibilities of beta-lactamase-producing and -nonproducing ampicillin-resistant strains of Haemophilus influenzae to ceftibuten, cefaclor, cefuroxime, cefixime, cefotaxime, and amoxicillin-clavulanic acid,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 37, no. 1, pp. 14–18, 1993, doi: 10.1128/AAC.37.1.14.

[58] A. Snødergaard, A. San Millan, A. Santos-Lopez, S. M. Nielsen, B. Gonzalez-Zorn, and N. Nørskov-Lauritsen, “Molecular organization of small plasmids bearing blaTEM-1and conferring resistance to β-lactams in Haemophilus influenzae,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 56, no. 9, pp. 4958–4960, Sep. 2012, doi: 10.1128/AAC.00408-12.

[59] A. Søndergaard and N. Nørskov-Lauritsen, “Contribution of PBP3 Substitutions and TEM-1, TEM-15, and ROB-1 Beta-Lactamases to Cefotaxime Resistance in Haemophilus influenzae and Haemophilus parainfluenzae,” *https://home.liebertpub.com/mdr*, vol. 22, no. 4, pp. 247–252, Jun. 2016, doi: 10.1089/MDR.2015.0189.

[60] H. Dabernat and C. Delmas, “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,” *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 31, no. 10, pp. 2745–2753, Oct. 2012, doi: 10.1007/S10096-012-1623-9/TABLES/3.

[61] W. T. M. Jansen, A. Verel, M. Beitsma, J. Verhoef, and D. Milatovic, “Longitudinal European surveillance study of antibiotic resistance of

Haemophilus influenzae," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 58, no. 4, pp. 873–877, Oct. 2006, doi: 10.1093/JAC/DKL310.

[62] "Haemophilus influenzae type b (Hib) seroprevalence and current epidemiology in England and Wales," *J. Infect.*, vol. 76, no. 4, pp. 335–341, Apr. 2018, doi: 10.1016/J.JINF.2017.12.010.

[63] T. S, J. MR, and A. PC, "Antimicrobial resistance in Haemophilus influenzae," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 20, no. 2, pp. 368–389, Apr. 2007, doi: 10.1128/CMR.00040-06.

[64] S. T. Chen and R. C. Clowes, "Nucleotide sequence comparisons of plasmids pHD131, pJB1, pFA3, and pFA7 and β-lactamase expression in Escherichia coli, Haemophilus influenzae, and Neisseria gonorrhoeae," *J. Bacteriol.*, vol. 169, no. 7, pp. 3124–3130, 1987, doi: 10.1128/JB.169.7.3124-3130.1987.

[65] S. Miyazaki, T. Fujikawa, K. Kanazawa, and K. Yamaguchi, "In vitro and in vivo activities of meropenem and comparable antimicrobial agents against Haemophilus influenzae, including β-lactamase-negative ampicillin-resistant strains," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 48, no. 5, pp. 723–726, Nov. 2001, doi: 10.1093/JAC/48.5.723.

[66] K. Hasegawa *et al.*, "Rapidly Increasing Prevalence of β-Lactamase-Nonproducing, Ampicillin-Resistant Haemophilus influenzae Type b in Patients with Meningitis," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 48, no. 5, pp. 1509–1514, May 2004, doi: 10.1128/AAC.48.5.1509-1514.2004.

[67] K. Ubukata *et al.*, "Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with β-lactam resistance in β-lactamase-negative ampicillin-resistant Haemophilus influenzae," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 45, no. 6, pp. 1693–1699, Jun. 2001, doi: 10.1128/AAC.45.6.1693-1699.2001.

[68] D. Torumkuney *et al.*, "Results from the Survey of Antibiotic Resistance (SOAR) 2002–09 in Turkey," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 71, no. suppl_1, pp. i85–i91, May 2016, doi: 10.1093/JAC/DKW067.

[69] L. KI and W. ER, "Use of rifampin in Haemophilus influenzae type b infections," *Am. J. Dis. Child.*, vol. 140, no. 4, pp. 381–385, 1986, doi: 10.1001/ARCHPEDI.1986.02140180115040.

[70] D. Gür *et al.*, “Prevalence of antimicrobial resistance in Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae, Moraxella catarrhalis and Streptococcus pyogenes: results of a multicentre study in Turkey,” *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 19, no. 3, pp. 207–211, Mar. 2002, doi: 10.1016/S0924-8579(02)00003-1.

[71] T. F. Murphy and S. Sethi, “Chronic Obstructive Pulmonary Disease,” *Drugs Aging 2002 1910*, vol. 19, no. 10, pp. 761–775, Aug. 2012, doi: 10.2165/00002512-200219100-00005.

[72] S. Wen, D. Feng, D. Chen, L. Yang, and Z. Xu, “Molecular epidemiology and evolution of Haemophilus influenzae,” *Infect. Genet. Evol.*, vol. 80, p. 104205, Jun. 2020, doi: 10.1016/J.MEEGID.2020.104205.

[73] T. S, J. MR, and A. PC, “Antimicrobial resistance in Haemophilus influenzae,” *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 20, no. 2, pp. 368–389, Apr. 2007, doi: 10.1128/CMR.00040-06.

[74] C. Sönmez *et al.*, “Levels of Haemophilus influenzae type B (Hib) antibody in Turkey before routine immunization,” *Turk J Med Sci*, vol. 40, no. 6, pp. 959–964, Dec. 2010, doi: 10.3906/sag-0811-50.

[75] M. Ceyhan *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*, vol. 5, no. 2, Apr. 2020, doi: 10.1128/MSPHERE.00060-20/ASSET/D8363B1F-F0B6-43CA-822F-FF616E3FB67C/ASSETS/GRAPHIC/MSPHERE.00060-20-F0002.JPEG.

[76] E. Gönüllü *et al.*, “Nontypeable Haemophilus influenzae Otitis Media: Mastoiditis and Meningitis Complicated with Central Venous Thrombosis in an Immunocompetent Child,” *Case Rep. Infect. Dis.*, vol. 2021, pp. 1–5, Mar. 2021, doi: 10.1155/2021/8845200.

[77] F. Budak, “Prevalence and Genotypic Characteristics of ß-lactamase Negative-Ampicillin-Resistant (BLNAR) Haemophilus Influenzae in a Children’s Hospital in Turkey,” *Artic. Turkiye Klin. J. Med. Sci.*, 2016, doi: 10.5336/medsci.2015-48612.

[78] H. M. Soeters *et al.*, “Current Epidemiology and Trends in Invasive Haemophilus

influenzae Disease United States, 2009–2015," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 67, no. 6, pp. 881–889, Aug. 2018, doi: 10.1093/CID/CIY187.

[79] R. Whittaker *et al.*, "Epidemiology of Invasive Haemophilus influenzae Disease, Europe, 2007–2014," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 23, no. 3, p. 396, Mar. 2017, doi: 10.3201/EID2303.161552.

[80] R. S. W. Tsang *et al.*, "Antibiotic susceptibility and molecular analysis of invasive Haemophilus influenzae in Canada, 2007 to 2014," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 72, no. 5, pp. 1314–1319, 2017, doi: 10.1093/JAC/DKW565.

[81] L. R. McTaggart, K. Cronin, C. Y. Seo, S. Wilson, S. N. Patel, and J. V. Kus, "Increased Incidence of Invasive Haemophilus influenzae Disease Driven by Non-Type B Isolates in Ontario, Canada, 2014 to 2018," *Microbiol. Spectr.*, vol. 9, no. 2, Oct. 2021, doi: 10.1128/SPECTRUM.00803-21.

[82] M. Ulanova and R. S. W. Tsang, "Haemophilus influenzae serotype a as a cause of serious invasive infections," *Lancet Infect. Dis.*, vol. 14, no. 1, pp. 70–82, Jan. 2014, doi: 10.1016/S1473-3099(13)70170-1.

[83] G. S. Ribeiro *et al.*, "Prevention of Haemophilus influenzae Type b (Hib) Meningitis and Emergence of Serotype Replacement with Type a Strains after Introduction of Hib Immunization in Brazil," *J. Infect. Dis.*, vol. 187, no. 1, pp. 109–116, Jan. 2003, doi: 10.1086/345863.

[84] S. A. Fernando *et al.*, "Evaluation of the Haemophilus influenzae EUCAST and CLSI disc diffusion methods to recognize aminopenicillin and amoxicillin/clavulanate resistance," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 75, no. 9, pp. 2594–2598, Sep. 2020, doi: 10.1093/JAC/DKAA229.

[85] M. Ibar-Bariain, A. Rodríguez-Gascón, A. Isla, M. Á. Solinís, and A. Canut-Blasco, "Evaluation of the adequacy of the antimicrobial therapy of invasive Haemophilus influenzae infections: A pharmacokinetic/pharmacodynamic perspective," *Enfermedades Infecc. y Microbiol. Clin. (English ed.)*, vol. 39, no. 2, pp. 65–71, Feb. 2021, doi: 10.1016/J.EIMCE.2020.05.010.

[86] H. Eda Alışkan, Ş. Çolakoğlu, J. Sedef Göçmen, B. Üniversitesi Tıp Fakültesi, and T. Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, "Solunum yolu örneklerinden izole edilen streptococcus pneumoniae ve haemophilus influenzae suşlarının antibiyotiklere

dirençlerinin belirlenmesi Antibiotic resistance of streptococcus pneumoniae and haemophilus influenzae isolated from respiratory tract specimens," *Cukurova Med. J. Cukurova Med J*, vol. 41, no. 2, pp. 201–207, 2016, doi: 10.17826/cutf.196127.

[87] V. Cattoir and M. J. Dowzicky, "A longitudinal assessment of antimicrobial susceptibility among important pathogens collected as part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (T.E.S.T.) in France between 2004 and 2012," *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, vol. 3, no. 1, pp. 1–9, Dec. 2014, doi: 10.1186/2047-2994-3-36/TABLES/3.

[88] M. Camara *et al.*, "Antibiotic resistance of bacteria responsible of acute respiratory tract infections in children," *Microbiol. Medica*, vol. 32, no. 1, Mar. 2017, doi: 10.4081/mm.2017.6489.

[89] G. Soyletir *et al.*, "Results from the Survey of Antibiotic Resistance (SOAR) 2011–13 in Turkey," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 71, no. suppl_1, pp. i71–i83, May 2016, doi: 10.1093/JAC/DKW075.

[90] L. Schotte, M. Wautier, D. Martiny, D. Piérard, and M. Depypere, "Detection of beta-lactamase-negative ampicillin resistance in Haemophilus influenzae in Belgium," *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 93, no. 3, pp. 243–249, Mar. 2019, doi: 10.1016/J.DIAGMICROBIO.2018.10.009.

[91] S. Bae *et al.*, "Antimicrobial resistance in Haemophilus influenzae respiratory tract isolates in Korea: Results of a nationwide acute respiratory infections surveillance," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 54, no. 1, pp. 65–71, Jan. 2010, doi: 10.1128/AAC.00966-09/ASSET/B56A6936-DA81-46A3-81D8-834D90138644/ASSETS/GRAPHIC/ZAC0011086470001.JPEG.

[92] B. Şener *et al.*, "A survey of antibiotic resistance in Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae in Turkey, 2004 2005," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 60, no. 3, pp. 587–593, 2007, doi: 10.1093/JAC/DKM232.

[93] P. Zarakolu, G. Soyletir, D. Gur, and S. Unal, "Antimicrobial resistance patterns of respiratory pathogens: a local report from Turkey," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 9, no. 12, pp. 1257–1258, Dec. 2003, doi: 10.1111/J.1469-0691.2003.00780.X.

[94] L. Qin, Z. Zhou, B. Hu, T. Yamamoto, and H. Watanabe, "Antimicrobial susceptibility and genetic characteristics of Haemophilus influenzae isolated from community-acquired respiratory tract infection patients in Shanghai City, China," *J. Infect. Chemother.*, vol. 18, no. 4, pp. 508–514, Jan. 2012, doi: 10.1007/S10156-012-0372-0.

[95] D. Chen *et al.*, "Microbial virulence, molecular epidemiology and pathogenic factors of fluoroquinolone-resistant Haemophilus influenzae infections in Guangzhou, China 11 Medical and Health Sciences 1108 Medical Microbiology," *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, vol. 17, no. 1, pp. 1–9, Nov. 2018, doi: 10.1186/S12941-018-0290-9/TABLES/3.

[96] D. Felmingham, The Alexander Project Group, R. N. Grüneberg, and >the Alexander Project Group, "The Alexander Project 1996–1997: latest susceptibility data from this international study of bacterial pathogens from community-acquired lower respiratory tract infections," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 45, no. 2, pp. 191–203, Feb. 2000, doi: 10.1093/JAC/45.2.191.

[97] M. R. Jacobs, S. Bajaksouzian, A. Zilles, G. Lin, G. A. Pankuch, and P. C. Appelbaum, "Susceptibilities of Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae to 10 oral antimicrobial agents based on pharmacodynamic parameters: 1997 U.S. Surveillance study," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 43, no. 8, pp. 1901–1908, 1999, doi: 10.1128/AAC.43.8.1901.

[98] J. Hanna *et al.*, "A Rapidly Fatal Infection With Haemophilus influenzae Serotype E Harboring blaROB-1: The Dilemma of Safe De-escalation in the Setting of Potential Extended-Spectrum β-Lactamase Production," *Open Forum Infect. Dis.*, vol. 5, no. 12, Dec. 2018, doi: 10.1093/OFID/OFY302.

[99] D. J. Farrell, I. Morrissey, S. Bakker, S. Buckridge, and D. Felmingham, "Global distribution of TEM-1 and ROB-1 b-lactamases in Haemophilus influenzae," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 56, pp. 773–776, 2005, doi: 10.1093/jac/dki281.

[100] J. A. Karlowsky, G. Verma, G. G. Zhanel, and D. J. Hoban, "Presence of ROB-1 beta-lactamase correlates with cefaclor resistance among recent isolates of Haemophilus influenzae," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 45, no. 6, pp. 871–875, 2000, doi: 10.1093/JAC/45.6.871.

[101] S. R. Scriver *et al.*, “Determination of antimicrobial susceptibilities of Canadian isolates of Haemophilus influenzae and characterization of their beta-lactamases. Canadian Haemophilus Study Group,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 38, no. 7, pp. 1678–1680, 1994, doi: 10.1128/AAC.38.7.1678.

[102] N. Kuvat, H. Nazik, R. Berkiten, and B. Öngen, “Tem-1 And Rob-1 Presence And Antimicrobial Resistance In Haemophilus Influenzae Strains, Istanbul, Turkey,” *J trop Med public Heal.*, vol. 254, no. 2, 2015.

[103] M. Ito *et al.*, “Clonal spread of β-lactamase-producing amoxicillin–clavulanate-resistant (BLPACR) strains of non-typeable Haemophilus influenzae among young children attending a day care in Japan,” *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.*, vol. 74, no. 8, pp. 901–906, Aug. 2010, doi: 10.1016/J.IJPORL.2010.05.008.

[104] Y. Zhang *et al.*, “Antimicrobial susceptibility of Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae and Moraxella catarrhalis isolated from community-acquired respiratory tract infections in China: Results from the CARTIPS Antimicrobial Surveillance Program,” *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, vol. 5, pp. 36–41, Jun. 2016, doi: 10.1016/J.JGAR.2016.03.002.

[105] H. ÖZKUL, Ö. A. ÖZBEK, H. ÇOBAN, Z. GÜLAY, Dokuz Eylül Üniversitesi hastanesinde 2003-2006 yıllarında üretilen haemophilus influenzae suşlarının antibiyotik duyarlılıkları ANKEM Derg 2007; 21(2): 86-90.

[106] D. Skaare *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*, vol. 19, no. 49, p. 20986, Dec. 2014, doi: 10.2807/1560-7917.ES2014.19.49.20986/CITE/PLAINTEXT.

[107] S. García-Cobos *et al.*, “Frequent carriage of resistance mechanisms to β-lactams and biofilm formation in Haemophilus influenzae causing treatment failure and recurrent otitis media in young children,” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 69, no. 9, pp. 2394–2399, Sep. 2014, doi: 10.1093/JAC/DKU158.

[108] M. Zhou *et al.*, “Antimicrobial resistance of Haemophilus influenzae isolates from pediatric hospitals in Mainland China: Report from the ISPED program, 2017–2019,” *Indian J. Med. Microbiol.*, vol. 39, no. 4, pp. 434–438, Oct. 2021,

doi: 10.1016/J.IJMMB.2021.09.001.

[109] J. P. Li, C. Z. Hua, L. Y. Sun, H. J. Wang, Z. M. Chen, and S. Q. Shang, "Epidemiological Features and Antibiotic Resistance Patterns of Haemophilus influenzae Originating from Respiratory Tract and Vaginal Specimens in Pediatric Patients," *J. Pediatr. Adolesc. Gynecol.*, vol. 30, no. 6, pp. 626–631, Dec. 2017, doi: 10.1016/J.JPAG.2017.06.002.

[110] X. X. Li, S. Z. Xiao, F. F. Gu, W. P. He, Y. X. Ni, and L. Z. Han, "Molecular Epidemiology and Antimicrobial Resistance of Haemophilus influenzae in Adult Patients in Shanghai, China," *Front. Public Heal.*, vol. 8, p. 95, Mar. 2020, doi: 10.3389/FPUBH.2020.00095/BIBTEX.

[111] M. Kiedrowska *et al.*, "β-Lactam resistance among Haemophilus influenzae isolates in Poland," *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, vol. 11, pp. 161–166, Dec. 2017, doi: 10.1016/J.JGAR.2017.08.005.

[112] F. Shooraj, B. Mirzaei, S. Fazlollah Mousavi, and F. Hosseini, "Clonal diversity of Haemophilus influenzae carriage isolated from under the age of 6 years children," doi: 10.1186/s13104-019-4603-7.

[113] M. Boroumand, S. Irani, ; Seyed, D. Siadat, and S. Bouzari, "Molecular Detection of Genomic Islands Associated With Class 1 and 2 Integron in Haemophilus influenzae Isolated in Iran," *Jundishapur J Microbiol*, vol. 8, no. 4, p. 17249, 2015, doi: 10.5812/jjm.8(4)2015.17249.

[114] D. Temesgen, F. Bereded, A. Derbie, and F. Biadglegne, "Bacteriology of community acquired pneumonia in adult patients at Felege Hiwot Referral Hospital, Northwest Ethiopia: a cross-sectional study," doi: 10.1186/s13756-019-0560-0.

[115] M. McElligott, K. Meyler, D. Bennett, R. Mulhall, R. J. Drew, and R. Cunney, "Epidemiology of Haemophilus influenzae in the Republic of Ireland, 2010–2018," *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 39, no. 12, pp. 2335–2344, Dec. 2020, doi: 10.1007/S10096-020-03971-Z/FIGURES/3.

[116] H. Honda *et al.*, "Multiclonal expansion and high prevalence of -lactamase-negative haemophilus influenzae with high-level ampicillin resistance in Japan and susceptibility to quinolones," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 62, no. 9,

Sep. 2018, doi: 10.1128/AAC.00851-18/SUPPL_FILE/ZAC009187450S1.PDF.

[117] B. G. Szabo, K. S. Lenart, T. Tirczka, and E. Ostorhazi, “Clinical and microbiological characteristics of adult invasive Haemophilus influenzae infections: results of a 14-year single-center experience from Hungary,” *Infection*, vol. 46, no. 6, pp. 855–860, Sep. 2018, doi: 10.1007/S15010-018-1213-6/TABLES/3.

[118] M. S. Han, H. J. Jung, H. J. Lee, and E. H. Choi, “Increasing Prevalence of Group III Penicillin-Binding Protein 3 Mutations Conferring High-Level Resistance to Beta-Lactams Among Nontypeable Haemophilus influenzae Isolates from Children in Korea,” *https://home.liebertpub.com/mdr*, vol. 25, no. 4, pp. 567–576, May 2019, doi: 10.1089/MDR.2018.0342.

[119] H. Vaez, A. Sahebkar, F. Pourfarzi, A. Yousefi-Avarvand, and F. Khademi, “Prevalence of Antibiotic Resistance of Haemophilus Influenzae in Iran- A Meta-Analysis,” *Iran. J. Otorhinolaryngol.*, vol. 31, no. 107, p. 349, Nov. 2019, doi: 10.22038/IJORL.2019.34363.2137.

[120] Budak, F, Gür, D. Klinik örneklerden izole edilen Haemophilus influenzae suşlarının çeşitli antimikrobik ilaçlara in-vitro duyarlılığı. Mikrobiyoloji Bülteni, 2003; 37.1: 19-25.

[121] M. M. Torun, N. Namal, M. Demirci, H. Bahar, and B. Kocazeybek, “Pharyngeal carriage and antimicrobial resistance of Haemophilus influenzae in non-type-b-vaccinated healthy children attending day care centers in Turkey,” *Chemotherapy*, vol. 53, no. 2, pp. 114–117, Mar. 2007, doi: 10.1159/000099982.

[122] B. Şener *et al.*, “A survey of antibiotic resistance in Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae in Turkey, 2004–2005,” *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 60, no. 3, pp. 587–593, Sep. 2007, doi: 10.1093/JAC/DKM232.

[123] E. M. Abdel-Rahman, N. A. Ismael, and R. A. Dixon, “Antibiotic resistance and prevalence of β-lactamase in Haemophilus influenzae isolates - A surveillance study of patients with respiratory infection in Saudi Arabia,” *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 36, no. 3, pp. 203–208, Mar. 2000, doi: 10.1016/S0732-8893(99)00142-X.

[124] K. A. Gordon, D. J. Biedenbach, and R. N. Jones, “Comparison of Streptococcus

pneumoniae and Haemophilus influenzae susceptibilities from community-acquired respiratory tract infections and hospitalized patients with pneumonia: Five-year results for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program," *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 46, no. 4, pp. 285–289, Aug. 2003, doi: 10.1016/S0732-8893(03)00087-7.

[125] S. Ladhani, P. T. Heath, M. E. Ramsay, and M. P. E. Slack, "Changes in antibiotic resistance rates of invasive Haemophilus influenzae isolates in England and Wales over the last 20 years," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 62, no. 4, pp. 776–779, 2008, doi: 10.1093/JAC/DKN274.

[126] S. Maraki and I. S. Papadakis, "Antimicrobial Resistance Trends among Community-Acquired Respiratory Tract Pathogens in Greece, 2009–2012," *Sci. World J.*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/941564.

[127] P. L. Ho *et al.*, "Decreased Levofloxacin Susceptibility in Haemophilus influenzae in Children, Hong Kong," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 10, no. 11, p. 1660, 2004, doi: 10.3201/EID1011.040055.

[128] M. Pérez-Vázquez, F. Román, B. Aracil, R. Cantón, and J. Campos, "Laboratory Detection of Haemophilus influenzae with Decreased Susceptibility to Nalidixic Acid, Ciprofloxacin, Levofloxacin, and Moxifloxacin Due to gyrA and parC Mutations," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 42, no. 3, pp. 1185–1191, Mar. 2004, doi: 10.1128/JCM.42.3.1185-1191.2004/ASSET/041AC7F8-C6F1-4E15-B2F0-840EA551BD4A/ASSETS/GRAPHIC/ZJM0030411980002.JPEG.

[129] D. Torumkuney *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," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 75, no. Supplement_1, pp. i88–i99, Apr. 2020, doi: 10.1093/JAC/DKAA086.

[130] A. Carrera-Salinas *et al.*, "Epidemiology and population structure of Haemophilus influenzae causing invasive disease," *Microb. Genomics*, vol. 7, no. 12, p. 723, 2021, doi: 10.1099/MGEN.0.000723.

[131] C. Puig, I. Grau, S. Marti, F. Tubau, and L. Calatayud, "Clinical and Molecular Epidemiology of Haemophilus influenzae Causing Invasive Disease in Adult

Patients," *PLoS One*, vol. 9, no. 11, p. 112711, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0112711.

[132] E. Lee, S. Park, M. Kim, and J. Lee, "Trend of Antibiotic Susceptibility of Haemophilus influenzae Isolated from Children, 2014-2019," *Pediatr. Infect. Vaccine*, vol. 27, no. 3, pp. 147–157, Dec. 2020, doi: 10.14776/PIV.2020.27.E25.

[133] A. Zafar *et al.*, "Antibiotic susceptibility in Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae and Streptococcus pyogenes in Pakistan: a review of results from the Survey of Antibiotic Resistance (SOAR) 2002–15," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 71, no. Suppl 1, p. i103, May 2016, doi: 10.1093/JAC/DKW076.

[134] S. Yamada *et al.*, "β-Lactamase-non-producing ampicillin-resistant Haemophilus influenzae is acquiring multidrug resistance," *J. Infect. Public Health*, vol. 13, no. 4, pp. 497–501, Apr. 2020, doi: 10.1016/J.JIPH.2019.11.003.

**İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI**

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN HAEMOPHİLUS İNFLUENZAE DUYARLILIK TESTLERİ VE BETA-LAKTAMAZ DİRENÇ MEKANİZMALARININ FENOTİPİK, GENOTİPİK YÖNTEMLERLE SAPTANMASI.

ORIGINALITY REPORT

| 10% | 9% | 2% | 2% |
|---|---|---|---|
| SIMILARITY INDEX | INTERNET SOURCES | PUBLICATIONS | STUDENT PAPERS |

PRIMARY SOURCES

| | | |
|---|---|---|
| 1 | acikbilim.yok.gov.tr<br>Internet Source | 4% |
| 2 | nek.istanbul.edu.tr:4444<br>Internet Source | 1% |
| 3 | openaccess.hacettepe.edu.tr:8080<br>Internet Source | 1% |
| 4 | www.otdjournal.com<br>Internet Source | 1% |
| 5 | Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK)<br>Student Paper | <1% |
| 6 | "Posters", Clinical Microbiology and Infection, 4/2007<br>Publication | <1% |
| 7 | www.odevsel.com<br>Internet Source | <1% |

cerrahpasa.istanbul.edu.tr