



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

***HAEMOPHILUS INFLUENZAE* KÖKENLERİNDE
ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇ ORANI VE
AMPİSİLİN DİRENCİNİN GENOTİPİK OLARAK
BELİRLENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

DR YAVUZ OKULU

DANIŞMAN

Yrd. Doç. Dr. Murat TELLİ

AYDIN-2011

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

***HAEMOPHILUS INFLUENZAE* KÖKENLERİNDE
ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇ ORANI VE
AMPİSİLİN DİRENCİNİN GENOTİPİK OLARAK
BELİRLENMESİ**

UZMANLIK TEZİ
DR. YAVUZ OKULU

DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. Murat TELLİ

AYDIN – 2011

Bu araştırma Bilimsel Araştırma Projesi kapsamında ADÜ Araştırma Fon
Saymanlığı tarafından TPF-10018 sayı ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Mikrobiyoloji alanında yetişmemde katkıda bulunan, uzmanlık eğitimim boyunca sundukları bilimsel, verimli ve destekleyici ortam için başta Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Neriman AYDIN'a, tezimin fikir aşamasından sonuçlanmasına kadarki süreçte değerli vaktini ve bilimsel desteğini sunan, tez çalışmalarım süresince bilgi ve tecrübeleri ile beni yönlendiren, değerli danışman hocam, Sayın Yrd. Doç. Dr. Murat TELLİ'ye, tezimin yazım aşamasında yardım ve önerilerinden dolayı değerli hocam, Sayın Yrd. Doç. Dr. Berna GÜLTEKİN'e, çalışma sırasında bilimsel katkıları ile bana yardımcı olan değerli hocam, Sayın Doç. Dr. Bülent BOZDOĞAN'a, eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen ve bilimsel katkıları ile bana yardımcı olan, değerli hocalarım Doç.Dr. Mete EYİĞÖR, Doç. Dr. Sevin KIRDAR ve Prof. Dr. Sema ERTUĞ ile Prof.Dr. Hatice ERTABAKLAR'a teşekkür ederim.

Ayrıca yetişmemde emeği geçen ve tez çalışmalarım süresince benden her konuda ilgi ve desteğini esirgemeyen, birlikte çalıştığım isimlerini saymadığım Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nın tüm çalışanlarına, özellikle asistan arkadaşlarım Dr. Atiye Meltem AKSOY ve Dr. Yasin TİRYAKİ'ye teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Bu zor çalışmanın her aşamasında maddi ve manevi hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan, değerli eşime ve çocuklarıma sonsuz teşekkürler.

Dr. Yavuz OKULU

Aydın, 2011

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR	III
TABLO DİZİNİ	VIII
RESİM DİZİNİ	IX
ŞEKİL DİZİNİ	X
KISALTMALAR	XI

BÖLÜM I

GİRİŞ VE AMAÇ	HATA! YER İŞARETİ TANIMLANMAMIŞ.1
GENEL BİLGİLER	3
Tarihçe	3
Mikrobiyolojik Özellikler	3
Epidemiyoloji	5
Patogenez	6
Risk Faktörleri	8
<i>Konağa Ait Faktörler</i>	8
<i>Yaş</i>	8
<i>Cinsiyet</i>	9
<i>Genetik</i>	9
<i>Hematolojik ve İmmün Sistem Hastalıkları</i>	9
<i>Astım ve Kronik Akciğer Hastalıkları</i>	9
<i>Çevresel Faktörler</i>	9
<i>Kalabalık Faktörü</i>	9
<i>Viral Üst Solunum Yolu Enfeksiyonları</i>	10
<i>Anne Sütü</i>	10
<i>Sigara</i>	10
<i>Sosyoekonomik Düzey ve Anne/baba Eğitim Düzeyi</i>	10
Klinik	10
<i>Menenjit</i>	11
<i>Sellülit</i>	11
<i>Epiglottit</i>	11

<i>Septik Artrit</i>	12
<i>Pnömoni</i>	12
<i>Perikardit</i>	12
<i>Bakteriyemi</i>	12
<i>Otitis Media</i>	13
<i>Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH) Alevlenmesi</i>	13
<i>Toplum Kökenli Pnömoni</i>	13
<i>Konjuktivit</i>	13
<i>Sinüzit</i>	14
Komplikasyonlar	14
Tanı	14
<i>Örneklerin Toplanması</i>	15
<i>Örneklerin Direkt İncelemesi</i>	15
<i>Boyama Yöntemleri</i>	15
<i>Haemophilus Influenzae Tip b Kapsül Antijeninin Tespiti</i>	15
<i>Kültür</i>	16
<i>Tanımlama</i>	17
Tedavi	17
<i>Haemophilus Influenzae</i> Tedavisinde Kullanılan Antibiyotikler	18
<i>Beta-Laktamlar</i>	18
<i>Penisilinler</i>	19
<i>Beta-laktamaz İnhibitörleri</i>	19
<i>Sefalosporinler</i>	19
<i>Karbapenemler</i>	20
<i>Monobaktamlar</i>	20
<i>Protein Sentezini İnhibe Eden Antibakteriyel İlaçlar</i>	21
<i>Tetrasiklinler</i>	21
<i>Kloramfenikol</i>	21
<i>Makrolidler</i>	21
<i>Nükleik Asit Sentezini İnhibe Eden Antibakteriyel İlaçlar</i>	22
<i>Sulfonamidler ve Trimetoprim</i>	22
<i>Kinolonlar</i>	22

<i>H. influenzae</i> Tedavisinde Kullanılan Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları	22
<i>β-laktamaz Aracılı Direnç</i>	22
<i>TEM tip β-laktamaz</i>	23
<i>ROB tip β-laktamaz</i>	23
<i>Penisilin Bağlayan Proteinlerdeki Değişikliklere Bağlı Direnç</i>	23
<i>Makrolidler, Azalidler ve Ketolidler</i>	26
<i>Kloramfenikol</i>	27
<i>Tetrasiklinler</i>	27
<i>Kinolonlar</i>	27
<i>Folik Asid Metabolizma İnhibitörleri</i>	27
Korunma	28
<i>Doğal Bağışıklık</i>	28
<i>Kemoproflaksi</i>	28
<i>Aktif bağışıklama</i>	28

BÖLÜM II

GEREÇ VE YÖNTEM	31
Bakteriyel Kökenler	31
<i>Haemophilus Influenzae</i> Kökenlerinin Tanımlanması	31
<i>BBL Crystal N/H ID Tanımlama Paneli Çalışma İlkeleri</i>	31
Kökenlerin Serotiplendirmesi	33
Antimikrobiyal Duyarlılık Testi	33
<i>Haemophilus Test Medium Besiyerinin Hazırlanması</i>	33
<i>Disk Difüzyon Yöntemi İle Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi</i>	34
<i>Beta-laktamaz Varlığının Araştırılması</i>	34
<i>Mikrodilüsyon Yöntemi İle Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi</i>	34
Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) İle Direnç Genlerinin Tayini	36
<i>DNA İzolasyonu</i>	36
<i>Polimeraz Zincir Reaksiyonu</i>	37
<i>Isı Döngü Cihazı Programı</i>	37
<i>Tampon Solüsyonunun (TBE) Hazırlanması</i>	37
<i>Agaroz Jelin Hazırlanması</i>	37

<i>Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi</i>	38
---	----

BÖLÜM III

BULGULAR	40
----------	----

BÖLÜM IV

TARTIŞMA	477
SONUÇ	53
ÖZET	54
SUMMARY	56
KAYNAKLAR	58

TABLO DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo I. <i>Haemophilus</i> cinsi bakterilerin ayırt edici özellikleri	4
Tablo II. <i>H. influenzae</i> biyotiplerinin özellikleri	5
Tablo III. <i>H. influenzae</i> 'nin adezinleri	7
Tablo IV. <i>H. influenzae</i> 'nin oluşturduğu klinik tablolar	11
Tablo V. <i>H. influenzae</i> infeksiyonlarının neden olduğu komplikasyonlar	14
Tablo VI. Doğal tip <i>H. influenzae</i> kökeni ile BLNAR kökenlerdeki PBP3'teki aminoasit değişikliğinin karşılaştırılması	26
Tablo VII. Taşıyıcı proteinlerine göre farklı <i>Hib</i> aşılarının farklı yaşlardaki uygulama şeması	30
Tablo VIII. BBL Crystal N/H ID tanımlama panelinde bulunan biyokimyasal ve enzimatik maddeler	32
Tablo IX. Sensititre plağında bulunan antibiyotikler ve dilüsyon aralıkları	34
Tablo X. Çalışmada kullanılan primerler ve dizinleri	39
Tablo XI. <i>Haemophilus influenzae</i> kökenlerinin izole edildiği klinik örneklerle göre dağılımı	40
Tablo XII. <i>Haemophilus influenzae</i> kökenlerinin gönderildiği kliniklere göre dağılımı	41
Tablo XIII. <i>H. influenzae</i> kökenlerinde çalışılan antibiyotiklerin MİK aralıkları, MİK50, MİK90 değerleri ve duyarlılıkları	42
Tablo XIV. <i>Haemophilus influenzae</i> kökenlerinde duyarlı <i>fts-I</i> geni tespit edilen ve tespit edilmeyen kökenlerin MİK aralıkları, MİK50 ve MİK90 değerleri	43
Tablo XV. Beta-laktamaz pozitif kökenin MİK değerleri	45

RESİM DİZİNİ

Sayfa No

Resim 1: BBL Crystal N/H ID tanımlama paneli ve floresansı değerlendirme cihazı	33
Resim 2: Sıvı mikrodilüsyon antibiyogram plaklarının değerlendirilmesi	34
Resim 3: XV diskinin etrafında üreyen <i>Haemophilus influenzae</i> kolonileri	40
Resim 4: 98-113 no'lu kökenlerin <i>p6</i> geninin elektroforetik görüntüsü	44
Resim 5: 97-113 no'lu kökenlerin <i>fts-I</i> S geninin elektroforetik görüntüsü	44
Resim 6: 70 no'lu kökenin <i>bla</i> geni pozitifliği (1. Bölüm) ve <i>bla</i> _{TEM-1} geni pozitifliği (2. Bölüm)	46

ŞEKİL DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1: Beta-laktam antibiyotiklerin etkilediği bölge

18

KISALTMALAR

ABD	:	Amerika Birleşik Devletleri
AMP	:	Ampisilin
AOM	:	Akut Otitis Media
A/S2	:	Ampisilin Sulbaktam
AUG2	:	Amoksisilin Klavulonik Asit
AXO	:	Seftriakson
BLNAS	:	Ampisiline Duyarlı β -laktamaz Negatif
BLNAR	:	Ampisiline Dirençli β -laktamaz Negatif
BOS	:	Beyin Omirilik Sıvısı
CAMHBT	:	Caution Adjusted Mueller Hinton Broth Test
CLSI	:	Clinical and Laboratory Standards Institute
CLA	:	Klaritromisin
CHL	:	Kloramfenikol
EIA	:	Enzyme Immunoassay
ERY	:	Eritromisin
FAC	:	Sefaklor
FEP	:	Sefepim
FIX	:	Sefiksim
FUR	:	Sefuroksim
<i>Hib</i>	:	<i>H.influenzae</i> tip b
HTM	:	<i>Haemophilus</i> Test Medium
IMI	:	İmipenem
KOAH	:	Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı
LA	:	Lateks Aglütinasyonu
LOS	:	Lipooligosakkaritler
LVX	:	Levofloksasin
MERO	:	Meropenem
MİK	:	Minimal İnhibitör Konsantrasyonu
NAD	:	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
PBP	:	Penisilin Bağlayan Protein

PEN	:	Penisilin
PRP	:	Poliribozil Ribitol Fosfat
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SPX	:	Sparfloksasin
SXT	:	Ko-trimaksazol
TET	:	Tetrasiklin

BÖLÜM I

GİRİŞ VE AMAÇ

Ülkemizde *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) infeksiyonları incelendiğinde menenjit, rinit, orta kulak iltihabı, konjunktivit, pnömoni ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı (KOAH) ataklarında sık rastlanan etkenler arasında yer aldığı görülmektedir (1). *Haemophilus influenzae* infeksiyonlarının ilk tedavi seçeneği ampisilindir. Günümüzde ise ampisiline % 5-50 oranında direnç bildirilmektedir. Bu direncin mekanizması, genellikle plazmid aracılığı ile β -laktamaz enzimi üretimine bağlıdır. *Haemophilus influenzae*'da ampisilin direncinin *Escherichia coli*'den bir plazmid yoluyla geçtiği anlaşılmıştır. Ampisilin direnci ilk olarak 1974'te Almanya'da saptanmıştır (2). Ampisilin direncinden, genellikle TEM-1 ya da daha az sıklıkta ROB-1 beta-laktamaz varlığının sorumlu olduğu gösterilmiştir (3). Amerika'da da 1974'te ampisilin direnci bildirilmiştir. Amerika'da β -laktamaz üreten kökenlerin sıklığı; 1983-1984'te % 15,2, 1994-1995'te % 36,4, 1997-1998'te %31,3 olarak bildirilmiştir (4-6). Ülkemizde yapılan çalışmalarda β -laktamaz pozitifliği % 0-37,5 arasında değişmektedir (7,8). Ampisiline dirençli β -laktamaz negatif (BLNAR) kökenler 1980'den sonra tanımlanmıştır. Ampisiline dirençli β -laktamaz negatif kökenlerin direnç mekanizması; penisilin bağlayan protein 3'ü (PBP3) kodlayan *fts-I* genindeki mutasyonlarla septal peptidoglikan sentezindeki değişiklikler sonucunda, β -laktam antibiyotiklerin PBP'lere afinitesinin azalmasıyla oluşur (4,9). Japonya'da BLNAR kökenler 1980'lerde az sayıda iken 1990'larda yapılan bir çalışmada % 19,5 bulunmuştur (10-13). Japonya'da 2007'de yapılan çalışmalarda % 37,1 2010'da ise % 49,2 bulunmuştur (14,15). Amerika Birleşik Devletlerinde (ABD) bu oran % 20-40 dır (6,16-19). Avrupa ülkelerinde ise oranın % 0-33,9 olduğunu bildiren çalışmalar vardır (20,21). Ülkemizde yapılan çalışmalarda BLNAR kökenlerin % 0,6 ile % 5 arasında olduğu rapor edilmiştir (22). Avrupa'da yapılan çalışmalarda ülkemizden gönderilen kökenlerdeki BLNAR oranı % 7,5-11 arasındadır (20,21). Ampisiline dirençli β -laktamaz negatif kökenler diğer β -laktam antibiyotiklere de özellikle sefalosporinlere azalmış hassasiyet gösterir (3).

Bu çalışmanın amacı Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden izole edilen *H. influenzae* kökenlerinde ampisiline direnç oranını ve direnç mekanizmasını belirlemektir.

Çalışma ile;

1. *Haemophilus influenzae* kökenlerinde ampisiline direnç varlığının araştırılması
2. Ampisilin direncine neden olan mekanizmalar ve direnç tiplerinin oranlarının belirlenmesi
3. BLNAR kökenlerin varlığının araştırılması
4. *Haemophilus influenzae* kökenlerinde kullanılan diğer antibiyotiklere karşı oluşan direnç oranlarının araştırılması amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

Tarihçe

Haemophilus influenzae ilk kez 1889-1892 yıllarında Avrupa'da görülen bir pandemiden sonra, 1892'de R.F.J.Pfeiffer tarafından izole edilmiş ve influenza etkeni olarak kabul edilerek "*Influenza bacillis*" şeklinde isimlendirilmiştir. Slawyk 1899 yılında bu etkene bağlı menenjit olguları ortaya koymuştur. Amerikan Bakteriyoloji Cemiyeti 1920'de bakterinin üreyebilmesi için kan faktörlerine gereksinimlerinin olduğunu belirtmek için bakterinin ismini, "*Haemophilus influenzae*" olarak değiştirmiştir. Margaret Pittman 1931 yılında kapsüllü-kapsülsüz *H. influenzae*'ları tanımlamış ve kapsüler polisakkaritlerindeki antijenlerine göre 6 serotip (a-f) tanımlamıştır. Fothergill ve Wright 1935'te *H. influenzae* tip b'ye karşı bakterisidal antikorların serum düzeyi ve hastalığın görülme yaşı arasındaki ilişkiyi tanımlamışlardır. Mortalite ve morbiditesi oldukça yüksek olan *H.influenzae* tip b'de antibiyotik direnci 1974'de gösterilmiştir. *Haemophilus influenzae*'lar Kilian tarafından 1976'da biyokimyasal özelliklerine göre biyotip I'den- biyotip IV'e kadar sınıflandırılmıştır. Daha sonraları biyotip V-VIII bulunmuştur (2,23).

Mikrobiyolojik özellikler

Haemophilus cinsi bakteriler *Pasteurellaceae* ailesinde yer alan küçük, bazen pleomorfik, hareketsiz, sporsuz, 0,2-0,3 mikrometre (µm) eninde ve 0,5-2 µm boyunda aerop veya fakültatif anaerop gram negatif kokobasillerdir. Kapsül polisakkaridinin antijenlerine göre a,b,c,d,e,f olarak altı serotipe ayrılmıştır. İnvaziv infeksiyonların % 95'inden sorumlu olan serotip b'nin kapsülü poliribozil ribitol fosfattan (PRP) oluşur. Kapsülü bulunmayan bakteriler tiplendirilemeyen (nontypable) kökenler olarak adlandırılırlar (2,23,24). *Haemophilus* cinsi bakteriler adi besiyerinde üreyemezler. Üremeleri için X ve/veya V faktörlerine ihtiyaç duyarlar. *Haemophilus* türleri, glukozu fermente ederler. Glukozun fermentasyonu sonucu son ürün olarak süksinik asit, laktik asit ve asetik asit oluşur. Bütün *Haemophilus* kökenleri nitratları indirger ve alkalın fosfataz pozitifdir. *Haemophilus* türlerinde DNA'nın G+C içeriği % 37-44 mol arasında değişmektedir. İnsanlarla ilgili tanımlanmış *Haemophilus* türleri *H. influenzae*, *H. aegyptius*, *H. haemolyticus*, *H. parainfluenzae*, *H. parahaemolyticus*, *H. ducreyi*, *H. aphrophilus*, *H. paraphrophilus*, *H. segnis*, *H. pittmaniae*

ve *H. paraphrohaemolyticus* türleridir (25). *Haemophilus* cinsi bakterilerin başlıca ayırt edici özellikleri tablo I’de verilmiştir.

Tablo I. *Haemophilus* cinsi bakterilerin ayırt edici özellikleri (2)

Bakteri	Üreme faktörü gereksinimi		Fermentasyon					Hemoliz	CO ₂ ihtiyacı
	X	V	glikoz	sükroz	laktöz	mannoz	ksiloz		
<i>H. influenzae</i>	+	+	+	-	-	-	+	-	+/-
<i>H. aegyptius</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+	-	-	-	+	+/-	-
<i>H. ducreyi</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>H. parainfluenzae</i>	-	+	+	+	-	+	-	-	+/-
<i>H. parahaemolyticus</i>	-	+	+	+	-	-	-	+	-
<i>H. segnis</i>	-	+	+	+	-	-	-	-	-
			Zayıf	Zayıf					
<i>H. paraphrophilus</i>	-	+	+	+	+	+	-	-	+
<i>H. aphrophilus</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	+
<i>H. pittmaniae</i>	-	+	+	+	-	+	-	+	-

Staphylococcus aureus başta olmak üzere *Streptococcus spp*, *Neisseria spp*, *Enterococcus spp* ve *Pseudomonas spp* fazla miktarda V faktörü sentezlerler. *Haemophilus influenzae*, *S. aureus*’un hemolitik kolonilerinin etrafında küçük koloniler şeklinde ürer. Bu olaya "satellit fenomeni" veya "süt anne fenomeni" denir. *Haemophilus influenzae*’nın besiyerinde üreyebilmesi için 0,2-1 mg/L nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) ve 10 mg/L hemine ihtiyaç vardır. Bunlardan X faktörü aerobik büyümeyi sağlayan ve demir ihtiva eden bir protoporfirindir. V faktörü ise NAD'nin oluşturduğu bir koenzimdir. Her ikisi de eritrositler içerisinde bulunur ve eritrositlerin parçalandığı tavşan kanı ve at kanı ile hazırlanan çukulatamsı besiyerinde besiyerinde bulunur. Bazı kökenler üremek için % 5-10 CO₂'li ortama gereksinim duyar ve 35-37°C’de iyi ürerler. İndol üretimi, üreaz aktivitesi ve

ornitin dekarboksilaz aktivitesi özelliklerine göre sekiz (I-VIII) biyotipe (Tablo II) ayrılır (23,24).

Tablo II. *H. influenzae* biyotiplerinin özellikleri (2)

Biyotip	İndol	Üreaz	Ornitin Dekarboksilaz	D-glukoz (Asit yapımı)	Nitrat Red	Katalaz	Oksidaz
I	+	+	+	+	+	+	+
II	+	+	-	+	+	+	+
III	-	+	-	+	+	+	+
IV	-	+	+	+	+	+	+/-
V	+	-	+	+	+	+	+
VI	-	-	+	+	+	+	+
VII	+	-	-				
VIII	-	-	-				

Epidemiyoloji

Haemophilus bakterileri, sağlıklı kişilerin üst solunum yolu florasının yaklaşık % 10'unu oluşturur. Baskın tür, oral kavite ve farinkste *Haemophilus* türlerinin dörtte üçünü oluşturan *H. parainfluenzae*'dir. Kapsülsüz *H. influenzae* kökenleri, sağlıklı çocukların çoğunun farinksinde bulunur ve çoğu biyotip II veya III'tür, fakat toplam bakteri florasının % 2'sinden daha azını oluşturur (26).

Haemophilus influenzae, yalnızca insan patojenidir. İnsandan insana hava yolundan damlacıklarla veya salgılara doğrudan temas yoluyla bulaşır. Bulaşma için damlacık ve salgılardaki 10^6 bakteri sayısı yeterlidir. Anneden bebeğe bulaşma ile neonatal infeksiyon gelişebilir (23,24).

Haemophilus influenzae ile meydana gelen nazofaringeal kolonizasyon, ortalama 1,4-2 ay kadar süren taşıyıcılıkla sonuçlanmaktadır (27). Çocukların pek çoğu yaşamın ilk ayından itibaren kapsülsüz kökenlerle kolonize olmaya başlar. Çocukların üst solunum yollarında % 50-80'e varan taşıyıcılık oranları yaş ilerledikçe düşer. Kapsüllü *H. influenzae*'nin taşıyıcılık oranı nadiren % 5'i geçer. Özellikle *H. influenzae* tip b (*Hib*) küçük

çocuklarda % 3-4 oranında bulunur ve ileri yaşlarda bu oran gittikçe düşer. Ülkemizde yapılan çalışmalarda çocuklardaki *H. influenzae*'nin nazofarengeal taşıyıcılığı % 22,8-63,7 arasında değişmektedir (1,28). Aydın ilinde 2001 yılında 7-14 yaş grubu çocuklarda yapılan çalışmada taşıyıcılık oranı % 5,9 bulunmuştur. İzole edilen kökenlerin % 5,4'ünü *H. influenzae* tip b oluşturmaktadır (29).

Üst solunum yolundaki durumun aksine, kronik obstrüktif akciğer hastalığı olan hastalar ise, sıklıkla kapsülsüz *H. influenzae* ile kolonize olur (30). Birçok popülasyonda çocukların aşılansıyla *H. influenzae* serotip b taşıyıcılığı önemli bir şekilde azalmıştır (31).

İnvaziv *H. influenzae* tip b infeksiyonlarının inkübasyon süresi bilinmemektedir (23). *Haemophilus influenzae* tip b ile faringeal kolonizasyon ve hastalığın bulaşı arasındaki ilişki hala tam olarak açıklanamamıştır (32).

Patogenez

Patojeniteden kapsül ve dış membran proteinleri sorumludur. Spesifik tutunma, yayılma ve fagositoza direnç gibi olaylarda etkin olurlar. *H. influenzae* IgA proteaz salgılar. Bu enzim IgA ağır zincirini parçalama yeteneğine sahiptir. IgA proteazlar, nötral endopeptidlerdir. IgA'nın parçalanışı, virulans etkisini artırır (2).

Patogenezdeki ilk adım bakterinin üst solunum yollarına kolonizasyondur. *Haemophilus influenzae* çeşitli adezin molekülleri ile nazofarinkteki özgül reseptörlerine (Tablo III) bağlanır ve çoğalarak kolonize olur. Bu kolonizasyon sonucu asemptomatik taşıyıcılık gelişir. Adezyon moleküllerinin dağılımı ve yaygınlığı tiplendirilemeyen kökenler arasında farklılık gösterir. Kapsüllü *Haemophilus*'lar (özellikle *Hib*) bazı kişilerde submukozaya oradan kan dolaşımına geçer ve başta meninksler olmak üzere vücudun çeşitli bölgelerine yayılır (23). Tiplendirilemeyen kökenler mukozal yüzeylere lokal invazyon yoluyla hastalığa sebep olur ve daha az invazivdir. Fakat bu kökenler de inflamatuvar yanıtı sebep olabilirler. Otitis media'nın patogenezinde; nazofarinkteki bakterilerin östaki tüpü aracılığıyla orta kulağa invazyonu görülür. Lipooligosakkaritlerin (LOS), peptidoglikan parçacıkların ve diğer antijenlerin salınması inflamasyonu başlatır (33).

Tablo III. *H. influenzae*'nin adezinleri (23)

Adezin	Moleküler ağırlık	Özellik
Pili (fimbria)	20-25 kDa	Hif A- Hif E gen bölgesinde kontrol edilir
HMW1, HMW2	120-125 kDa	<i>B. pertussis</i> 'in filamentöz hemaglutini ile aynı. Bakterinin üst solunum yoluna tutunmasında ve kolonizasyonun başlamasında rol oynar
Hap	155 kDa	IgA proteaz ile aynı. Mikrokoloni oluşumunda rol oynar.
Hsf	240 kDa	Yüzey fibrilleri. <i>Hib</i> 'de bulunur. Hia ile homolog
Hia	115 kDa	Tiplendirilemeyen kökenlerde bulunur. HMW1 ve HMW2 içeren kökenlerde bulunmaz.
OMP P5	35 kDa	Dış membran proteini. Müsine bağlanır. Fimbrin olarakta isimlendirilir. <i>Escherichia coli</i> 'deki OMP A adezini ile aynı.
OMP P2	36-42 kDa	Dış membran proteini. Müsine bağlanır.
PE bağlanan adezin	46 kDa	Fosfatidil etanolamine bağlanır.
LOS	2.5-3.3 kDa	Solunum yolu epiteline bağlanır. Silier aktiviteyi bozar

Haemophilus influenzae'nin en önemli virulans faktörü kapsüldür. Diğerleri adezinler, LOS, IgA proteaz ve bakteriyosin (hemosin) dir. Ayrıca *H. influenzae*'nin histamin ürettiği ve insan transferrininden direkt olarak hemini bağladığı bilinmektedir (23).

Haemophilus influenzae tip b infeksiyonlarından korunmada kapsüle karşı oluşan antikorların (anti-PRP) önemi büyüktür (23). *Haemophilus influenzae* tip b solunum yolu epiteline yapışır ve hücreler arası bağlantı bölgelerini parçalayarak intravasküler bölgeye geçer. Kan-beyin omirilik sıvısı (BOS) bariyerini nasıl geçtiği tam aydınlatılamamıştır. Bakteriden salınan lipopolisakkaritler makrofaj ve endotelden salınan interlökin1 β ve tümör nekrozis faktör α düzeyini artırır. Platelet aktive edici faktör, prostaglandinler ve süperoksidler de devreye girerek, BOS' da lökositoz, protein artışı, beyin-kan akımında azalma ve beyin ödemi gibi inflamatuvar yanıtların gelişmesine neden olur (34). Yaşamın ilk aylarında bebekler anneden plasenta yoluyla ve anne sütü ile geçen IgG antikorları ile pasif

olarak korunurlar. Bu dönemde *Hib* ile oluşan neonatal menenjit ve epiglottit nadir görülür. Altıncı aydan itibaren anneden geçen antikorlar azalmaya başlar ve çocuklar kendileri anti-PRP antikorlarına sahip oluncaya kadar 6 ay ile 2 yaş arasındaki dönemde *Hib* infeksiyonlarına çok duyarlı olurlar. Anti-PRP, *Hib* ile temas sonrası ve çapraz etki gösteren diğer antijenlerle temastan sonra oluşur. Aşılamalarla oluşan koruyucu antikorların miktarına bağlı olarak sistemik *Hib* hastalıkları 6 yaşından sonra daha nadir görülür (23,28). *Haemophilus influenzae* tip b infeksiyonlarına karşı korunmada lipooligosakkaridlere ve dış zar proteinlerine karşı oluşan antikorlar da önemlidir. Tiplendirilemeyen *H. influenzae* kökenleri ile oluşan KOAH atakları gibi infeksiyonlarda dış zar proteinleri olan P₂ ve P₅'e karşı oluşan antikorlar tekrarlayan infeksiyonlara karşı koruyucu olmaktadır (23).

Risk Faktörleri

Özellikle *Hib* infeksiyonlarında konağa ait ve çevreye ait hastalığa zemin hazırlayan faktörler vardır.

Konağa Ait Faktörler

Yaş:

Yenidoğanlarda anneden transplasental yolla geçen antikorlar term yenidoğanlar annelerindekine benzer antikor düzeyine sahiptirler. Buna bağlı olarak, yaşamın ilk aylarında *Hib* hastalıkları insidansı düşüktür. Ancak preterm yenidoğanlarda muhtemelen anneden daha az antikor geçişi nedeniyle infeksiyon riski daha fazladır (35).

Süt çocuğu 3-6 aylık olduğunda antikor titreleri en düşük düzeye ulaşır ve sonra *Hib* ya da çapraz reaksiyon veren antijenleri olan başka mikroorganizmalara doğal yollardan maruz kalındığında artışa geçer. *Haemophilus influenzae* tip b hastalığı insidansı bebeklik döneminin ortalarında ve erken çocukluk çağında en yüksek düzeye çıkar. *Haemophilus influenzae* tip b hastalıkları primer olarak 3 ay ile 5 yaş arasındaki çocukların hastalığıdır. İnvaziv hastalık için en büyük risk taşıyan dönem 6-23 aylar arasındadır (36). Hastalık görülme sıklığı, epiglottit hariç antikor titreleri arttıkça azalan bir seyir izler. Epiglottit dışındaki hastalık tablolarının çoğu daha küçük yaş çocuklarda yoğunlaşmıştır. Epiglottit farklı popülasyonlarda farklı insidanslar göstermekle birlikte hastalığın görüldüğü yaş ortalaması 2-3 arasındadır. Diğer hastalık tabloları ise 12-18 aylar arasında sık görülür. Hastalıkların görüldüğü yaş aralıklarındaki farkın sebebi bilinmemektedir (35,36).

Cinsiyet:

Birçok araştırmada *Hib* hastalığı hızının erkek ve kız çocuklarda eşit olduğu bildirilmişse de bütün çalışmalar göz önüne alındığında erkeklerde hafif bir baskınlık gösterdiği düşünülebilir ancak fark çok küçüktür. Genelde *Hib* hastalıkları için cinsiyet dağılımı pnömoni ve epiglottit hariç eşittir. Epiglottitin erkeklerde fazla olduğu görülmektedir. Çoğu çalışma 1,5-2/1 erkek/kız oranı gösterir. *Haemophilus influenzae* tip b pnömonisi de erkeklerde daha fazladır (34,35,37).

Genetik:

Yerliler, Eskimolar ve Amerikan kıızılderilileri yüksek *Hib* hastalığı insidansına sahiptir. Ancak bu durumun kalabalık ortamlarda kötü hijyenik koşullarda yaşamaya bağlı olması olasıdır (38).

Hematolojik ve İmmün Sistem Hastalıkları:

Orak hücreli anemi, aspleni, antikor eksikliği sendromları, kompleman eksikliği ve kanser (özellikle kemoterapi esnasında) gibi hastalıklarda invaziv hastalık riski artar. (39).

Astım ve Kronik Akciğer Hastalıkları:

Solunum yolu sekresyonları artışı ve inflamasyon hastalığa zemin hazırlar. İsviçre’de astım ve allerjik hastalık öyküsü ile *Hib*’e bağlı epiglottit arasında ilişki saptanırken, *Hib* menenjitisi için riskin artmadığı görülmüştür (40).

Çevresel Faktörler

Kalabalık Faktörü:

Haemophilus influenzae tip b enfeksiyonu asemptomatik *Hib* taşıyıcılığı ya da invaziv *Hib* hastalığı olan hastayla yakın temas sonucu bulaşır. Amerika’da yapılan çalışmalar kalabalık faktörünün *Hib*’ye bağlı hastalık sıklığını artırdığını göstermiştir. Kalabalıklık faktörü ailede yaşayan kişi sayısı fazlalığına (özellikle çok sayıda kardeş olmasına) ve evdeki odaların küçük ve sayısının az olmasına bağlıdır. Günlük bakım merkezlerine, kreşe, anaokuluna devam eden çocuklarda hastalık riski artmaktadır. Enfeksiyonlu çocukların başka

çocukları infekte etmesi bu gibi ortamlarda daha olasıdır. Özellikle ilkokula giden kardeşleri olan çocuklarda riskin arttığı görülmüştür (39).

Viral Üst Solunum Yolu Enfeksiyonları:

Solunum sekresyonlarının yapımını ve yayılımını artırarak *H. influenzae* enfeksiyonu gelişimine zemin hazırlar (39).

Anne Sütü:

Anne sütü ile besleme, 6 aylıktan küçük süt çocuklarında invaziv *H. influenzae* hastalığına karşı % 90'ın üzerinde koruma sağlar; olasılıkla bu, anne sütünde bulunan antikorların, *H. influenzae*'nin nazofarinkste kolonizasyonunu önleyici etkisine bağlıdır (37).

Sigara:

Sigara dumanı ve solunum yolunu tahriş eden diğer maddelere maruz kalmak, solunum yolunda koloniler oluşturmasını kolaylaştırarak invaziv *H. influenzae* hastalığı riskini artırır (37).

Sosyoekonomik Düzey ve Anne/baba Eğitim Düzeyi:

Ailenin sosyoekonomik düzeyinin ve eğitim düzeyinin düşük olması hastalık riskini arttıran sebeplerdendir (37).

Klinik

Haemophilus influenzae çeşitli solunum sistemi enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Birçok ülkede aşılama programları uygulanıncaya kadar, bakteriyel menenjitin üç ana etkeninden birisi idi. *H. influenzae* tip b invaziv hastalıkların % 95'inden sorumludur (23). *Haemophilus influenzae*'nin oluşturduğu hastalıklar tablo IV'te gösterilmiştir.

Tablo IV. *H. influenzae*'nin oluşturduğu klinik tablolar (2)

Klinik tablo	Açıklama
Menenjit	Ensık <i>H. influenzae</i> tip b ile oluşur
Sellülit	Ensık <i>H. influenzae</i> tip b ile oluşur
Epiglottit	Ensık <i>H. influenzae</i> tip b ile oluşur
Septik artrit	Ensık <i>H. influenzae</i> tip b ile oluşur
Pnömoni	Ensık <i>H. influenzae</i> tip b ile oluşur
Perikardit	Ensık <i>H. influenzae</i> tip b ile oluşur
Bakteremi	Hem tiplendirilemeyen hem de <i>Hib</i> ile birlikte sık görülür
Otitis media	Tiplendirilemeyen <i>H. influenzae</i> ile daha sık oluşur
KOAH alevlenmesi	Tiplendirilemeyen <i>H. influenzae</i> ile daha sık oluşur
Toplum kökenli pnömoni	Tiplendirilemeyen <i>H. influenzae</i> ile daha sık oluşur
Konjuktivit	Tiplendirilemeyen <i>H. influenzae</i> ile daha sık oluşur
Sinüzit	Tiplendirilemeyen <i>H. influenzae</i> ile daha sık oluşur

Menenjit:

Haemophilus influenzae'nin infeksiyonları içinde en ciddi ve akut müdahale gerektiren şeklidir. İlk belirtileri; sıklıkla üst solunum yolu infeksiyonu semptomları şeklinde görülür (23). *Haemophilus influenzae* tip b özellikle 3 ay 3 yaş arasında bakteriyel menejit etkeni 3 bakteriden biridir (diğerleri meningokok ve pnömokok). Tedavisinde erken tanı koyma ve tedaviye başlama büyük önem taşır. (34). Çalışmaların çoğunda *H. influenzae* menenjitlerinin % 97'den fazlasına *Hib*'in yol açtığı gösterilmiştir (34,35,39).

Sellülit:

En sık yanakta veya periorbital bölgede menekşe rengi ya da erizipel benzeri görünüm oluşur. Sıklıkla kan kültüründe ve yanaktan alınan aspirattan üretilebilir (23,34).

Epiglottit:

Genellikle 2-7 yaş çocuklarda görülür. Boğaz ağrısı, ateş, nefes darlığı ile başlar oral sekresyon artışı ve ağızdan salya akması ile klinik hızla kötüleşir. Birkaç saat içinde gerekli tedavi başlanmazsa ölüm kaçınılmazdır (23). *Haemophilus influenzae* tip b kandan ve

farinks yüzeyinden kültür ile üretilebilir. Hastalar dikkat çekici bir şekilde başları öne eğik olarak, hava yolunu açık tutmaya çalışırlar. Entübasyon ve antibiyotik tedavisi bu tabloyu hızla geri döndürür (34).

Septik Artrit:

Haemophilus influenzae 2 yaşından küçük çocuklarda septik artritın sık nedenlerindendir. Tipik olarak büyük eklemleri özellikle kalça eklemi tutar. Eklemde ağrı, şişlik, hareket kısıtlılığı görülür. Ancak belirtiler daha silik görülebilir (23). Büyük eklem tutulumu olduğu zaman etkilenen bölgenin direnaji, hem organizmanın identifikasyonu, hem de iyileşme açısından önem taşır (34).

Pnömoni:

Çocuklarda *H. influenzae*'nın neden olduğu primer akciğer infeksiyonunu belirlemek zordur. Genellikle 4 ay 4 yaş arasında kış veya bahar aylarında, sıklıkla plevra tutulumu ile seyreden ve hastaneye yatış gerektiren konsolidatif bir pnömonidir (23). Pnömoninin etiyolojisini belirlemeye çalışan duyarlı ve özgül testlerin olmaması nedeniyle tanı zorlaşmaktadır. Çoğu çocuk muhtemelen üst solunum yolu infeksiyonu için verilen antibiyotiklerle tedavi olmaktadır (34,37). *Haemophilus influenzae* ile oluşan pnömoni *S. aureus* veya *S. pneumoniae*'nin neden olduğu bakteriyel pnömonilerden daha sinsi bir klinik özellik gösterir (23).

Perikardit:

Sık olmamasına rağmen perikardit, klinik semptomların özgül olmaması ve hızlı başlaması nedeniyle ürkütücüdür. Çocukta solunum sıkıntısı tek semptom olmasına karşın göğüs röntgeni normaldir. Çocukta altta yatan neden pnömoni ya da menenjit olabilir. Perikardial eksüda tedavi başlatıldıktan sonra birkaç gün devam eder (34).

Bakteriyemi:

Haemophilus influenzae tip b ile oluşan hastalık tablosunda çocuklar toksik görünümündedir ve infeksiyon odağı olmaksızın bakteremi gelişebilir. Kan kültürü pozitifliği ile teşhis edilir. En fazla 6-36 aylık bebeklerde görülür. Genellikle ateş, iştahsızlık ve uyuşukluk görülür. Özellikle orak hücre hastalığı olan ya da splenektomi geçiren çocuklar daha

duyarlıdırlar. Erken tanı ve tedavi bu kişiler için kritik önem taşır. Tedaviye erken başlanmazsa tablo hızla daha da kötüye gidebilir ve septik şok gelişebilir (23,34,37). Tiplendirilemeyen *H. influenzae*'lar ile oluşan bakteremilerde erişkinlerin çoğunun alkolizm, kardiyopulmoner hastalık veya kanser gibi altta yatan bir hastalığı vardır. Bakteriyeminin kaynağı genellikle solunum yolu enfeksiyonudur. Tiplendirilemeyen *H. influenzae*'nın bakteriyemik enfeksiyonları önemli bir mortalite nedenidir (23).

Otitis Media:

Akut otitis media vakalarının yaklaşık dörtte birinden tiplendirilemeyen *H. influenzae* sorumludur. Her yaşta görülmekle beraber en sık 6 ay-5 yaş arasında görülür. Klinik, büyük çocuklarda kulak ağrısı, bebeklerde ise ateş ve huzursuzluk şeklinde görülür. Otit epizodundan önce sıklıkla geçirilmiş viral üst solunum yolu enfeksiyonu hikayesi vardır (23).

Kronik Obstrüktif Akciğer Hastalığı (KOAH) Alevlenmesi:

Kronik obstrüktif akciğer hastalığının seyri aralıklı alevlenme ile karakterizedir. Bu alevlenmelerin yaklaşık yarısını bakteriyel nedenler oluşturmaktadır. Bakteriyel nedenlerden de en sık tiplendirilemeyen *H. influenzae*'ların neden olduğu tahmin edilmektedir (41). Ateş genellikle yok ya da düşük derecelidir. Balgamin Gram boyamasında bol miktarda gram negatif kokobasil vardır (23).

Toplum Kökenli Pnömoni:

Tiplendirilemeyen *H. influenzae*'lar özellikle yaşlı, KOAH'lı ve kazanılmış bağışıklık yetmezliği sendromu olan yetişkinlerde önemli bir pnömoni nedenidir. Klinik özellikleri diğer bakterilerin neden olduğu pnömonilerden ayırt edilemez ve ateş, öksürük, pürülan balgam görülür. Balgamin Gram boyamasında bol miktarda gram negatif kokobasil vardır (23,42).

Konjunktivit:

Tiplendirilemeyen *H. influenzae*'lar pürülan konjunktivitinin önemli bir nedenidir. Klinik özellikleri konjonktival hiperemi ve pürülan akıntıdır (23).

Sinüzit:

Doğrudan sinüs aspirat kültürleri kullanılmış çalışmalarda akut sinüzitin sık görülen nedenlerinden biri de tiplendirilemeyen *H. influenzae* olduğunu göstermektedir. Hastalarda burun tıkanıklığı, pürülan burun akıntısı, baş ağrısı ve yüz ağrısı görülmektedir (23). Hastanemizde 1997-1999 yıllarında akut maksiler sinüzitin mikrobiyolojik tanısı amacıyla yapılan çalışmada izole edilen kökenlerin % 30,4'ünü *H. influenzae* oluşturmaktadır (43).

Komplikasyonlar

Haemophilus influenzae'ya bağlı komplikasyonların çoğu küçük yaşlardaki menenjitli hastalarda görülür (Tablo V). Çok küçük yaştaki çocuklar fulminan hastalıklara yakalanırlar ve lokal semptomları çok azdır. Beyne olan etkileri nedeniyle, hastalık ilerlemeden hem ebeveynler, hem de klinisyenler menenjite karşı dikkatli olmalıdır (34,35).

Tablo V: *H. influenzae* infeksiyonlarının neden olduğu komplikasyonlar (34)

Komplikasyon	Açıklama
Subdural sıvı birikimi	Sıklıkla <i>Hib</i> menenjiti ile birlikte
İşitme kaybı	<i>Hib</i> menenjitinin en yaygın sekelidir
Entellektüel fonksiyonlarda bozulma	<i>Hib</i> menenjiti sonrası çocukların %5-20'sinde görülür
Nörolojik kayıplar	Menenjit sonrası görülebilir
Görsel kayıplar	Menenjit sonrası görülebilir
Eklem deformiteleri	Septik artrit geçiren hastaların %50'ye yakınında görülür
Hipoksik beyin zedelenmesi	<i>Hib</i> epiglottiti sonrası beyin hipoksisine bağlı görülür

Tanı

Menenjit, epiglottit, selülit ve septik artritin ön tanısı hastanın hikayesi ve klinik bulgularına göre yapılır. Mikrobiyolojik incelemelerle etkenin tanımlanması ve klinik tanının doğrulanması gerekir. Alınan örnekler taşıma besiyerine konup olabildiğince hızlı bir şekilde laboratuvara ulaştırılmalıdır (23,44).

Örneklerin toplanması:

Nazofarinks sürüntülerinde *H. influenzae* üretilmesi çok anlamlı değildir. Çünkü sağlıklı popülasyonda yüksek oranda taşıyıcılık vardır. Kan, BOS, eklem, plevra ve perikart sıvıları gibi normalde steril olan vücut sıvıları tanı amacıyla kullanılabilir. Menenjit, sellülit, septik artrit ve pnömoni tanısında infeksiyon bölgelerinden alınan örneklerin yanısıra kan kültürleri de yapılır. Epiglottit tanısı kan kültürü ile konur. Bu amaçla arka farinksten örnek alınmamalıdır. Çünkü bu işlem hava yollarının tamamen tıkanmasına neden olabilir (24,41). Akut otitis media (AOM) tanısı için timpanosentez ile alınan orta kulak sıvısı, KOAH alevlenmeleri ve pnömonide bronkoskopi ile alınan örnekler etyolojik tanı için kullanılabilir (24,41).

1) Örneklerin direk incelemesi:

a) Boyama yöntemleri: Klinik örneklerin direk Gram boyama ile incelemesi duyarlı ve özgüdür. Tedavi uygulanmamış *Haemophilus* menenjitli hastalardan alınan BOS örneklerinin % 80'inden fazlasında küçük gram negatif kokobasiller ve pleomorfik bakteriler görülebilir (24,41,44).

b) Hib kapsül antijeninin tespiti: BOS ve çeşitli vücut sıvılarında *Hib* kapsül antijeninin hızlı tanımı için kapsül şişme reaksiyonu ve ayrıca lateks aglütinasyonu (LA), enzim immünassay (EIA), polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), nükleik asit problemleri ve monoklonal antikorlar kullanılabilir. Epiglottit tanımında IgM ve IgG antikorlarının belirlenmesi için ELISA uygulanabilir (24,41).

Eski kültürlerde kapsüller yapı bozulmaya eğilimli olduğu için kökenlerin serolojik tiplendirmesinde kullanılacak bakteriyel süspansiyonlar yeni (12-18 saat) kültürlerden hazırlanmalıdır. Bakteri süspansiyonu, formalin içeren normal tuzlu suda yapılmalı ve 1 dakika içerisinde antijen-antikor reaksiyonunun tamamlanmasına izin verecek yeterli miktarda yoğunluğun oluşması sağlanmalıdır. Pozitif bir lam aglütinasyonu reaksiyonunda bütün bakteriler aglütine olur ve kümeler arasındaki sıvı berraktır. Sadece bir dakika içerisinde oluşan kuvvetli reaksiyonlar pozitif olarak kabul edilmelidir (45).

2) Kültür:

Haemophilus türlerinin izolasyonu yapılırken bu grup bakterilerin özel üreme gereksinimleri göz önünde bulundurulmalıdır (Tablo I). İki üreme faktörü X ve V faktör, kan hücrelerinde bulunmakta, fakat kanlı besiyerinde bulunmamaktadır. Kanlı besiyerinde sadece X faktörü bulunmaktadır. V faktörünün salınması için çukulatamsı besiyerinde olduğu gibi kan hücreleri kısa bir ısıtmayla parçalanmalıdır. Isı ile muamele V faktörünün salınmasına neden olur. Ayrıca kanda bulunup, V faktörünü tahrip eden enzimleri de (NADase) inaktive etmektedir. Kan, BOS ve diğer vücut sıvısı örnekleri çukulatamsı besiyerine ekilir (44,45).

Geleneksel kanlı besiyerinde üreme ekim yapılmış besiyerinin bir ucundan diğer ucuna çapraz bir şekilde stafilokok veya enterokok kökeni ekilerek V faktör kaynağı sağlanmasıyla elde edilebilir. Bu bakteriler V faktörünü sağlarlar ve satellit (uydu) koloniler şeklinde üreyen *Haemophilus* türlerinin üremesini sağlarlar. Alternatif olarak, V faktörü emdirilmiş bir kağıt şerit veya filtre kağıdından yapılmış diskin besiyerinin üzerine konmasıyla da V faktörü sağlanabilir (24,41).

Haemophilus kolonileri nispeten yavaş üremeleri ve ufak olmaları nedeniyle, flora bakterilerinin çok olduğu bölgelerden yapılan kültürlerde, kolaylıkla gözden kaçabilir. Gerekli durumlarda, seçici antibiyotikler içeren besiyerleri veya özel bir inkübasyon işlemi ile bu sorun giderilebilir. Solunum sistemi örnekleri gibi flora bakterileri içerebilecek klinik örnekler için basitrasin (300 mg/l), vankomisin (5 mg/l) ve klindamisin (1 mg/l) içeren çukulatamsı besiyeri kullanılır (41). Kistik fibrozlu hastalardan alınan balgam kültürlerinde, *Pseudomonas aeruginosa*'nın, *H. influenzae*'yı baskılayacak şekilde çok fazla üremesi, litrede 300 mg basitrasin içeren çukulatamsı besiyerlerine yapılan ekimlerin, anaerob ortamda inkübe edilmesiyle, tam olmasa da çözümlenmiştir. Üst solunum yollarından yapılan kültürlerde, *Haemophilus* türlerinin tespiti de önemli ölçüde artmıştır. Bununla beraber, mikroflorada bulunan hemofillerin nispi oranını değerlendirmek için mutlaka seçici olmayan bir besiyeri kullanılmalıdır. Alt solunum yolu sekresyonları ve aspirasyon sıvıları veya lokalize infeksiyonlardan alınan cerahat sürüntüleri hem stafilokok çizgi ekimi yapılmış % 5 kanlı besiyerine hem de çukulatamsı besiyerine ekilmelidir (45). Ekim yapılan besiyerleri 35-37°C de % 5-10 CO₂'li ortamda 24-48 saat inkübe edilir. Çukulatamsı besiyerinde 1-2 mm çapında yuvarlak, saydam, şebnem tanelerine benzeyen kolonilerin X ve V faktörlerine gereksinimleri ve biyokimyasal özellikleri incelenir. İndol üretimi, üreaz ve ornitin dekarboksilaz aktiviteleri araştırılarak biyotipler belirlenir (24,41,44).

2) Tanımlama:

Kanlı besiyerlerindeki kültürlerde tespit edilebilen, satellit fenomeni, insanlardan izole edilen V faktörüne gereksinim duyan bütün *Haemophilus* türlerinin tanımı için uygun bir yöntemdir. Bununla beraber, *Pasteurella multocida*'nın nadir kökenleri hayvan patojeni olan bazı *Actinobacillus* ve *Pasteurella* türleri gibi bakteriler, her zaman V faktör gereksinimi olmasalar da, uydu şeklinde koloniler yaparak üreme gösterebilir (45).

Haemophilus'ların X faktörü gereksiniminin tespiti, bir besiyerinde X faktörü içeren kağıt diskin etrafındaki üremenin gösterilmesiyle ya da kan içermeyen besiyerinde X+V faktörü içeren kağıt diskin etrafındaki üremenin gösterilmesiyle yapılmaktadır (41).

Haemophilus cinsi bakterilerin tür tanımını yapmak için piyasada çeşitli ticari kitler bulunmaktadır. Bu kitler; BBL Crystal N/H ID (Becton Dickinson, Cockeysville, MD, USA), API NH (bioMerieux Inc. Hazehwood, Mo.), Vitek NHI Card V1308 (bioMerieux), *Haemophilus* ID test kiti (Remel, Lenexa, Kans.), RIM-H sistemi (Austin Biological Laboratories, Austin, Tex), ve Rapid ID NF (Innovative Diagnostics, Norcross, Ga.)'dır. Bununla beraber bu testlerin çoğu ek testler olmaksızın bir kökeni tür seviyesinde hassas olarak tanımlayacak yeterli bilgiyi sağlayamamaktadır. Bundan dolayı beklenmedik bulguların geleneksel testlerle doğrulanması tavsiye edilmektedir (45).

Tedavi

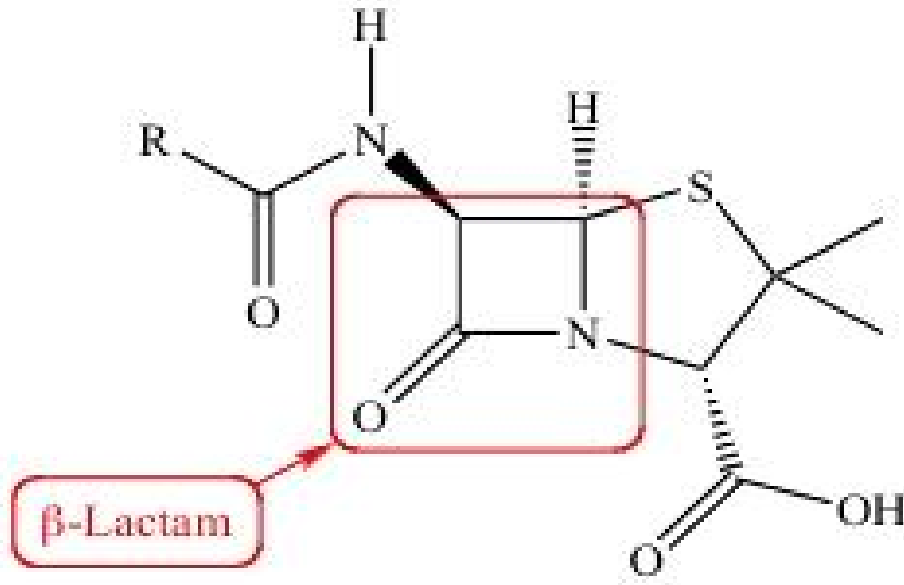
Özellikle menenjit ve epiglottit gibi *Hib* infeksiyonları eğer tedavi edilemezse hızla öldürücüdür. Bu invaziv infeksiyonların tedavisinde sefotaksim, seftriakson ve seftazidim gibi üçüncü kuşak sefalosporinler kullanılır. *Hib* menenjitli hastalarda nörolojik sekelleri azaltmak için tedaviye kortikosteroidler ilave edilir (41).

Otitis media, KOAH alevlenmeleri gibi tiplendirilemeyen kökenler ile gelişen infeksiyonlarda oral antibiyotikler kullanılır. Eğer köken hassas ise ampisilin veya amoksisilin tek başına kullanılabilir. Ancak dünyada çeşitli coğrafik bölgelerde farklılık gösteren beta-laktamaz üretimi de dikkate alınarak amoksisilin+klavulanat kombinasyonu ya da florokinolonlar, makrolidler (azitromisin, klaritromisin) veya geniş spektrumlu sefalosporinler kullanılır (2,41). Penisilin bağlayan proteinlerdeki mutasyonlara bağlı olarak ampisilin MİK değerlerinin yükseldiği beta-laktamaz negatif kökenler de vardır. Bu kökenler BLNAR olarak isimlendirilir. Japonya'da % 19,5-49 (10-15) Amerika birleşik devletlerinde bu oran % 20-40 (6,16-19) Avrupa ülkelerinde ise oranın % 2,6-33,9 olduğunu bildiren

çalışmalar vardır (20,21). Ülkemizde yapılan çalışmalarda BLNAR kökenlerin % 0.6 ile % 5 arasında olduğu rapor edilmiştir (22). Bu nedenlerle tedavide direncin görülmemesi nedeniyle 3. kuşak sefalosporinlerin kullanımı ön plana çıkmıştır (46,47).

***Haemophilus influenzae* tedavisinde Kullanılan Antibiyotikler**

1)Beta-Laktamlar:



Şekil 1. Beta-laktam antibiyotiklerin etkilediği bölge

Beta-laktamlar, kimyasal yapılarında ortak bir beta-laktam halkası taşıyan (şekil 1) ve hücre duvar sentezini inhibe ederek antibakteriyel etkinlik gösteren geniş bir antibiyotik grubudur. Bu grup, beta-laktam halkasına bağlı yan zincirler ve diğer halkalara göre sınıflandırılmışlardır. Beta-laktam ilaçlar, hücre duvar sentezinin transpeptidasyon basamağında görev alan transpeptidaz ve karboksipeptidazlara (penisilin bağlayan proteinler; PBP) bağlanarak etki ederler. Değişik PBP'lerin farklı beta-laktam ilaçlara bağlanma yatkınlıkları ve etkilendikleri ilaç düzeyleri birbirinden farklıdır. Bu durum beta-laktam antibiyotiklerin antibakteriyel etkinliklerinin neden birbirinden farklı olduğunu kısmen açıklayabilir. Beta-laktam antibiyotikler bakterisidal etkilidirler ve bu etkileri yavaştır. Bakteri ölümünde; infeksiyon bölgesinde yüksek konsantrasyonda ilaç bulunmasından çok, uzun süreli beta-laktam antibiyotik varlığı daha etkili olmaktadır. Yalnız üreme fazındaki

bakterilere etkilidirler ve maksimum etkilerini minimum inhibisyon konsantrasyonlarının çok üzerine çıktıklarında gösterirler (47,48).

a) Penisilinler: Beta-laktam antibiyotiklerin önemli bir kısmını içeren bu antibiyotikler doğal, semisentetik ve geniş spektrumlu penisilinler olmak üzere üç başlık altında incelenmektedir. Kimyasal olarak bir tiazolidin halkasına bir beta-laktam halkası eklenmesi ile oluşan 6 -aminopenisilanik asit (6-APA) çekirdeği içerir. Bu tiazolidin halkası ve ekler antibakteriyel spekturum ve farmakolojik özellikleri belirler. Doğal penisilinler *Penicillium* cinsi küflerden elde edilir (46,47). Geniş spektrumlu penisilinler aminopenisilinler, karboksipenisilinler ve üreidopenisilinlerden oluşmaktadır. Ampisilin, amoksisilin ve bakampisilin aminopenisilinler içinde yer almaktadır. Ampisilin *H. influenzae* tedavisinde ilk seçenek olarak kullanılmaktadır (46).

b) Beta-laktamaz inhibitörleri: Beta-laktamaz inhibitörleri, beta-laktam halkası taşımalarıyla beta-laktam antibiyotiklere çok benzeyen, ancak tek başına kullanıldıklarında antibakteriyel etkinlikleri olmayan veya az olan maddelerdir. Klinik kullanımda olan üç tane beta-laktamaz inhibitörü vardır. Bunlar klavulanik asit (klavulanat), sulbaktam ve tazobaktamdır. Amoksisilin ve tikarsilin klavulanatla; ampisilin sulbaktamla ve piperasilin de tazobaktamla kombine edilerek bu antibiyotiklerin beta-laktamazlardan etkilenmesi önlenmiştir (49).

c) Sefalosporinler: Sefalosporinler, bir fungus olan *Cephalosporium acremonium*'un fermentasyon ürünlerinden 1945 yılında elde edilmişlerdir. Ancak sefoksitin, streptomyces'den elde edilir. Sefalosporinler bir beta-laktam halkası ile dihidrotiazin halkasının birleşmesinden oluşmuş 7-amino- sefalosporanik asit (7-APA) nükleusu içerirler. Bu yapıya değişik yan ürünlerin bağlanması sefalosporinlerin antibakteriyel aktivite ve farmakokinetik özelliklerini değiştirir. Penisilinler gibi bakteri hücre duvarının peptidoglikan sentezini inhibe edip, bakterisidal etki gösterirler (46,49).

Bu antibiyotikler etki spektrumları dikkate alınarak 4 kuşağa ayrılırlar. Birinci kuşakta sefadroksil, sefazolin, sefalekssin, sefaloridin, sefalotin, sefapirin ve sefradin; ikinci kuşakta sefaklor, sefamandol, sefonisid, seforonid, sefprozil, sefuroksim, sefotetan, sefmetazol, sefoksitin ve sefaklorun karbasefem analogu olan lorakarbef; üçüncü kuşakta

sefiksim, sefoperazon, sefotaksim, sefpodoksim, seftazidim, seftizoksim ve seftriakson; dördüncü kuşakta ise sefepim ve sefpirom yer almaktadır (46).

Birinci kuşak (dar spektrumlu) sefalosporinler, gram pozitif bakterilere en etkili sefalosporin grubudur. Buna karşın gram negatif bakterilere karşı orta derecede etkinlik gösterirler (46,47).

İkinci kuşak (genişletilmiş spektrumlu) sefalosporinler, birinci kuşaklara yakın veya eşit bir gram pozitif etkinliğe sahiptirler. Bunun yanında, gram negatif bakterilerde bulunan beta-laktamazlara dayanıklı olmaları nedeniyle, gram negatif bakterilere karşı etkinlikleri de artmıştır. Sefoksitin tüm sefalosporinler arasında en iyi anti-anaerob etkinliği olan ilaçtır, bundan dolayı intraabdominal infeksiyonlarda ilk seçeneklerden biridir. Diğer ikinci kuşak sefalosporinler solunum yolları infeksiyonlarında ilk seçenek ilaçlar arasındadır (46,47,49).

Üçüncü kuşak (geniş spektrumlu) sefalosporinler; birinci kuşak sefalosporinlere göre, gram pozitif koklara daha az, ikinci kuşak sefalosporinlere göre ise *Enterobacteriaceae* ve *P.aeruginosa*'ya daha fazla etkilidirler. Bu gruptan sefotaksim ise gram pozitif etkinliği en iyi olan sefalosporindir. Beyin-omurilik sıvısına iyi geçtiklerinden ve menenjit etkenlerinin tümüne etkili olduklarından dolayı akut bakteriyel menenjitlerin tedavisinde önemli seçeneklerdendir (47,49).

Dördüncü kuşak sefalosporinler; gram negatif bakterilere karşı üçüncü kuşak sefalosporinler gibi; gram pozitif bakterilere de birinci kuşak sefalosporinler gibi etkilidirler. Gram negatif bakterilerle oluşmuş ciddi infeksiyonlar ve febril nötroopenik hastaların başlangıç tedavisinde önerilirler (46,49).

d)Karbapenemler: Karbapenemler, mevcut antibiyotikler içinde en geniş etki spektrumuna sahip gruptur. Beta-laktamaz enzimlerine son derece dayanıklıdır. Gram pozitif ve gram negatif bakterilerdeki PBP1 ve PBP2'ye bağlanarak bakteri hücresinin lizisine neden olurlar. Klinikte, geniş spektrumlarından dolayı en son seçenek olarak, ciddi infeksiyonların tedavisinde kullanılırlar (47-49).

e)Monobaktamlar: Monobaktamların klinikte kullanılan örneği aztreonamdır. Yapısındaki beta-laktam halkasına ekli başka bir halka bulunmaması ile diğer beta-laktamlardan ayrılır. Gram negatif bakterilerde, PBP3'e bağlanarak hücre duvar sentezini

inhibe eder. Dar spektrumundan dolayı polimikrobiyal infeksiyonlarda tek başına kullanılmamalıdır (46,47,49).

3) Protein Sentezini İnhibe Eden Antibakteriyel İlaçlar:

a)Tetrasiklinler: Tetrasiklinler tRNA'nın ribozoma bağlanmasını bloke ederek bakteriyostatik etki gösteren bir antimikrobiktir. Tetrasiklin, protein sentezi yapmakta olan 70S ribozomun 30S alt ünitesinde tRNA molekülünün yerleşeceği bölge ile birleşir. Bunun sonucu tRNA'nın getirdiği aminoasit, sentezlenen polipeptide bağlanmaz ve protein sentezi duraklayıp bundan sonra devam edemez. Bu etki bakteriyostatiktir. Tetrasiklinlerin insan hücrelerinde de protein sentezini de etkilemesine rağmen, seçici etkisiyle bakteri hücrelerine insan hücrelerinden daha fazla girer (46,47,50).

Klortetrasiklin, oksitetrasiklin ve tetrasiklin kısa etki süreli (yarılanma ömürleri 3-5 saat), demoklosiklin ve metasiklin orta etki süreli (yarılanma ömürleri 9-12 saat) doksisisiklin ve minosiklin ise uzun etki süreli (yarılanma ömürleri 14-16 saat) bileşiklerdir. Gram pozitif ve gram negatif bakterilere, aerob ve anaerob mikroorganizmalara, spiroket, riketsiya, klamidy ve mikoplazmalara etkilidir (46,47,50).

b)Kloramfenikol: Kloramfenikol, *Streptomyces venezuelae*'den elde edilir. Tiamfenikol, benzer etki spektrumuna sahip bir kloramfenikol analogudur. Kloramfenikol 50S alt üniteye bağlanarak peptidiltransferaz enziminin aminoasite erişmesi ve onun oluşmakta olan polipeptide, peptid bağı ile bağlanmasını engelleyip, protein sentezini durdurur. Kloramfenikolün 50S alt üniteye bağlanması geri dönüşümlü bir olaydır ve antibiyotiğin etkisi bakteriyostatiktir. Yine de terapötik dozlarda *Haemophilus*, Pnömonokok ve Meningokoklara, bakterisidal etki gösterir (46,47,50).

c)Makrolidler: Bu grubun prototipi eritromisin'dir. Eritromisin, *Streptomyces erythreus*'dan elde edilir. Diğer doğal analoglar; oleandomisin, spiramisin ve josamisinidir. Klaritromisin ve azitromisin daha geniş etki spektrumuna sahip, semisentetik makrolidlerdir. Makrolid antibiyotikler 50S ribozomal alt üniteye bağlanarak translokasyon reaksiyonunu bloke ederler ve peptid zincirinin uzamasını önleyip, protein sentezini inhibe ederler.

Normalde bu etki bakteriyostatiktir. Ancak yüksek konsantrasyonlarda, bazı bakteriler için bakterisidal olabilir (46,47,50).

4) Nükleik Asit Sentezini İnhibe Eden Antibakteriyel İlaçlar:

a)Sulfonamidler ve Trimetoprim: Sulfonamidler, PABA ile kompetatif olarak dihidrofolat sentezini inhibe ederler. Trimetoprim ise, dihidrofolat redüktazı inhibe ederek dihidrofolattan tetrahidrofolat sentezlenmesini engeller. Bu prekürsör sentezi inhibisyonu sonuçta bakteriyel DNA sentezinin de durmasına neden olur. Aynı biyolojik yolun iki ayrı kademede durdurulması dolayısıyla sulfonamidler ve trimetoprim kombinasyonu (trimetoprim-sülfametoksazol) sinerjistik etkilidir ve direnç gelişmesi olasılığını azaltır. Trimetoprim-sulfametoksazol kombinasyonu, gram pozitif ve gram negatif birçok bakteriye etkilidir (46).

b)Kinolonlar: Bu grupta bulunan antimikrobikler arasında; ofloksasin, siprofloksasin, pefloksasin, norfloksasin, enoksasin, levofloksasin ve moksifloksasin yer almaktadır. Tüm kinolonların etki mekanizması hemen hemen aynıdır ve bu etkilerini DNA sentezini bozarak gösterirler. Etkileri bakterisidaldir. Kinolonlar bakteri hücreindeki DNA-giraz (topoizomeraz II) enzimine bağlanıp, bakterilerin bölünmesini engelleyerek etki ederler. Bu şekilde bakteri anormal şekilde uzayarak ölür. Kinolonların gram pozitif etkinliği gram negatif etkinliklerine göre çok sınırlıdır (46,49).

H. influenzae tedavisinde Kullanılan Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları

1) β -laktamaz aracılı direnç:

Haemophilus influenzae'da TEM-1 ve ROB-1 tip olarak iki ayrı β -laktamaz belirlenmiştir. β -laktamaz aracılı ampisilin direnci ilk olarak 1970'lerde saptanmış ve 1975'de TEM-1 tip olarak tanımlanmıştır. ROB-1 tip β -laktamaz ilk kez 1981 yılında bulunmuş ve bu enzimin prevalansının TEM-1'e göre daha düşük olduğu görülmüştür. Her ikisinde plazmid aracılı sınıf A serin beta-laktamazlar grubundadır. Beta-laktamazlar klavulanat gibi bir β -laktamaz inhibitörü tarafından etkili olarak inhibe edilir. Küçük çocuk

izolatlarında, invaziv infeksiyonlara neden olan kökenlerde ve *H. influenzae* tip b’de beta-laktamaz pozitifliği diğer kökenlere göre çok daha yüksektir (3).

a) TEM tip β -laktamaz

Plazmid aracılı TEM-1 ve TEM-2 β -laktamazlar özellikle *Enterobacteriaceae*’lar olmak üzere gram negatif bakteriler arasında yaygındır ve *bla*_{TEM} geni tarafından kodlanırlar. Enzimler aynı substrat profiline sahiptir. Bu iki beta-laktamaz arasında bir tek aminoasit farklılığı vardır; TEM-1’de 37. aminoasit glisin iken TEM-2’de glisin yerine lizin vardır. Bu iki beta-laktamaz arasındaki bir diğer farklılıkta promotör bölgeleriyle ilgilidir. Regülatör bölgedeki 32 nolu baz *bla*_{TEM-1}’de sitozin iken *bla*_{TEM-2}’de timindir. Bu farklılık *bla*_{TEM-2}’nin daha güçlü bir promotere sahip olmasına ve dolayısıyla daha fazla sentezlenmesine neden olur. *bla*_{TEM-2} transpozon 1(Tn1) ile aktarılırken, *bla*_{TEM-1} Tn2 ve Tn3 ile aktarılır (3).

Yapılan araştırmalarda *bla*_{TEM}’in *Haemophilus* türlerine *Enterobacteriaceae*’lardan plazmidler aracılığı ile geçtiği kabul ediliyor. *Haemophilus influenzae*’da TEM-1 tip beta-laktamaz bulunur. *bla*_{TEM-1}’de C32T mutasyonu sonucunda enzim miktarında artış olur ve ampisilin direnci gelişir (3,51).

Haemophilus influenzae’da TEM ilişkili iki farklı plazmid grubu vardır. Küçük (<10 kb) non-konjugatif plazmidler, *bla*_{TEM}’i kodlar ve yalnızca direnç belirleyicisidir. Halbuki büyük (40 kb) konjugatif plazmidler birçok antibiyotik (kloramfenikol, tetrasiklin gibi) direnç genine ek olarak beta-laktamazi da kodlar. Büyük plazmidler daha yaygındır ve *H. influenzae*’da *bla*_{TEM} genlerinin yayılmasında çok daha önemlidir (3,51).

b) ROB tip β -laktamaz

ROB-1 β -laktamaz ilk olarak 1981’de menenjitte neden olan *Hib* klinik kökeninde tanımlanmıştır. Bu enzim insanlarda *Pasteurella multocida* ve *Haemophilus ducreyi*; hayvanlarda *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella aerogenes* ve *Actinobacillus pleuropneumoniae* gibi birçok bakteride de tespit edilmiştir. ROB-1 β -laktamaz pozitifliği olan suşlarda sefaklor MİK’leri de yüksek tespit edilmiştir (3).

2) Penisilin Bağlayan Proteinlerdeki Değişikliklere Bağlı Direnç

Ampisiline dirençli suşlar ilk kez 1974 yılında bildirilmiştir. 1980’den sonra ampisilin dirençli β -laktamaz negatif (BLNAR) kökenler tanımlanmıştır. BLNAR

kökenlerinde direnç β -laktam antibiyotiklerin penisilin bağlayan proteinlere (PBP) afinitesinin azalmasıyla oluşur. *Haemophilus influenzae*'da direnç gelişiminde PBP'lerin hücre bölünmesi esnasında PBP3'ün aracılık ettiği septal peptidoglikan sentezinde değişiklik olması önem taşımaktadır. BLNAR kökenler sadece ampisilin değil, diğer β -laktam antibiyotiklere de özellikle sefalosporinlere azalmış hassasiyet gösterir (9).

Haemophilus influenzae kökenleri beta-laktamaz üretimi, ampisilin direnci ve amoksisilin klavulonik asit dirençlerine göre genotipik olarak 4 gruba ayrılır (52,53).

1. β -laktamaz negatif ampisilin hassas kökenler (BLNAS)
 - *ftsI* geninde aminoasit değişikliği olmayan ve *bla* geni negatif olan kökenler
2. β -laktamaz negatif ampisilin dirençli kökenler (BLNAR)
 - *ftsI* geninde aminoasit değişikliği olan ve *bla* geni negatif olan kökenler
3. β -laktamaz pozitif ampisilin dirençli kökenler (BLPAR)
 - *ftsI* geninde aminoasit değişikliği olmayan ve *bla* geni pozitif olan kökenler
4. β -laktamaz pozitif amoksisilin-klavulanat dirençli kökenler (BLPACR)
 - *ftsI* geninde aminoasit değişikliği olan ve *bla* geni pozitif olan kökenler olarak sınıflandırılır.

Beta-laktamaz negatif ampisiline dirençli kökenler PBP3'ü kodlayan *ftsI* genindeki aminoasit yer değişimine göre 3 grupta sınıflandırılır (52,53).

Grup I kökenler; lizin-treonin-glisin dizisinin yanında 517. pozisyonda arjininin yerine histidin (Arg-517-His) geçmesiyle oluşur.

Grup II kökenler, 526. pozisyonda asparajinin yerine lizin (Asn-526-Lys) geçmesiyle oluşur. Grup II kökenlerin 4 tane alt grubu vardır.

Grup IIa: 502. pozisyonda alanin değişikliği olmaksızın 526. pozisyonda asparajinin yerine lizin (Asn-526-Lys) geçmesiyle

Grup IIb: 502. pozisyonda valin yerine alanin (Val-502-Ala) geçmesiyle

Grup IIc: 502. pozisyonda treonin yerine alanin (Thr-502-Ala) geçmesiyle

Grup IId: 449. Pozisyonda valin yerine izölösün (Val-449-Ile) geçmesiyle oluşur.

Grup III kökenler, korunmuş serin-serin-asparajin dizisinin yanında 377. pozisyonda metionin yerine izölösün (Met-377-Ile), 385. pozisyonda serin yerine treonin (Ser-385-Thr), 389. pozisyonda lösün yerine fenilalanin (Leu-389-Phe) yerdeğişikliğine ilaveten ayrıca 526. pozisyonda asparajinin yerine lizin (Asn-526-Lys) geçmesiyle oluşur.

β -laktam antibiyotiklerin direncinin düzeyi büyük oranda *ftsI* genindeki 3 aminoasit mutasyonu ile ilişkilidir

1-517. pozisyonda arjininin yerine histidin (Arg-517-His) geçmesi

2-526. pozisyonda asparajinin yerine lizin (Asn-526-Lys) geçmesi

3-385. pozisyonda serin yerine treonin (Ser-385-Thr) geçmesi

Ampisiline orta düzey direnç sıklıkla Grup I ve Grup II kökenlerde görülürken yüksek düzey direnç Grup III kökenlerde görülür. Grup I ve Grup II zayıf BLNAR olarak isimlendirilirken Grup III genetik BLNAR olarak isimlendirilir (52,53).

Beta-laktamaz geni pozitif saptanan kökenler *ftsI* genindeki aminoasit değişikliğine göre üç grupta sınıflandırılır.

1. *ftsI* geninde aminoasit değişikliği olan grup I/II kökenler (grup I/II BLPACR)

2. *ftsI* geninde aminoasit değişikliği olan grup III kökenler (grup III BLPACR)

3. *ftsI* geninde aminoasit değişikliği olmayan kökenler (BLPAR) kökenler olarak sınıflandırılır (52,53).

Tablo VI. Doğal tip *Haemophilus influenzae* kökeni ile BLNAR kökenlerdeki PBP3'teki aminoasit değişikliğinin karşılaştırılması (3)

Aminoasit pozisyonu																									
	337	350	352	357	368	377	385	389	437	443	449	490	501	502	511	517	526	528	532	547	562	569	586		
Doğal tip	A	D	S	S	A	M	S	L	A	T	I	G	R	A	V	R	N	Y	T	V	V	N	A		
Ubukata																									
I		N		N		I	T		S							H							S		
II		N		N										V				K					S		
III		N		N		I	T	F										K				L	S		
Straker																									
V		N			N	T	I			A				L/H	T/V	A	H		K	H	S				
Kubota																									
		N	F		N		I	T	F							A			K			I	L	S	S
Dabernat																									
I	N		N												T		H								
IIa																			K						
IIb	N		N			L			S			E		V					K						
IIc	N		T												T					K					
IId											V									K					
Hasegawa																									
I																	H								
II						I	T	F									H								
III							T												K						
IV						I	T													K					
V							T	F													K				
VI						I	T	F													K				
Fluit																									
N					N	T	I		S				V	E	T/V		H		K						

Alanin: A, Arjinin: R, Asparajin: N, Aspartik asit: D, Sistein: C, Glutamik asit: E, Glutamin: Q, Glisin: G, Histidin: H, İzölösün: I, Lösin: L, Lizin: K, Metiyonin: M, Fenilalanin: F, Prolin: P, Serin: S, Treonin: T, Triptofan: W, Tirozin: Y, Valin: V

3) Makrolidler, Azalidler ve Ketolidler

Direnç mekanizmaları; aktif pompa sistemini, diğer intrinsik veya kazanılmış faktörleri, ribozomal proteinler ve RNA'da meydana gelen değişimleri kapsar. *Haemophilus influenzae* *E.coli*'dekine benzer bir *acrAB* pompa sistemine sahiptir. Makrolidler, linkozamidler ve streptogramin, kimyasal olarak birbirinden farklı fakat etki mekanizmaları benzer olan ve bu nedenle de MLS grubu olarak adlandırılan antibiyotiklerdir. Bu grup kazanılmış direnç en sık ribozomal hedefin değişmesinden kaynaklanmaktadır. MLS grubu

antibiyotikler 50S ribozomal alt üniteye bağlanarak peptid zincirinin uzamasına engel olurlar. *Haemophilus influenzae* kökenlerinde 23S rRNA veya ribozomal proteinlerden L4, L22'de değişiklik olması makrolid direnci gelişmesine neden olur. *Haemophilus influenzae* kökenlerinde *erm* (eritromisin ribozom metilasyon) genlerinin kazanılmasına bağlı direnç gelişimi görülmez (54-56).

4) Kloramfenikol

Kloramfenikol direncindeki temel mekanizma, ilacın etkinliğini yitirmesine yol açan Kloramfenikol Asetiltransferaz (KAT) enziminin üretimidir. KAT enzimi, kloramfenikol molekülünde bulunan iki hidroksil grubunu asetilleyerek etki gösterir. Bunun sonucunda yapısal olarak değişmiş antibiyotik 50S ribozomal alt üniteye bağlanamaz ve böylece etki gösteremez. Plazmid veya transpozonlar aracılığı ile aktarılır (57).

5) Tetrasiklinler

Bakteri protein sentezini engelleyerek etki ederler. Ribozomun 30S alt birimine bağlanarak; bakteri mRNA'sındaki kodona uygun aminosidi taşıyan aminoasit- tRNA'nın bağlanmasını önlerler. *Haemophilus influenzae*'da (ve *H. parainfluenzae*) tetrasiklin direnci *tet(B)* tarafından kodlanan bir aktif pompa sistemiyle ilişkilidir. Genellikle konjugatif plazmidler üzerinde bulunur (3).

6) Kinolonlar

Kinolon direnci genellikle DNA giraz enziminin A alt ünitesinde değişime yol açan *gyr A* mutasyonlarından kaynaklanmaktadır (57).

7) Folik Asit Metabolizma İnhibitörleri

Sülfonamid ve trimetoprim, bakterilerin tetrahidrofolik asit sentez yolundaki dihidropteroat sentaz (DHPS) ve dihidrofolat redüktaz (DHFR) enzimlerini inhibe ederek antibakteriyel etkinlik gösterirler. Bu antibiyotiklere doğal direnç, dış membran geçirgenliğinin düşük olması ile ilişkilidir. Trimetoprime kazanılmış direnç ise en sık plazmid kökenli dihidrofolat redüktaz enzimlerinin aşırı sentezi sonucunda gelişmektedir (3,57).

Korunma

Haemophilus influenzae tip b infeksiyonlarından korunmada doğal bağışıklık, kemoproflaksi ve aktif bağışıklama önemlidir. Amerika’da on yıllık *Hib* konjugat aşı uygulaması sonrası, beş yaş altı çocuklarda yıllık *Hib* menenjitisi sayısı 10.000 olgudan 200’ün altına düşmüştür. Aşının, *Hib* invaziv hastalığın önlenmesinin yanı sıra nazofarengeal kolonizasyonu azaltmada da etkili olduğu bulunmuştur (58).

Doğal bağışıklık:

Yenidoğanlar plasenta yolu ve anne sütü ile geçen IgG antikorları ile korunurlar. Altıncı aydan itibaren anneden geçen antikorları azalmaya başlar. *Haemophilus influenzae* tip b ile temastan (nazofarengeal kolonizasyon) ya da çapraz etki gösteren diğer antijenlerle temastan sonra antikapsüler antikorlar oluşmaya başlar (41).

Kemoproflaksi:

İnvaziv *Hib* infeksiyonlu hasta ile yakın temasta olanlara, gebeler hariç bütün erişkinler, 48 aydan daha küçük çocuklar ve immüno-compromize çocuklara rifampin proflaksisi önerilir. Proflaksi ile taşıyıcılık % 95 oranında eradike edilir ve yakın temasta olanlardaki sekonder olguların insidansı anlamlı bir şekilde azalır (41).

Aktif bağışıklama:

İnvaziv *Hib* infeksiyonlarına karşı immünite, pürifiye yüksek moleküler ağırlıklı *H. influenzae* tip b polisakkaritiyle oluşur. *Hib*’de kapsül, riboz ve ribitol moleküllerinin fosfat bağları ile bağlanmasının tekrarından oluşan poliribozil ribitol fosfat’tan (PRP) meydana gelir. *Hib* infeksiyonlarına karşı bakterisidal etkiden sorumlu olan ve bağışıklık sağlayan antikorlar kapsül polisakkaritine karşı oluşmaktadır. PRP’nin 18 aydan büyük çocuklarda koruyucu olduğu bildirilmiştir. Yardımcı T hücrelerinin immünolojik yanıt oluşmasında ve rapel aşılamalara daha çabuk yanıt vermesinde rolü vardır. Bu nedenle T hücrelerinden bağımsız immünojen olan polisakkaridleri küçük çocuklarda yeterli bir bağışıklık cevabı, antikor yapımı ve daha sonra yapılacak rapellere veya doğal yoldan alınan infeksiyonlara karşı immün bellek oluşmaz. Polisakkarid antijenler spesifik B hücrelerinin olgunlaşması, farklılaşması ve çoğalmasında rol oynayan yardımcı T hücrelerini 2 yaşın altında aktive edemezler. Ancak ciddi *Hib* infeksiyonlarının büyük kısmı 2 yaşın altındaki

çocuklarda görülmektedir. Bu nedenle asıl korunması gereken bu yaşın altındaki çocuklardır (59).

Birinci kuşak PRP aşısının 18 ayın altındaki çocuklarda etkisiz olması ikinci kuşak aşıların geliştirilmesine yol açmıştır. Poliribozil ribitol fosfatın taşıyıcı proteinlerle konjugasyonu ile konjuge PRP aşıları geliştirilmiştir. Proteinlerle kovalen olarak PRP'nin konjugasyonu aşya karşı T hücrelerine bağlı immünite oluşmasına yol açarak PRP antijenine karşı gelişen immünolojik cevabı arttırır (60). Taşıyıcı proteinler konjugatın T hücre ile etkileşime geçmesini sağlayan epitoplara içerir. Böylece etkin ve immün hafızaya kayıtlı yanıt oluşur. *Hib*'den korunma polisakkaride karşı oluşan opsonik ve bakterisidal etkinliği olan antikorlarla mümkündür (59). *Hib* infeksiyonlarına karşı korunmada serumdaki anti-PRP'nin koruyuculuk düzeyi 0,15-1 pg/ml olmalıdır. Tiplendirilemeyen *H. influenzae*'lar ile oluşan infeksiyonlardan korunabilmek için henüz bir aşı mevcut değildir (23).

Farklı firmalar konjuge *Hib* aşılarında farklı taşıyıcı proteinler kullanmaktadır. *Hib* aşısının uygulama şeması aşının başlandığı yaşa ve taşıyıcı proteine göre değişkendir (Tablo VII). PRP-D aşısında taşıyıcı protein olarak difteri toksoidi, HbOC'de mutant difteri proteini, PRP-T'de tetanoz toksoidi, PRP-OMP'de grup B meningokok dış membran proteini kullanılmaktadır (59).

Tablo VII. Taşıyıcı proteinlerine göre farklı *Hib* aşılarının farklı yaşlardaki uygulama şeması (59)

<i>Hib</i> aşısı	İlk dozdaki yaş (ay)	Primer dozlar	Rapel
HbOC/PRP-T	2-6	3 doz, 2 ay aralarla	12-15 ay
	7-11	2 doz, 2 ay aralarla	12-15 ay
	12-14	1 doz	2 ay sonra
	15-59	1 doz	-
PRP-OMP	2-6	2 doz, 2 ay aralarla	12-15 ay
	7-11	2 doz, 2 ay aralarla	12-15 ay
	12-14	1 doz	2 ay sonra
	15-59	1 doz	-
PRP-D	15-59	1 doz	-

BÖLÜM II

GEREÇ VE YÖNTEM

Bakteriyel kökenler

Aralık 2008-Mart 2011 tarihleri arasında Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole

edilen 56 *Haemophilus influenzae* kökeni çalışmaya alındı. Her hastadan izole edilen tek köken çalışmaya dahil edildi.

***Haemophilus influenzae* kökenlerinin tanımlanması**

Haemophilus influenzae kökenlerinin tanımlanmasında, kanlı besiyerinde üremeyip çukulatamsı besiyerinde üreyen kolonilere Gram boyama ve katalaz testi yapıldı. Gram boyamada gram negatif kokobasil görünümündeki koloniler X-V faktör gereksinimlerine göre tür düzeyinde tanımlandı. Şüpheli kolonilerden Müeller Hinton besiyerine pasaj yapılarak aralarında en az 20 mm kalacak şekilde hazır X, V, X+V faktörlerini içeren kağıt diskler yerleştirildi ve 34-36°C'de 18-24 saat inkübasyondan sonra üremeleri değerlendirildi. Yalnız X+V faktörü etrafında üreyen kökenler *Haemophilus influenzae* olarak tanımlandı. Şüpheli kökenlerin tür doğrulaması için yarı otomatik tanımlama sistemi olan BBL Crystal N/H ID tanımlama paneli (Becton Dickinson, Cockeysville, MD, USA) üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanıldı. X+V, X ve V faktörü kullanılarak ve BBL Crystal N/H ID tanımlama paneli ile *H. influenzae* kabul edilen kökenlerin tümünde polimeraz zincir reaksiyonu ile *H. influenzae*'ya özgül peptidoglikan ilişkili lipoprotein olan dış membran proteinini kodlayan *p6* geni araştırıldı. Kökenler daha sonra çalışılmak üzere % 10'luk gliserol içeren süt kaymağında -80°C'de saklandı.

BBL Crystal N/H ID tanımlama paneli çalışma ilkeleri: Kurutulmuş 29 adet biyokimyasal ve enzimatik substrat içermektedir (Tablo VIII). İnokulum sıvısının içindeki bakteriyel süspansiyon substratların yeniden hidrolizi için kullanılır. Sistemde kullanılan testler, çeşitli gösterge sistemleri tarafından tespit edilen belirli substratların indirgenmesini temel alır. 4 metilumbeliferon (4MU) veya 7-amino-4-metilkumarinin (7-AMC) kumarin türevlerini içeren florojenik substratların enzimatik hidrolizi, bir ultraviyole ışık kaynağı yardımıyla görsel olarak kolayca tespit edilebilen artmış floresan ile sonuçlanır. Hidroliz sonrasında kromojenik substratlar görsel olarak tespit edilebilen renk değişimleri oluşturur (Resim 1).

Testin çalışılması: Kristal sisteminin 2,3 ml'lik inokulum sıvısına 3 McFarland bulanıklık elde edilecek şekilde tanımlanacak koloniler konuldu. Substratların bulunduğu panele inokulum içeriğinin tamamı kuyucuklar hava almayacak şekilde boşaltıldı. Panelin kapağı kapatılıp 34-36°C'de 18-24 saat etüvde bekletildikten sonra floresansı gösteren

cihazda değerlendirildi. Tabloda negatif kontrole göre daha çok floresan veren substratın bulunduğu yerler pozitif olarak işaretlendi. Tablonun solunda bulunan rakamlara göre toplanıp üretici firmanın Crystal BDMSID isimli bilgisayar programında değerlendirildi.

İnokulum sıvısının içeriği: KCl 7,5 g, CaCl₂ 0,5 g, Trisin N-[2-Hidroksi-1, 1-bis (hidroksimetil)metil] glisin 0,895 g, 1000 ml'ye kadar saf su

Tablo VIII. BBL Crystal N/H ID tanımlama panelinde bulunan biyokimyasal ve enzimatik maddeler

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
4	Floresan negatif kontrolü (-)	L-serin-AMC (D)	L-fenilalanin-AMC (D)	L-glutamik asit-AMC (-)	Glisin-AMC (+)	Sakaroz (-)	Piranoz (D)	Riberol (-)	L-glutamil-p-nitroanilid (-)	Üre (+)
2	4MU-fosfat (+)	LYS-ALA-AMC (D)	N-sukkinil-ALA-PRO-ALA-AMC (-)	L-arjinin-AMC (+)	GLY-PRO-AMC (-)	Maltotrioz (-)	Maltobioz (-)	Levuloz (-)	o-nitrofenil-fosfat (+)	Resazurin (-)
1	L-prolin-AMC (-)	L-triptofan-AMC (D)	ALA-ALA-PHE-AMC (D)	Ornitin-AMC (-)	4MU-β-D-galaktosit (-)	Karubinoz (-)	Disakkarit (-)	p-nitrofenil-fosforilkolin (+)	p-nitrofenil-β-D-galaktosid (-)	Ornitin (+)
	2	0	0	2	0	0	0	0	2	3

D: Değişken, (+): pozitif, (-): negatif, 4MU: 4 metilumbeliferon, AMC: 7-amino-4-metilkumarinin

Not: Tabloda pozitif olarak gösterilen substratlar *H. influenzae* kökenleri ile reaksiyona giren substratları göstermektedir.



Resim 1. BBL Crystal N/H ID tanımlama paneli ve floresansı değerlendirme cihazı

Kökenlerin Serotiplendirmesi

Kökenlerin serotiplendirmesi için *H. influenzae* tip b antiserumu (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) kullanıldı. Lam üzerine birkaç koloni bakteri sürüldükten sonra üzerine tip b antiserumu damlatıldı ve aglütinasyon için karıştırıldı. Bir dakika içerisinde antijen-antikor reaksiyonunun oluşmasına izin verecek yeterli miktarda yoğunluğun oluşması sağlandı. Bir dakika içerisinde oluşan kuvvetli reaksiyonlar pozitif olarak kabul edildi. Ayrıca tüm kökenlere *H. influenzae* tip b primeri kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu ile *cpsb* lokusu araştırıldı.

Antimikrobiyal duyarlılık testi:

Kökenlerin antibiyotiklere direnci The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) kriterlerine göre belirlendi. Disk difüzyon yönteminde *Haemophilus* test medium (HTM) besiyeri kullanıldı.

Haemophilus test medium (HTM) besiyerinin hazırlanması:

Üretici firmanın önerilerine göre hazırlandı.

İçersinde 7,5 mg hematin ve 7,5 mg nikotinamid adenin dinükleotid içeren *Haemophilus* test medium supplement (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) şişesinin içersine 2 ml steril distile su ilave edildi.

Bu karışım 50°C’de 500 ml Müeller Hinton (Oxoid Ltd, Basingstoke, UK) besiyerine ilave edilip 4 mm kalınlığında besiyeri döküldü.

Disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi:

Bu yöntemle belirli bir miktar antibiyotik emdirilmiş kağıt diskler, test edilecek bakteriden hazırlanan 0,5 Mc Farland standart süspansiyonun yayıldığı HTM plakları üzerine yerleştirildi. 24 saatlik inkübasyondan sonra üremenin görülmediği zon çapı ölçülerek duyarlılığı saptandı. Çalışmada test edilen antibiyotikler (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) ampisilin, azitromisin, ko-trimaksazol, sefuroksim sodyum, sefaklor, meropenem, sefotaksim, amoksisilin klavulonik asit ve levofloksasindir.

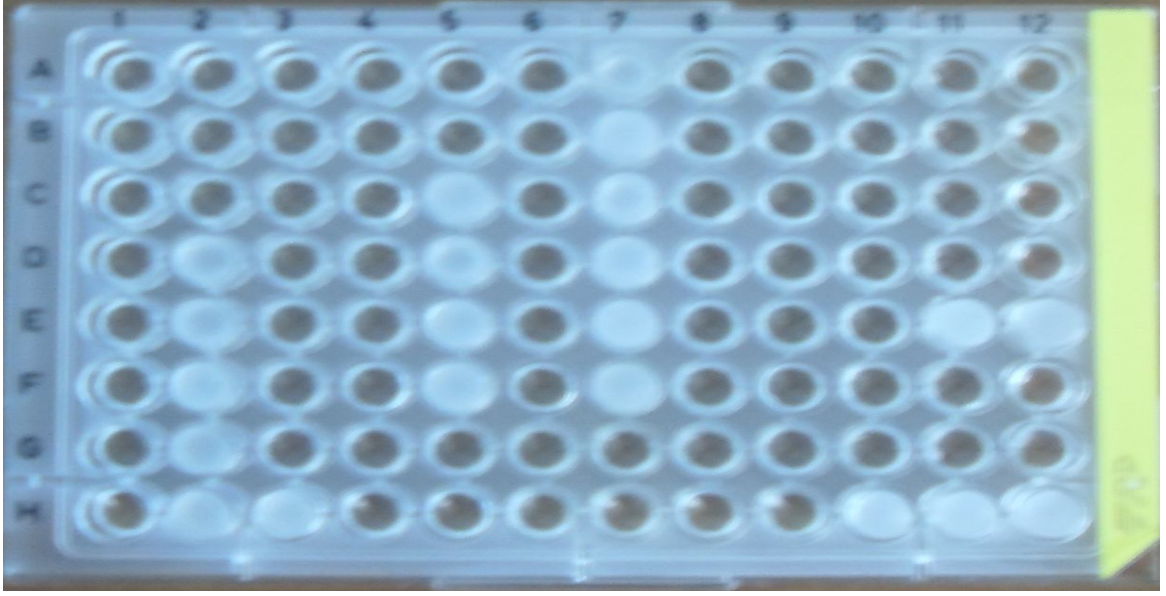
Beta-laktamaz varlığının araştırılması:

Beta-laktamaz varlığı nitrosefin (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) diski kullanılarak araştırıldı. Disk serum fizyolojik ile ıslatıldıktan sonra üzerine *Haemophilus influenzae* kolonilerinden sürüldü. Diskte pembe-kırmızı renk değişikliği görülünce pozitif kabul edildi.

Mikrodilüsyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi:

Kökenlerin Minimal inhibitör konsantrasyonları ticari sıvı mikrodilüsyon yöntemi olan Sensititre (Trek Diagnostic Systems, Cleveland, Ohio) kullanılarak CLSI kriterlerine göre belirlendi. Minimal inhibitör konsantrasyonları (MİK) belirlenen antibiyotikler levofloksasin, klaritromisin, sefaklor, seftriakson, ampisilin, sefepim, sparfloksasin, imipenem, ko-trimaksazol, meropenem, sefuroksim, sefiksim, tetrasiklin, ampisilin sulbaktam, kloramfenikol ve amoksisilin klavulonik asit'tir.

Sensititre üretici firmanın önerilerine göre yapıldı. Sıvı besiyerleri oda ısısına getirildi. Çukulatamsı besiyerinde 24 saatlik kültürde üreyen *H. influenzae* kolonilerinden eküvyon çubuğu ile alınıp Caution Adjusted Mueller Hinton Broth Test (CAMHBT) besiyerine konularak 0,5 McFarland elde edildi. Bu solüsyondan 50 µl alınıp HTM besiyerine ilave edildi ve 5×10^5 cfu/ml bakteri elde edildi. *Haemophilus* test medium besiyerinden; yüzeyi antibiyotik ile kaplanmış mikropalaklardaki her kuyucuğa 100'er µl kondu ve 34-36°C'de 18-24 saat inkübasyondan sonra üremeleri değerlendirildi. Bakterinin üremediği en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK olarak kabul edildi. Plakların değerlendirilmesine ilk önce pozitif ve negatif kuyucuktan başlandı (Resim2). Kontaminasyon görülen örnekler tekrar çalışıldı. Plakta bulunan antibiyotikler ve dilüsyon aralıkları Tablo IX'da gösterilmiştir.



Resim 2. Sıvı mikrodilüsyon antibiyogram plaklarının değerlendirilmesi

Tablo IX. Sensititre plağında bulunan antibiyotikler ve dilüsyon aralıkları

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	LVX	CLA	PEN	AXO	AMP	SPX	SXT	MERO	FUR	TET	CHL	AUG2
	4	16	1	2	4	1	2/38	2	8	4	4	16/8
B	LVX	CLA	PEN	AXO	AMP	SPX	SXT	MERO	FUR	TET	CHL	AUG2
	2	8	0.5	1	2	0.5	1/19	1	4	2	2	8/4
C	LVX	CLA	PEN	AXO	AMP	SPX	SXT	MERO	FUR	TET	CHL	AUG2
	1	4	0.25	0.5	1	0.25	0.5/9.5	0.5	2	1	1	4/2
D	LVX	CLA	PEN	AXO	AMP	SPX	SXT	MERO	FUR	TET	CHL	AUG2
	0.5	2	0.12	0.25	0.5	0.12	0.25/4.75	0.25	1	0.5	0.5	2/1
E	LVX	CLA	PEN	AXO	AMP	SPX	SXT	MERO	FUR	TET	ERY	ERY
	0.25	1	0.06	0.12	0.25	0.06	0.12/2.38	0.12	0.5	0.25	0.25	0.5
F	LVX	CLA	PEN	AXO	AMP	SPX	SXT	MERO	FIX	FIX	FIX	FIX
	0.12	0.5	0.03	0.06	0.12	0.03	0.06/1.19	0.06	0.12	0.25	0.5	1
G	LVX	CLA	PEN	AXO	FEP	FEP	FEP	FEP	FEP	A/S2	A/S2	NEG
	0.06	0.25	0.015	0.03	0.12	0.25	0.5	1	2	1/0.5	2/1	
H	LVX	CLA	FAC	FAC	FAC	IMI	IMI	IMI	IMI	POZ	POZ	POZ
	0.03	0.12	4	8	16	0.5	1	2	4			

NEG: Negatif, POZ: Pozitif, LVX: Levofloksasin, CLA: Klaritromisin, PEN: Penisilin, FAC: Sefaklor, AXO: Seftriakson, AMP: Ampisilin, FEP: Sefepim, SPX: Sparfloksasin, IMI: İmipenem, SXT: Ko-trimaksazol, MERO: Meropenem, FUR: Sefuroksim, FIX: Sefiksime, TET: Tetrasiklin, ERY: Eritromisin, A/S2: Ampisilin sulbaktam, CHL: Kloramfenikol, AUG2: Amoksisilin klavulonik asit

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile Direnç Genlerinin Tayini

DNA izolasyonu:

Bakteriyel DNA eldesi için ticari kit kullanıldı ve üretici firmanın önerilerine göre yapıldı (PureHelix Genomic DNA Prep Kit NanoHelix)

1- Çukulatamsı besiyerinde üreyen kolonilerden steril distile su ile 0,5 Mc farland bakteri solüsyonu hazırlandı.

2- Bu solüsyondan 0,5 ml alıp 1,5 ml'lik tüplere koyduktan sonra 12000 devir/dk'da 1 dakika çevrilip üst kısmı atıldı.

3- Üzerine 350 µl NGD 1 tampon eklendikten sonra 1 dakika çalkalandı.

4- Üzerine 8 µl proteinaz K kondu ve +70°C'de 10 dakika, +4°C'de 5 dakika bekletildi.

5- Oda ısısında 12000 devir/dk'da 1 dakika çevrilip süpernatantı yeni 1,5 ml'lik tüplere aktarıldı.

6- Üzerine 400 µl NGD 2 tampon kondu.

7- Bir dakika çalkalayıcıda çalkalayıp oda ısısında 12000 devir/dk'da 5 dakika çevrildikten sonra üst kısmı spin kolona aktarıldı.

8- Oda ısısında 12000 devir/dk'da 1 dakika çevrilip alttaki sıvı döküldü

9- Üzerine 500 µl yıkama tamponu (WB) ilave edildi.

10- Oda ısısında 12000 devir/dk'da 30 saniye çevrilip alttaki sıvı döküldü

11- Tekrar 12000 devir/dk'da 2 dakika çevrilip alttaki sıvı döküldü.

12- Sonra spin kolonları yeni 1,5 ml'lik tüplere kondu

13- Üzerine 50 µl elution buffer (EB) ilave edildi ve 12000 rpm'de 2 dakika çevrildi.

14- Spin kolonlar atıldıktan sonra tüpteki ekstrakte DNA çalışmamızda kullanıldı.

Polimeraz zincir reaksiyonu:

Polimeraz zincir reaksiyonu için ticari kit kullanıldı. Üretici firmanın önerilerine göre (HelixAmp Taq DNA Polymerase Kit NanoHelix) toplam hacim 50 µl olacak şekilde karışım hazırlandı.

Bakteriyel DNA	5 µl
10 mM dNTP	1 µl
taq DNA polimeraz	1,25 ünite
10X buffer	5 µl
5X tuneup	4 µl
Herbir primerden (100 µM)	1 µl
<u>Steril distile su</u>	<u>33,75 µl</u>
Toplam	50 µl

Isı döngü cihazı programı:

Hazırlanan karışım 30 siklus 94°C’de 10 dakika DNA zincirinin açılması, 94°C’de 10 saniye DNA zincirinin açılması, 55°C’de 30 saniye bağlanma, 72°C’de 30 saniye uzama fazı, 72°C’de 10 dakika son uzama fazında ısı döngü cihazına (Eppendorf, Mastercycler Gradient, Germany) konuldu.

Tampon solusyonunun (TBE) hazırlanması

Stok 10x TBE (Tris Borik Asit EDTA) buffer 50 gr Tris base, 27,5 gr Borik asit, 20 ml 0,5 M EDTA (pH:8,0)’nın 1 litre distile suda eritilmesiyle hazırlanmıştır. Hazırlanan 10x TBE stok solusyonunun distile su ile 1/20 oranında sulandırılması ile 0,5x TBE buffer kullanma solüsyonu hazırlanmıştır.

Agaroz jelin hazırlanması

Üç gram (% 2’lik agaroz jel için) agaroz (Basica Le, Prona, İspanya) tartılıp 150 ml 0,5 x TBE tampon solüsyonuna eklenerek karıştırılmıştır. Agaroz mikrodalga fırında (Regal, Türkiye) 400 watt ısıda, arada bir karıştırılarak bir dakika eritilmiştir. Agaroz jelin soğuması beklenmiş ve 50°C civarına kadar soğuyan 150 ml’lik agaroz solüsyonuna floresan boya içeren 15 µl Syber Safe (invitrogen, ABD) eklenmiştir. Agaroz jel plak üzerine

dökülmüş bir kenarına tarak yerleştirilmiştir. Agaroz jel donduktan sonra (yaklaşık 30 dakika oda ısısında) plağın iki tarafındaki lastikler ve tarak çıkarılmıştır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi

Herbir PZR'dan sonra her örnek için parafin film üzerine 5 µl yükleme solüsyonu (250 mg Bromophenol blue, üç ml gliserol, yedi ml distile su) 2x Loading dye (Fermentas, Kanada) konmuştur. 5 µl PZR ürünü yükleme solüsyonu ile karıştırıldıktan sonra sırayla agaroz jele yüklenmiştir. Bantların moleküler ağırlıklarını tespit etmek için 100 bç DNA ladder (Fermentas, Kanada) kullanılmıştır. Jel plağında PZR ürünleri 100 voltta 40 dakika elektroforez cihazında (Thermo, ABD) yürütülmüştür. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel görüntüleme sistemi (Vilber Lourmat, Almanya) ile görüntülenmiş ve görüntü bilgisayara aktarılmıştır. Oluşan bantlar Bio1D jel analiz programı kullanılarak değerlendirilmiştir.

Polimeraz zincir reaksiyonunda pozitif kontrol olarak 60 ve 70 no'lu kökenler, negatif kontrol olarak distile su kullanılmıştır. Beklenen yerde bant görülen örnekler pozitif kabul edilmiştir. Çalışmada P6 (61), PBP3-S, PBP3-GrupIII BLN, BLP (15), TEM-1, ROB-1 (62), PBP3 (53), Tipb (63) primerleri kullanılmıştır (Tablo X).

Çalışmamızda 60, 70 no'lu kökenlerin pozitif kontrol olarak kullanılması için dizi analizi (Beckman Coulter CEQ 8000 Genetic analysis system) yapıldı. 60 no'lu köken ampisiline duyarlı, 70 no'lu köken beta-laktamaz pozitif idi.

Tablo X. Çalışmada kullanılan primerler ve dizinleri

Primer ismi	Gen ismi	Primer Dizini	bp
P6	<i>p6</i>	Forward 5'-ACGATGCTGCAGGCAATGGT-3' Reverse 5'-CATCAGTATTACCTTCTACTAAT-3'	198
PBP3-S	<i>ftsI</i>	Forward 5'-GATACTACGTCCTTTAAATTAAG-3' Reverse 5'-GCAGTAAATGCCACATACTTA-3'	551
PBP3-Grup III BLN	<i>ftsI</i>	Forward 5'-TTCAAGTAACCGTGGTGTGAC-3' Reverse 5'-GCAGTAAATGCCACATATTTC-3'	465
BLP	<i>bla</i>	Forward 5'-TAAGAGAATTATGCAGTGCTGCC-3' Reverse 5'-TCCATAGTTGCCTGACTCCCC-3'	458
TEM-1	<i>bla</i> _{TEM-1}	Forward 5'-ACCAGTCACAGAAAAGCATC-3' Reverse 5'-TTATCCGCCTCCATCCAGTC-3'	327
ROB-1	<i>bla</i> _{ROB-1}	Forward 5'-TCCCGAAACCCAAAAATACG-3' Reverse 5'-GATTGCCTGTTGCGTTATTG-3'	338
PBP3	<i>ftsI</i>	Forward 5'-GTTGCACATATCTCCGATGAG -3' Reverse 5'- CAGCTGCTTCAGCATCTTGC-3'	945
Tipb	<i>cpsb</i>	Forward 5'-GCGAAAGTGAAGTCTTATCTCTC -3' Reverse 5'-GCTTACGCTTCTATCTGGTGAA -3'	480

P6 Primeri; *Haemophilus influenzae*'ya spesifik peptidoglikan ilişkili lipoprotein olan dış membran proteinini kodlayan *P6* geni çoğaltıldı. Bu bölge *H. influenzae*'larda iyi korunmuş bölgedir (61).

PBP3 Primeri; PBP'ler arasında esas direnç gelişimi PBP3'ün aracılığıyla septal peptidoglikan sentezindeki değişikliklerle olur. Bu proteini kodlayan *fts-I* geninin tümü çoğaltıldı. Sekans için kullanıldı (52).

PBP3-S primeri; Arg-517 veya Asn-526 değişken mutasyon bölgesini içeren *fts-I* gen parçası çoğaltıldı (53).

PBP3-Grup III BLN primeri; Ser-385 yüksek mutasyon bölgesini içeren *fts-I* gen parçası çoğaltıldı (15).

Tipb Primeri; Kapsüler polisakkaritte kodlanan *cpsb* lokusu çoğaltıldı (63).

BLP primeri; β -laktamazı kodlayan *bla* gen parçası çoğaltıldı (15).

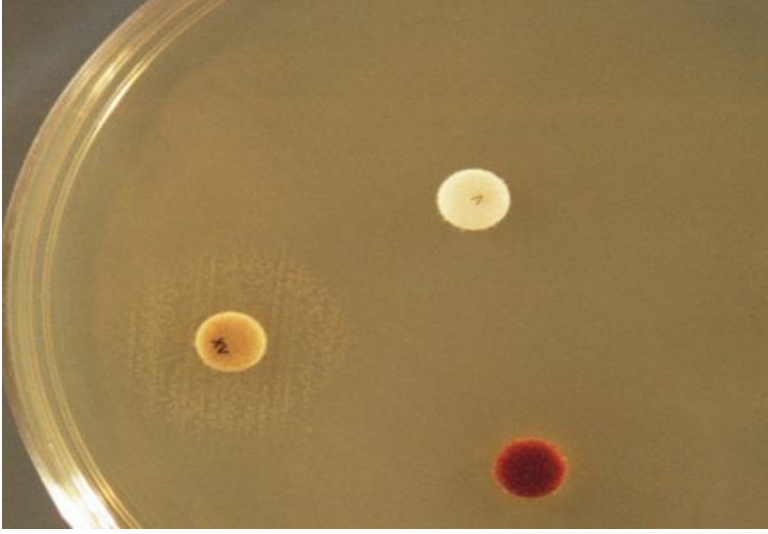
TEM-1 primeri; TEM-1 β -laktamazı kodlayan *bla* gen parçası çoğaltıldı (62).

ROB-1 primeri; ROB-1 β -laktamazı kodlayan *bla* gen parçası çoğaltıldı (62).

BÖLÜM III

BULGULAR

Çalışmada laboratuvarımıza gelen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 56 *Haemophilus influenzae* kökeni test edilmiştir. Tüm kökenler XV, X ve V diskleri ile *Haemophilus influenzae* olarak tanımlanmıştır (Resim 3).



Resim 3. XV diskinin etrafında üreyen *Haemophilus influenzae* kolonileri

Çalışılan 56 kökenin 38'i (% 67,8) erkek hastadan, 18 (% 32,2) tanesi kadın hastadan izole edilmiştir. Kökenlerin 44'ü (%78,6) yatan hastadan 12'si (% 21,4) poliklinik hastalarından izole edilmiştir. Kullanılan kökenlerin klinik örneklerle göre dağılımı tablo XI'de, gönderildiği kliniklere göre dağılımı tablo XII'de gösterilmiştir.

Tablo XI. *Haemophilus influenzae* kökenlerinin izole edildiği klinik örneklerle göre dağılımı

Örnek türü	Sayısı (%)
Balgam	46 (% 82)
Göz sürüntüsü	3 (% 5,4)
Trakeal aspirat	3 (% 5,4)
Bronkoalveolar lavaj	2 (% 3,6)
Kan kültürü	1 (% 1,8)
Sinüs aspiratı	1 (% 1,8)

Tablo XII. *Haemophilus influenzae* kökenlerinin gönderildiği kliniklere göre dağılımı

Klinik	Sayı (%)
Göğüs hastalıkları	20 (% 35,7)
Dahiliye	19 (% 33,9)
Çocuk hastalıkları	10 (% 17,8)
Kulak-burun-boğaz hastalıkları	2 (% 3,6)
Göz hastalıkları	1 (% 1,8)
Nöroloji	1(% 1,8)
Kalp-damar cerrahisi	1(% 1,8)
Acil	1 (% 1,8)
Kardiyoloji	1 (% 1,8)

Çalışılan tüm kökenlerin disk difüzyon yöntemine göre ve sıvı mikrodilüsyon yöntemine göre antibiyotik duyarlılıkları, MİK aralıkları, MİK50 ve MİK90 değerleri tablo XIII'te gösterilmiştir. Tüm kökenlere uygulanan PZR yöntemi ile *p6* geni araştırılmıştır. Test edilen kökenlerin hepsinde *p6* geni pozitif bulunmuştur (Resim 4). Tüm kökenlerde tip b primeri kullanılarak *cpsb* lokusu araştırılmış. çalışılan kökenlerin hiçbirinde *H. influenzae* tip b tespit edilmemiştir.

Tüm kökenlerde PBP3-S primeri kullanılarak Arg-517 veya Asn-526 değişken mutasyon bölgesini içeren *fts-I* S geni araştırılmıştır. 45 kökende *fts-I* S geni pozitif tespit edilmiştir (Resim 5). 11 kökende *fts-I* S geni saptanmamıştır. Çalışılan *H. influenzae* kökenlerinde duyarlı *fts-I* geni tespit edilen ve tespit edilmeyen kökenlerin MİK aralıkları, MİK50 ve MİK90 değerleri karşılaştırmalı olarak tablo XIV'te gösterilmiştir.

Tablo XIII. *Haemophilus influenzae* kökenlerinde çalışılan antibiyotiklerin MİK aralıkları, MİK50, MİK90 değerleri ve duyarlılıkları

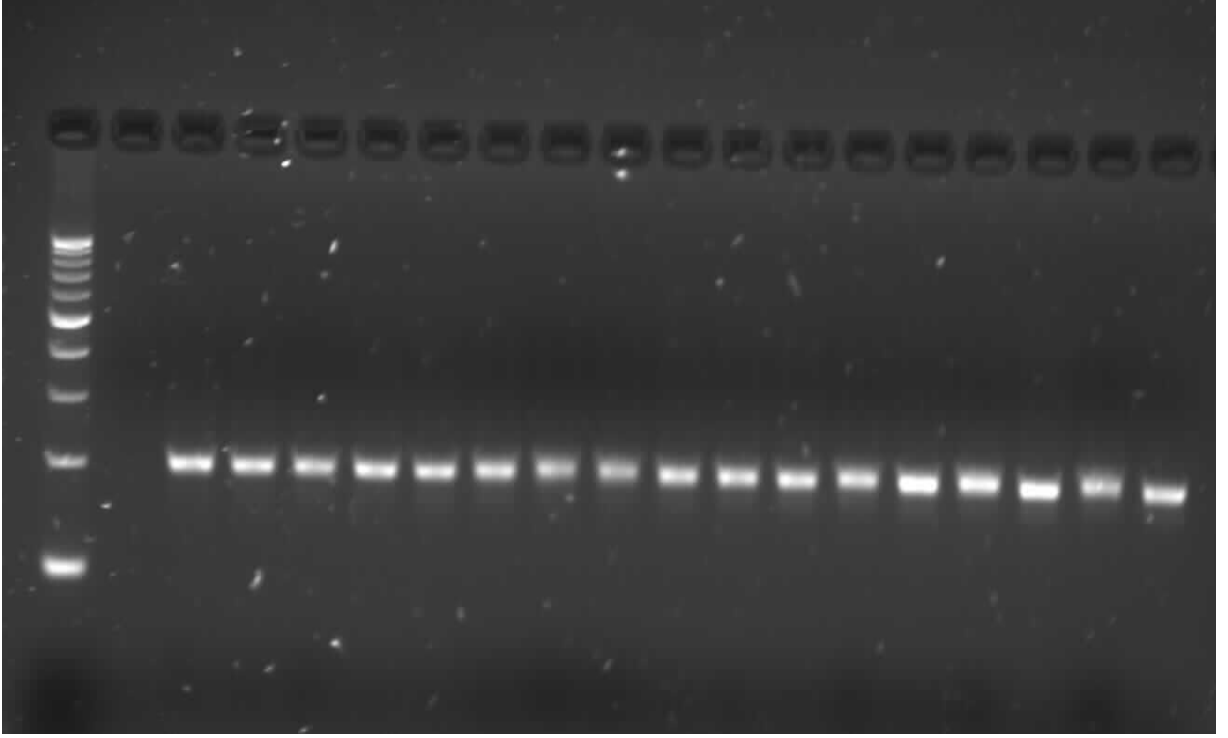
Antibi yotik	MİK aralığı	MİK50	MİK90	Duyarlı		Orta duyarlı		Dirençli	
				Disk Difüzyon KS (%)	Sıvı mikrodilüsyon KS (%)	Disk Difüzyon KS (%)	Sıvı mikrodilüsyon KS (%)	Disk Difüzyon KS (%)	Sıvı mikrodilüsyon KS (%)
AMP	≤0,12-≥8	0,5	1	55 (% 98,2)	52 (% 92,8)	-	3 (% 5,4)	1 (%1,8)	1 (%1,8)
AUG2	≤2/1-4/2	≤2/1	≤2/1	56 (% 100)	56 (% 100)	-	-	-	-
A/S2	≤1/0,5-2/1	≤1/0,5	≤1/0,5	TE	56 (% 100)	TE	-	TE	-
FAC	≤4-16	≤4	8	56 (% 100)	53 (% 94,6)	-	3 (% 5,4)	-	-
FEP	≤0,12-2	≤0,12	0,25	TE	56 (% 100)	TE	-	TE	-
FIX	≤0,12-1	≤0,12	≤0,12	TE	56 (% 100)	TE	-	TE	-
CTX	TE	TE	TE	56 (% 100)	TE	-	TE	-	TE
AXO	≤0,03-0,25	≤0,03	≤0,03	TE	56 (% 100)	TE	-	TE	-
FUR	≤0,5-4	1	2	56 (% 100)	56 (% 100)	-	-	-	-
AZM	TE	TE	TE	56 (% 100)	TE	-	TE	-	TE
IMI	≤0,5-2	≤0,5	1	TE	56 (% 100)	TE	-	TE	-
CLA	2-≥32	8	16	TE	40 (% 71,4)	TE	13 (% 23,2)	TE	3 (% 5,4)
CHL	≤0,5-1	≤0,5	1	TE	56 (% 100)	TE	-	TE	-
SXT	≤0,06/1,19- ≥4/76	1/19	≥4/76	28 (% 50)	28 (% 50)	8 (% 14,3)	8 (% 14,3)	20 (% 35,7)	20 (% 35,7)
LVX	≤0,03-0,5	≤0,03	≤0,03	56 (% 100)	56 (% 100)	-	-	-	-
MERO	≤0,06-0,5	≤0,06	0,25	56 (% 100)	56 (% 100)	-	-	-	-
SPX	≤0,03-0,5	≤0,03	≤0,03	TE	56 (% 100)	TE	-	TE	-
TET	≤0,25-2	0,5	1	TE	56 (% 100)	TE	-	TE	-

AMP: Ampisilin, AUG2: Amoksisilin klavulonik asit; A/S2: Ampisilin sulbaktam, FAC: Sefaklor, FEP: Sefepim, FIX: Sefiksim, CTX: Sefotaksim, AXO: Seftriakson, FUR: Sefuroksim sodyum, AZM: Azitromisin, IMI: İmipenem, CLA: Klaritromisin, CHL: Kloramfenikol, SXT: Ko-trimaksazol, LVX: Levofloksasin, MERO: Meropenem, SPX: Sparfloksasin, TET: Tetrasiklin, KS: Köken sayısı, TE: Test edilmedi

Tablo XIV. *Haemophilus influenzae* kökenlerinde duyarlı *fts-I* geni tespit edilen ve tespit edilmeyen kökenlerin MİK aralıkları, MİK50 ve MİK90 değerleri

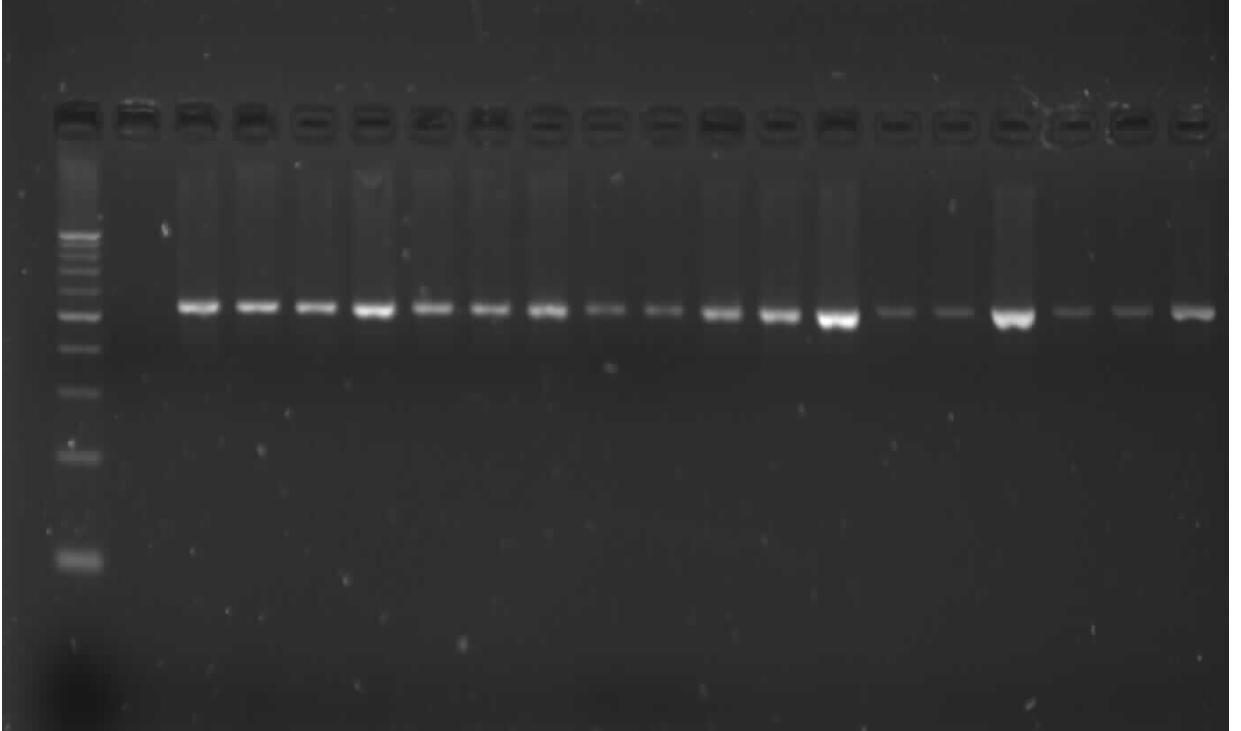
Antibiyotik	MİK aralığı		MİK50		MİK90	
	<i>fts-I</i> S geni (+)	<i>fts-I</i> S geni (-)	<i>fts-I</i> S geni (+)	<i>fts-I</i> S geni (-)	<i>fts-I</i> S geni (+)	<i>fts-I</i> S geni (-)
AMP	≤0,12-1	≤0,12-≥8	0,25	1	1	2
AUG2	≤2/1-4/2	≤2/1-4/2	≤2/1	≤2/1	≤2/1	4/2
A/S2	≤1/0,5-2/1	≤1/0,5-2/1	≤1/0,5	≤1/0,5	≤1/0,5	2/1
FAC	≤4-16	≤4-16	≤4	8	8	16
FEP	≤0,12-2	≤0,12-0,5	≤0,12	≤0,12	0,25	0,25
FIX	≤0,12-1	≤0,12-1	≤0,12	≤0,12	≤0,12	1
AXO	≤0,03-0,25	≤0,03-0,06	≤0,03	≤0,03	≤0,03	≤0,03
FUR	≤0,5-4	1-4	1	2	2	4
IMI	≤0,5-2	≤0,5-2	≤0,5	1	1	1
CLA	2-≥32	8-16	8	16	16	16
CHL	≤0,5-1	≤0,5-1	≤0,5	≤0,5	1	1
SXT	≤0,06/1,19- ≥4/76	≤0,06/1,19- ≥4/76	0,5/9,5	≥4/76	≥4/76	≥4/76
LVX	≤0,03-0,5	≤0,03-0,5	≤0,03	≤0,03	≤0,03	≤0,03
MERO	≤0,06-0,5	≤0,06-0,25	≤0,06	0,12	0,12	0,25
SPX	≤0,03-0,5	≤0,03-0,5	≤0,03	≤0,03	≤0,03	≤0,03
TET	≤0,25-2	≤0,25-2	0,5	0,5	1	1

AMP: Ampisilin, AUG2: Amoksisilin klavulonik asit; A/S2: Ampisilin sulbaktam, FAC: Sefaklor, FEP: Sefepim, FIX: Sefiksim, AXO: Seftriakson, FUR: Sefuroksim sodyum, IMI: İmipenem, CLA: Klaritromisin, CHL: Kloramfenikol, SXT: Ko-trimaksazol, LVX: Levofloksasin, MERO: Meropenem, SPX: Sparfloksasin, TET: Tetrasiklin



Resim 4: 98-113 no'lu kökenlerin *p6* geninin elektroforetik görüntüsü

Not: *p6* geni 198 bp



Resim 5: 97-113 no'lu kökenlerin *fts-I S* geninin elektroforetik görüntüsü

Not: *fts-I S* geni 551 bp

fts-I S geni tespit edilmeyen 11 kökende ve diğer kökenlerde PBP3-BLN primeri kullanılarak Ser-385 yüksek mutasyon bölgesini içeren *fts-I* geni araştırılmış ve hiçbir kökende bu mutasyon tespit edilmemiştir. 385. pozisyonda serin yerine treonin (Ser-385-Thr) geçmesi sıklıkla yüksek düzey direnç Grup III kökenlerde görülür ve Grup III genetik BLNAR olarak isimlendirilir.

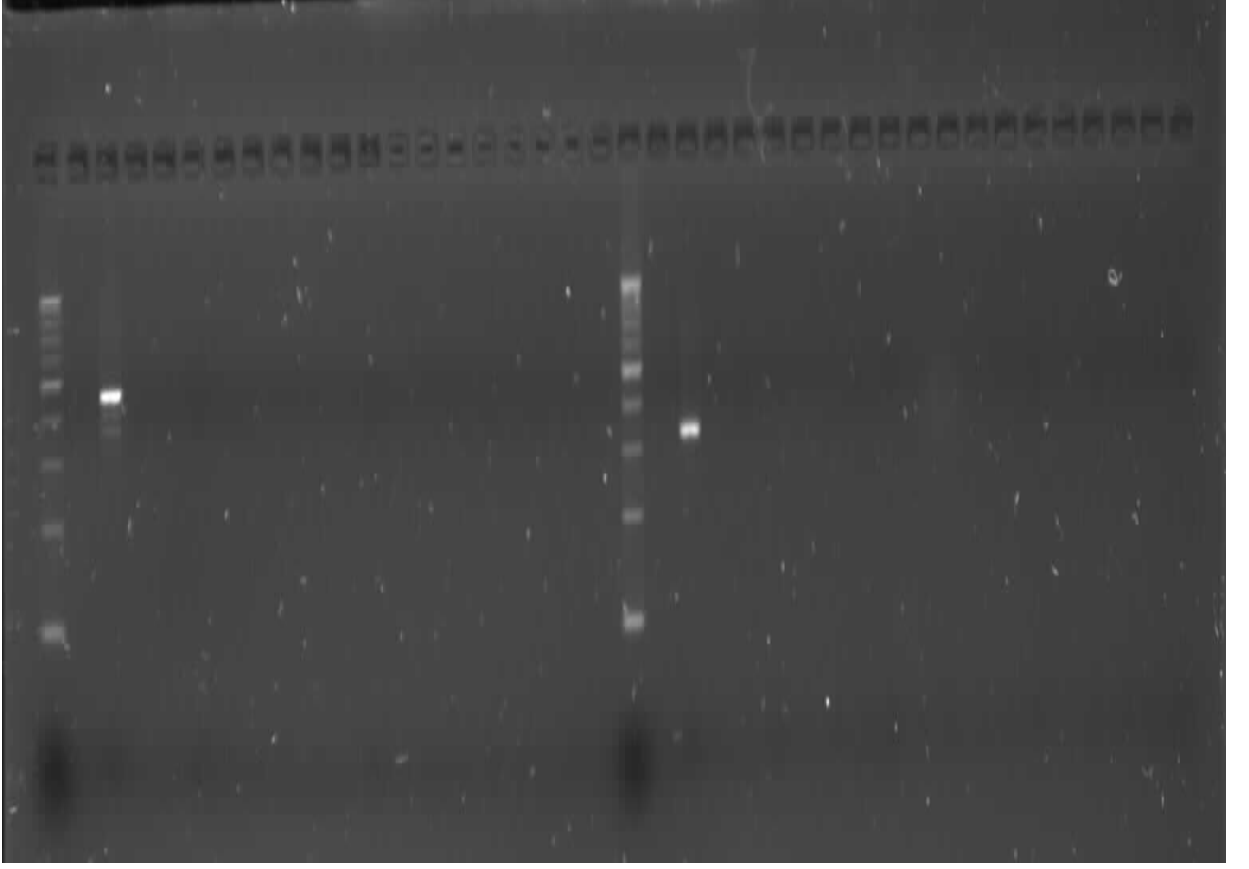
fts-I S geni tespit edilmeyen 11 kökenin zayıf BLNAR olduğu kabul edilmiştir. 517. pozisyonda arjininin yerine histidin (Arg-517-His) geçmesi ile oluşan mutasyon sıklıkla Grup I, 526. pozisyonda asparajinin yerine lizin (Asn-526-Lys) geçmesi ile oluşan mutasyon sıklıkla Grup II kökenlerde görülür. Ampisiline orta düzey direnç Grup I ve Grup II kökenlerde görülür. Grup I ve Grup II BLNAR kökenler zayıf BLNAR olarak isimlendirilir.

Tüm kökenlerin beta-laktamaz enzimi üretilip üretilmediği nitrosefin diski ile test edilmiştir. Sadece bir köken pozitif saptanmıştır. Tüm kökenlerde BLP primeri kullanılarak *bla* geni araştırılmıştır. Nitrosefin testi ile beta-laktamaz pozitif saptanan kökende *bla* geni tespit edilmiştir (Resim 6). TEM-1 ve ROB-1 primeri kullanılarak TEM-1 ve ROB-1 β -laktamazı kodlayan *bla* geni araştırılmıştır. Beta-laktamaz primeri ile pozitif saptanan kökende *bla*_{TEM-1} geni pozitif saptanmıştır (Resim 6). Beta-laktamaz pozitif kökenin MİK değerleri tablo XV’te gösterilmiştir. Bu köken ampisiline dirençli, klaritromisine orta duyarlı, çalışılan diğer antibiyotiklere duyarlı tespit edilmiştir. Kökenlerin hiçbirinde *bla*_{ROB-1} geni saptanmamıştır.

Tablo XV: Beta-laktamaz pozitif kökenin MİK değerleri

Antibiyotikler															
AMP	AUG2	A/S2	FAC	FEP	FIX	AXO	FUR	IMI	CLA	CHL	SXT	LVX	MERO	SPX	TET
≥8	4/2	2/1	8	0.25	≤0.12	≤0.03	4	2	16	≤0.5	≤0.06/1.19	≤0.03	0.25	≤0.03	2

AMP: Ampisilin, AUG2: Amoksisilin klavulonik asit; A/S2: Ampisilin sulbaktam, FAC: Sefaklor, FEP: Sefepim, FIX: Sefiksim, AXO: Seftriakson, FUR: Sefuroksim sodyum, IMI: İmipenem, CLA: Klaritromisin, CHL: Kloramfenikol, SXT: Ko-trimaksazol, LVX: Levofloksasin, MERO: Meropenem, SPX: Sparfloksasin, TET: Tetrasiklin



Resim 6: 70 no'lu kökenin *bla* geni pozitifliği (1. Bölüm) ve *bla*_{TEM-1} geni pozitifliği (2. Bölüm)

Not: *bla* geni 458 bp, *bla*_{TEM-1} geni 327 bp

BÖLÜM IV

TARTIŞMA

Alt solunum yolu infeksiyonuna neden olan bakteriyel infeksiyonların başarılı ve düşük maliyetli bir şekilde tedavisinin gerçekleştirilebilmesi tıbbi ve sosyoekonomik yönden önem taşımaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda bu tür infeksiyon etkenlerinin başta penisilinler olmak üzere diğer beta-laktam antibiyotiklere, makrolidlere ve ko-trimaksazole giderek artan oranda direnç kazandıkları görülmektedir.

Haemophilus influenzae'nin neden olduğu invaziv infeksiyonların % 95'i *Hib* ile oluşmaktadır. *Haemophilus influenzae* tip b, birçok Asya ülkesinde ve gelişmekte olan ülkelerde aşılammış çocuklar arasında, menenjitin önde gelen nedenidir (23). *Haemophilus influenzae* tip b, Japonya ve Güney Kore'de yapılan çalışmalarda % 0,75-4,1 (14,15,64) Amerika'da yapılan çalışmalarda % 0-13,6 (65,66) Avrupa'da yapılan çalışmalarda % 1,2-28,1 (67,68) arasında değişmektedir. Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise bu oran % 11,11 ile %64 arasında bulunmuştur (69-72). Çalışmamızda *H. influenzae* serotip b antiserumu kullanılarak lam aglütinasyon yöntemi ile test edilen kökenlerin hiçbirinde *H. influenzae* tip b tespit edilmemiştir. Ayrıca bu çalışmada tüm kökenlerde PZR yöntemi ile Tip b primeri kullanılarak *cpsb* lokusu araştırılmıştır. Kökenlerin hiçbirinde *H. influenzae* tip b tespit edilmemiştir. Bizim çalışmamız ülkemizdeki çalışmalara göre dünyadaki diğer çalışmalarla daha uyumlu görülmektedir. Ülkemizde *Hib* rutin aşılama kampanyası 2006 yılında başlamıştır (73). Avrupa, Amerika ve gelişmiş ülkelerde *Hib* aşısının rutin olarak kullanılması *H. influenzae* tip b'nin düşük olarak saptanmasını açıklayabilir (23). Ülkemizdeki çalışmalarda *H. influenzae* tip b'nin yüksek çıkması, *Hib* aşısının rutin olarak kullanıma girmesinden önce yapılmış olmasından kaynaklanabilir.

Haemophilus influenzae kökenlerinde disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemleriyle çalıştığımız ortak antibiyotiklerin duyarlılıklarını karşılaştırdığımızda sefaklor ve ampisilin hariç diğer antibiyotiklerin duyarlılıkları benzer olarak elde edilmiştir. Disk difüzyon yönteminde kökenlerin ampisilin duyarlılığı % 98,2, direnç % 1,8 iken mikrodilüsyon yönteminde duyarlılığı % 92,8, direnç % 1,8 tespit edilmiştir. Ampisiline dirençli kökenlerin yüzdesi aynı iken disk difüzyon yönteminde duyarlı tespit ettiğimiz 3 (% 5,4) köken orta duyarlı olarak belirlenmiştir. Disk difüzyon yönteminde kökenlerin sefaklor duyarlılığı % 100 iken mikrodilüsyon yönteminde duyarlılık % 94,6 saptanmış ve kökenlerin

% 5,4'ü (3 köken) de orta duyarlı olarak belirlenmiştir. Sefaklor MİK'ini orta duyarlılıkta tespit ettiğimiz 3 kökenden ikisinin ampisilin MİK'i 2 µ/ml (orta duyarlı) diğerinin MİK'i 1 µ/ml (duyarlı) olarak tespit edilmiştir. Avrupa'da disk difüzyon ve agar dilüsyon yöntemiyle antibiyotik duyarlılıklarının karşılaştırıldığı bir çalışmada, kökenlerin ampisiline karşı disk difüzyonda duyarlılığı % 82,6 iken agar dilüsyonda % 85, sefuroksime karşı disk difüzyonda duyarlılığı % 97,4 iken agar dilüsyonda % 85,5, tetrasikline karşı disk difüzyonda duyarlılığı % 98,8 iken agar dilüsyonda % 98,3, ko-trimaksazole karşı disk difüzyonda duyarlılığı % 84,8 iken agar dilüsyonda % 85,9 oranları elde edilmiştir. Siprofloksasin, levofloksasin, moksifloksasin duyarlılıkları her iki yöntemde de %100 uyumlu (duyarlı) olarak tespit edilmiştir (74). Çalışmada aradaki farkın anlamlı olmadığı kabul edilmiştir. Bizim çalışmamızda da ampisilin ve sefaklor hariç diğer ortak çalıştığımız antibiyotikler arasında %100 uyum mevcuttur. Avrupa'da yapılan çalışmada agar dilüsyon ve disk difüzyon yöntemleri karşılaştırılmıştır. Aynı yöntemler olmamakla birlikte bu durum göz önüne alındığında bizim çalıştığımız disk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleriyle elde edilen sonuçların birbiriyle uyumlu olduğu görülmüştür. Ampisilin MİK'ini duyarlı aralıkta fakat yüksek (MİK:1) ve orta duyarlı aralıkta (MİK:2) belirlediğimiz kökenler disk difüzyon yönteminde duyarlı tespit edilmiştir. Zayıf BLNAR olarak belirlenen kökenler bu aralıkta olduğundan, çalışmamızda disk difüzyon yöntemi ile zayıf BLNAR kökenler duyarlı tespit edilmiştir. Eğer ampisiline direnç tespit edilmediyse disk difüzyon yöntemi ile zayıf BLNAR kökenlerin belirlenemeyeceği düşünülmüştür. Bu çalışma ile diğer çalışmaların karşılaştırmaları, sıvı mikrodilüsyon yöntemi dikkate alınarak yapılmıştır.

Haemophilus influenzae infeksiyonlarında genellikle ampisilin kullanılmaktadır. Dünya'nın birçok ülkesinde ampisiline dirençli *H. influenzae* kökenlerinde artış görülmektedir. Beta-laktamaz pozitif kökenlerin tümü, beta-laktamaz negatif (BLNAR) kökenlerin ise bir kısmı ampisiline dirençlidir ve dirençli köken sayısı her geçen gün artmaktadır. Beta-laktamaz pozitif ve BLNAR kökenlerin diğer antibiyotiklere karşı da MİK değerlerinin yükseldiği görülmüştür (6,10-13,16-19).

Haemophilus influenzae'larda ampisilin direnci daha çok beta-laktamaz üretiminden kaynaklanmaktadır. Japonya ve Güney Kore'de yapılan çalışmalarda β-laktamaz üreten kökenlerin sıklığı; % 1,9 ile % 52,40 arasında bulunmuştur (15,62,71,75-77). Amerika'da ise β-laktamaz üreten kökenlerin sıklığı; % 15,2-36,4 arasında değişmektedir (4-6). Avrupa'da bu oran % 0-38,2 arasındadır (20,21,62). Ülkemizde yapılan çalışmalarda β-

laktamaz pozitifliği % 0-37,5 arasında değişmektedir (7,8,70-72). Çalışmamızda ise beta-laktamaz pozitifliği % 1,8 olarak belirlenmiştir. Ülkemizdeki ve dünyadaki çalışmalar incelendiğinde bizim çalışmamızdaki kökenlerin beta-laktamaz üretiminin daha az olduğu görülmektedir. Beta-laktamaz oluşturmaya bağlı direnç genellikle TEM-1 ve çok az kökende ROB-1 beta-laktamazları ile oluşmaktadır. Beta-laktamaz tiplerinin oranı incelendiğinde Avrupa'da, Amerika'da ve Asya'da yapılan çalışmalarda TEM-1 tip beta-laktamaz üretimi % 93-100, ROB-1 tip beta-laktamaz üretimi % 0-7 arasında değişmektedir (15,19,62,75,78). Bizim çalışmamızdaki beta-laktamaz üretimi TEM-1 tiptir. TEM-1 tip beta-laktamaz üretimi daha sık görüldüğünden çalışmamızın Avrupa, Amerika ve Asya ülkelerindeki çalışmalarla uyumlu olduğu görülmüştür.

Avrupa'da yapılan çalışmalarda ampisilin direnci % 10,2 ile % 40,4 arasında bulunmuştur (67,78-80). Amerika'da ise ampisilin direnci % 16,9-40 arasında değişmektedir (6,81,82). Japonya ve Güney Kore'de ampisilin direnci daha da artmakta ve % 37,3 ile % 60,2 arasında değişmektedir (14,64,75). Ülkemizde yapılan çalışmalarda ampisilin direnci % 0-62,5 arasında bulunmuştur (7,8,70-72,83,84). Çalışmamızda ise bir köken ampisiline dirençli (% 1,8) belirlenmiştir. Bu köken beta-laktamaz pozitif olarak saptanan kökendir.

Güney Kore'de yapılan çalışmalarda sefaklor duyarlılığı % 42,1 ile % 90,7 arasında değişmektedir (64,75). Avrupa'da % 87,2-99 arasındadır (20,21,67,79,80). Amerika'da % 79,6 ile % 95,4 arasında değişmektedir (6,81,82,85). Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise % 76,9-100 arasındadır (22,70,71,86). Çalışmamızdaki kökenlerin % 94,6'sı duyarlı, % 5,4'ü orta duyarlı tespit edilmiştir. Kökenlerin hiçbirinde sefaklor direnci saptanmamıştır.

Avrupa'da yapılan çalışmalarda klaritromisin duyarlılığı % 75,6 ile % 97,8 arasında (20,21,67,80,87), Amerika'da % 61,4-89 arasında (6,81,82), Japonya ve Güney Kore'de yapılan çalışmalarda ise % 60,8-81,3 olarak belirlenmiştir (15,64,75). Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise % 50 ile % 97,3 arasında değişmektedir (7,70). Çalışmamızdaki kökenler klaritromisine %71.4 duyarlı, %23.2 orta duyarlı, %5.4 dirençli tespit edilmiştir.

Avrupa'da yapılan çalışmalarda ko-trimaksazol duyarlılığı % 81,3-85,9 olarak belirlenmiştir (74,80). Güney Kore'de % 31,6 ile % 63 arasındadır (64). Amerika'da ise bu oran % 60,8 ile % 77,3 arasında değişmektedir (6,82,85). Ülkemizde yapılan çalışmalarda % 64-82 arasında (70,71,83,86) tespit edilmiştir. Çalışmamızdaki kökenler ko-trimaksazole % 50 duyarlı, % 14,3 orta duyarlı, % 35,7 dirençli tespit edilmiştir.

Çalışmamızdaki kökenlerin hepsi amoksisilin klavulonik asit, ampisilin sulbaktam, sefepim, sefiksim, seftriakson, sefuroksim, imipenem, kloramfenikol levofloksasin, meropenem, sparfloksasin ve tetrasiklin antibiyotiklerine karşı duyarlı olarak belirlenmiştir. Amerika’da yapılan çalışmalarda amoksisilin klavulonik asit duyarlılığı % 58-100, sefepim duyarlılığı % 100, sefiksim duyarlılığı % 100, seftriakson duyarlılığı % 100, sefuroksim duyarlılığı % 95,7-100, kloramfenikol duyarlılığı % 97,3-99, levofloksasin duyarlılığı %100 ve tetrasiklin duyarlılığı % 96,3-98,6 arasında tespit edilmiştir (6,81,82,85). Avrupa’da yapılan çalışmalarda amoksisilin klavulonik asit duyarlılığı % 94,2-99,8, sefiksim duyarlılığı % 100, sefuroksim duyarlılığı % 85,5-99,8, kloramfenikol duyarlılığı % 97,2-97,7, levofloksasin duyarlılığı % 99,9-100 ve tetrasiklin duyarlılığı % 96,7-98,3 arasında tespit edilmiştir (20,21,67,74,78,80,87). Japonya ve Güney Kore’de yapılan çalışmalarda amoksisilin klavulonik asit duyarlılığı % 73,7-100, sefiksim duyarlılığı % 73,7-98,1, sefuroksim duyarlılığı % 66,3-98,1, imipenem duyarlılığı % 99-100, kloramfenikol duyarlılığı % 78,7-96,3, levofloksasin duyarlılığı % 94,7-100 ve meropenem duyarlılığı % 83,1-100 olarak belirlenmiştir (14,15,64,75,88). Ülkemizde yapılan çalışmalarda ise amoksisilin klavulonik asit duyarlılığı % 100, ampisilin sulbaktam duyarlılığı % 100, sefiksim duyarlılığı % 100, seftriakson duyarlılığı %100, sefuroksim duyarlılığı % 98,77-100, imipenem duyarlılığı % 100, kloramfenikol duyarlılığı % 84-100 ve tetrasiklin duyarlılığı % 85-100 arasında tespit edilmiştir (8,22,70,71,83).

Antibiyotik duyarlılıklarımızı Avrupa, Amerika, Japonya, Güney Kore ve Ülkemizde yapılan çalışmalar ile karşılaştırdığımız zaman bizim çalışmamızdaki kökenlerin daha duyarlı oldukları görülmüştür. Klaritromisin duyarlılığı, dünyadaki diğer ülkelerin ortalamaları ile aynı olduğu halde ülkemizde yapılan çalışmalardaki kökenlerden daha duyarlı olduğu görülmüştür. Ko-trimaksazol duyarlılığının ise Asya ülkeleri ile aynı Amerika, Avrupa ve ülkemizdeki çalışmalardan daha düşük duyarlılıkta olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızdaki kökenlerin Avrupa, Amerika ve Asya ülkelerinden daha duyarlı olması geniş spektrumlu antibiyotiklerin bu ülkelere daha önce kullanıma girmesinden kaynaklanıyor olabilir. Çünkü çalışmamızdaki direnç oranlarının yüksek olduğu antibiyotikler daha önce kullanıma giren antibiyotiklerdir. Ülkemizdeki direnç oranlarıyla farklı olmasının sebebi ise bölgesel olarak antibiyotik kullanımının farklı olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Ampisiline dirençli β -laktamaz negatif kökenler 1980’den sonra tanımlanmıştır. Japonya’da BLNAR kökenler 1980’lerde az sayıda iken 1990’larda yapılan çalışmalarda %

19,5 gibi artmış bir oran elde edilmiştir (10-13). Japonya’da 2007’de yapılan bir çalışmada % 37,1 2010’da ise % 49,2 bulunmuştur (14,15). Amerika’da bu oran % 20-40 dır (6,16-19). Avrupa ülkelerinde ise oranın % 0-33,9 olduğunu bildiren çalışmalar vardır (20,21). Ülkemizde yapılan çalışmalarda BLNAR kökenlerin % 0,6 ile % 5 arasında olduğu rapor edilmiştir (22). İçinde ülkemizin de bulunduğu birçok ülkeden gönderilen örneklerle Avrupa’da yapılan çalışmalarda ülkemizden gönderilen kökenlerdeki BLNAR oranı % 7,5 ile % 11 arasındadır (20,21).

Çalışmamızda tüm kökenlere yaptığımız PZR ile 11 kökende *ftsI*-S geni tespit edilmemiştir. Yine bu 11 kökende *ftsI*-BLN geni de tespit edilmemiştir. Çalışmamızda kullandığımız primerler penisiline duyarlı kökenleri ve Grup III BLNAR kökenleri tespit etmekte kullanılan primerleri içermektedir. Grup I ve Grup II BLNAR kökenlerde birçok aminoasit değişikliği olabildiği için bu primerler kullanılmıştır. Çalışmamızdaki 11 köken (% 19,6) zayıf BLNAR olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızdaki BLNAR oranı zayıf BLNAR olmakla birlikte ülkemizde yapılan çalışmalardan daha yüksek olarak elde edilmiştir. Avrupa, Amerika ve Asya’daki çalışmalara göre ise daha düşük düzeydedir. Ampisiline orta düzey direnç sıklıkla Grup I ve Grup II kökenlerde görülürken yüksek düzey direnç Grup III kökenlerde görülmektedir. Grup I ve Grup II zayıf BLNAR olarak isimlendirilirken Grup III genetik BLNAR olarak isimlendirilmektedir (52,53).

Çalışmamızda fenotipik yöntemle test ettiğimiz bu 11 kökenin 8 tanesi penisiline duyarlı aralıkta yer almaktadır. *ftsI* genindeki 517. pozisyonda arjininin yerine histidin (Arg-517-His) geçmesi ve 526. pozisyonda asparajinin yerine lizin (Asn-526-Lys) geçmesi beta-laktam bağlayan bölgedeki PBP3 yapısını etkilemeyebilir ve fenotipik ampisilin direnciyle sonuçlanmayabilir. Oysa 385. pozisyonda serin yerine treonin (Ser-385-Thr) geçmesi direk etkiler. 517. pozisyonda arjininin yerine histidin (Arg-517-His) geçmesi ve 526. pozisyonda asparajinin yerine lizin (Asn-526-Lys) geçmesi anlamlı mutasyon alanını temsil etmez. Grup I ve Grup II BLNAR kökenlerin *ftsI* genindeki bu mutasyonlardan dolayı fenotipik olarak duyarlı veya orta duyarlı olarak görülebilmektedir (15).

Zayıf BLNAR kabul ettiğimiz 11 kökenin antibiyotik duyarlılıklarına baktığımızda ampisiline orta duyarlı bulduğumuz 3 köken bu grup içerisinde yer almaktadır. Zayıf BLNAR kabul edilen 11 kökenin ve BLNAS kökenlerin MİK50 ve MİK90 değerlerini karşılaştırdığımızda; ampisilin MİK50 değeri 0,25’ten 1’e, MİK90 değeri 1’den 2’ye yükselmiştir. Çalıştığımız diğer beta-laktam antibiyotikleri incelediğimizde sefaklorun

MİK50 değerinin ≤ 4 'ten 8'e, MİK90 değerinin 8'den 16'ya, sefuroksimin MİK50 değerinin 1'den 2'ye, MİK90 değerinin 2'den 4'e, imipenemin MİK50 değerinin $\leq 0,5$ 'ten 1'e, meropenemin MİK50 değerinin $\leq 0,06$ 'dan 0.12'ye, sefiksimin MİK90 değerinin $\leq 0,12$ 'den 1'e, ampisilin-sulbaktamın MİK90 değerinin $\leq 1/0,5$ 'ten 2/1'e ve amoksisilin klavulonik asitin MİK90 değerinin $\leq 2/1$ 'den 4/2'ye yükseldiği belirlenmiştir. Beta-laktamaz negatif ampisiline dirençli kökenler sadece ampisilin değil, diğer β -laktam antibiyotiklere de özellikle sefalosporinlere azalmış hassasiyet gösterir (9). Japonya, Güney Kore, Avrupa ve Amerika'da yapılan çalışmalarda da BLNAR kökenlerde beta-laktam antibiyotiklerin MİK50 ve MİK90 değerlerinin duyarlı kökenlere göre yüksek olduğu görülmüştür (14,15,20,21,64,75). Bizim çalışmamızda da ampisilin ve diğer beta-laktam antibiyotikleri incelediğimizde diğer ülkelerdeki çalışmalarda olduğu gibi BLNAR kökenlerin MİK50 ve MİK90 değerlerinin arttığı belirlenmiştir.

Çalışmamızda köken sayısının az olması; duyarlılıklarımızın yüksek çıkmasına, Grup III BLNAR kökenlerin tespit edilmemesine, zayıf BLNAR kökenlerin daha az tespit edilmesine neden olmuş olabilir. Ayrıca zayıf BLNAR kabul edilen kökenlerin aminoasit değişikliğini belirlemek için ileri çalışmaların yapılmasının gerektiği düşünülmüştür.

SONUÇ

Çalışmanın yapıldığı Adnan Menders Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında hiç *H. influenzae* tip b tespit edilmemiştir. Disk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle çalışılan ortak antibiyotiklerin duyarlılıkları karşılaştırıldığında sefaklor ve ampisilin hariç diğer antibiyotiklerin duyarlılık sonuçları benzer olarak elde edilmiştir. Sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle 3 (% 5,4) köken sefaklor ve ampisiline orta duyarlı tespit edilmiştir. Ko-trimaksazol direncinin yüksek (% 50) olduğu, klaritromisin duyarlılığının da diğer antibiyotiklere göre daha düşük olduğu görülmüştür. Kökenlerde beta-laktamaz üretiminin düşük olduğu ve ampisilin direncinin beta-laktamaz üretimine bağlı olduğu tespit edilmiştir. Kökenlerin ko-trimaksazol, klaritromisin, sefaklor ve ampisilin hariç çalışılan diğer antibiyotiklere duyarlı olduğu belirlenmiştir. Çalışmada 11 köken (% 19,6) zayıf BLNAR olarak değerlendirilmiş ve bu kökenlerde ampisilin MİK'inin duyarlı kökenlere göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Beta-laktamaz negatif ampisiline dirençli kökenlerde sadece ampisilinin değil, diğer β -laktam antibiyotiklerin de MİK'lerinin yükseldiği tespit edilmiştir. Beta-laktamaz negatif ampisiline dirençli kabul edilen kökenlerdeki aminoasit değişikliğini belirlemek için ileri çalışmalarla dizi analizinin yapıp mutasyonların tespit edilmesinin gerektiği düşünülmüştür.

Çalışmamızda elde edilen duyarlılık sonuçlarına göre ampirik tedavide amoksisilin klavulonik asit, ampisilin sulbaktam, sefepim, sefiksim, seftriakson, sefuroksim sodyum, imipenem, kloramfenikol, levofloksasin, meropenem, sparfloksasin ve tetrasiklin antibiyotiklerinin kullanılabileceği düşünülmüştür. Çalıştığımız *H. influenzae* kökenlerinde henüz yüksek bir direnç oranı olmadığı görülmüş ancak zayıf BLNAR'ların varlığı sürveyans çalışmalarının düzenli takibinin yapılmasının gerekli olduğunu düşündürmüştür.

ÖZET

HAEMOPHILUS INFLUENZAE KÖKENLERİNDE ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇ ORANI VE AMPİSİLİN DİRENCİNİN GENOTİPİK OLARAK BELİRLENMESİ

Amaç ve hipotez: *Haemophilus influenzae* solunum sistemi normal florasında bulunmakla birlikte, akut otitis media, sinüzit, konjuktivit, pnömoni ve çocukluk çağı menenjit gibi infeksiyonların en sık etkenlerinden biridir. Bu çalışmanın amacı, klinik örneklerden izole edilen *H. influenzae* kökenlerinde ampisiline ve çeşitli antibiyotiklere direnç oranı ile ampisiline direnç mekanizmalarını belirlemektir.

Yöntem: Bu çalışma Aralık 2008-Mart 2011 tarihleri arasında Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında yapılmıştır. Laboratuvara gelen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 56 *Haemophilus influenzae* kökeni çalışmaya dahil edilmiştir. Kökenlerin tanımlanmasında, X, V, XV diskleri, yarı otomatik tanımlama sistemi ve PZR kullanılmıştır. *Haemophilus influenzae* olarak tanımlanan kökenlerin antibiyotiklere duyarlılıkları, disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemiyle araştırılmıştır. *Haemophilus influenzae* serotip b varlığı, beta-laktamaz üretimi ve beta-laktamaz negatif ampisiline dirençli kökenlerin varlığı PZR ile araştırılmıştır.

Bulgular: Test edilen kökenlerin hiçbirinde *H.influenzae* serotip b tespit edilmemiştir. Kökenlerin hepsi amoksisilin klavulonik asit, ampisilin sulbaktam, sefepim, sefiksim, seftriakson, sefuroksim sodyum, imipenem, kloramfenikol, levofloksasin, meropenem, sparfloksasin ve tetrasikline duyarlı bulunmuştur. Test edilen kökenler; ampisiline % 92,8 duyarlı, % 5,4 orta duyarlı, % 1,8 dirençli, sefaklor % 94,6 duyarlı, % 5,4 orta duyarlı, klaritromisine % 71,4 duyarlı, % 23,2 orta duyarlı, % 5,4 dirençli, kotrimaksazole % 50 duyarlı, % 14,3 orta duyarlı, % 35,7 dirençli tespit edilmiştir. Ampisiline dirençli olan 1 kökende beta-laktamaz üretimi (% 1,8) pozitif bulunmuştur. *ftsI-S* geni tespit edilmeyen 11 (% 19,6) kökende Grup III *ftsI-BLN* geni de tespit edilmemiştir. *ftsI-S* geni ve Grup III *ftsI-BLN* geni tespit edilmeyen 11 köken zayıf BLNAR (Grup I ve/veya Grup II) olarak kabul edilmiştir.

Sonuç: Çalışmamızda *H. influenzae* serotip b tespit edilmemiştir. Beta-laktamaz üretimi (% 1,8) düşük oranda tespit edilmiştir. Çalışmamızda Grup III BLNAR saptanmamıştır. Zayıf BLNAR olarak değerlendirilen 11 kökenin ampisilin MİK'inin duyarlı

kökenlere göre daha yüksek olduğu görülmüştür. BLNAR kökenlerde diğer β -laktam antibiyotiklere de (ampisilin-sulbaktam, amoksisilin klavulonik asit, sefaklor, sefiksim, sefuroksim, imipenem, meropenem) MİK'lerinin yükseldiği görülmüştür. Ampirik tedavide amoksisilin klavulonik asit, ampisilin sulbaktam, sefepim, sefiksim, seftriakson, sefuroksim sodyum, imipenem, kloramfenikol, levofloksasin, meropenem, sparfloksasin ve tetrasiklin antibiyotiklerinin kullanılabileceği düşünülmüştür. Çalıştığımız *H. influenzae* kökenlerinde henüz yüksek bir direnç oranı olmadığı görülmüş ancak zayıf BLNAR'ların varlığı sürveyans çalışmalarının düzenli takibinin yapılmasının gerekli olduğunu düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: *Haemophilus influenzae*, BLNAR, PZR, MİK

Yazışma adresi: Dr.Yavuz OKULU

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, AYDIN
Tel:(+90)(256)4441256/3382
E-posta:yavuzokulu@hotmail.com

SUMMARY

THE DETERMINATION OF ANTIBIOTICS RESISTANCE RATE AND GENOTYPIC AMPICILLIN RESISTANCE IN HAEMOPHILUS INFLUENZAE STRAINS

Aim and hypothesis: *Haemophilus influenzae* is one of the most frequent agents of acute otitis media, sinusitis, conjunctivitis, pneumonia and childhood infections such as meningitis other than to its presence of in normal respiratory flora. The purpose of the study is to determine the rate of ampicillin and various antibiotics resistance as well as ampicillin resistance mechanisms in clinical isolates of *H. influenzae* strains.

Methods: This study was conducted between December 2008 and March 2011 at department of Medical Microbiology of Faculty of Medicine of Adnan Menderes University. 56 *Haemophilus influenzae* strains isolated from various clinical samples coming to the laboratory were included in the study. In identification of the strains, X, V, XV discs, semi-automatic identification system and PCR were used. Antimicrobial susceptibilities of strains defined as *Haemophilus influenzae* were investigated by disk diffusion and microdilution methods. The presence of *Haemophilus influenzae* serotype b, beta-lactamase production and the presence of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant strains were investigated by PCR.

Results: *Haemophilus influenzae* serotype b has not been detected in any of the tested strains. All of the strains were susceptible to amoxicillin clavulanic acid, ampicillin sulbactam, cefepime, cefixime, ceftriaxone, cefuroxime sodium, imipenem, chloramphenicol, levofloxacin, meropenem, sparfloksasin and tetracycline. The tested strains were 92.8% susceptible, 5.4% intermediate susceptible, 1.8% resistant to ampicillin; 94.6% susceptible, 5.4% intermediate susceptible to cefaclor; 71.4% susceptible, 23.2% intermediate susceptible, 5.4% resistant to clarithromycin; 50% susceptible, 14.3% intermediate susceptible and 35.8% resistant to co-trimaksazole. In one of the ampicillin resistant strains (1.8%) the production of beta-lactamase were found positive. In 11 strain (19.6%), which *ftsI-S* gene was not detected, there was no Group III *ftsI-BLN* gene too. The strains which do not have *ftsI-S* and Group III *ftsI-BLN* genes were defined as weak BLNAR (Group I and/or Group II).

Conclusion: There were no *H. influenzae* serotype b and Group III BLNAR in this study. Beta-lactamase production was detected low rate (1.8%). The ampicillin MIC of 11 strains defined as weak BLNAR were higher than susceptible strains. In BLNAR strains, an

increase in the MIC of the other antibiotics (ampicillin-sulbactam, amoxicillin/clavulanic acid, cefaclor, cefixime, cefuroxime, imipenem, meropenem) was observed. It has been thought that could prescribe amoxicillin clavulanic acid, ampicillin sulbactam, cefepime, cefixime, ceftriaxone, cefuroxime sodium, imipenem, chloramphenicol, levofloxacin, meropenem, sparfloksasin and tetracycline antibiotics in empiric treatment. Although there was no a high rate of resistance in *H. influenzae* strains, the presence of weak BLNARs suggest that surveillance studies of this strains should be done regularly.

Keywords: *Haemophilus influenzae*, BLNAR, PCR, MIC

Correspondence Author: Dr.Yavuz OKULU

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, AYDIN
Tel:(+90)(256)4441256/3382
E-mail:yavuzokulu@hotmail.com

KAYNAKLAR

1. Mamal Torun M. *Haemophilus influenzae* enfeksiyonlarının epidemiyolojisi ve Türkiye'deki durumu. 2. *Haemophilus influenzae* enfeksiyonları simpozyumu kitabı, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayınları 2001; 38: 17-27.
2. Cengiz AT. Haemofil grubu bakteriler. Ustaçelebi Ş (ed.). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 579-88.
3. Tristram S, Jacobs MR, Appelbaum PC. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. Clin Microbiol Rev 2007 April; 20(2): 368-89.
4. Doern GV, Brueggemann AB, Pierce G, Horry HP, Rauch A. Antibiotic resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae* in the United States in 1994 and 1995 and detection of beta-lactamase positive strains resistant to amoxicillin-clavulanate: result of a national multicenter surveillance study. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 292-7.
5. Doern GV, Jorgensen JH, Thornsbery C, Preston DA. Prevalence of antimicrobial resistance among clinical isolates of *H. influenzae*: a collaborative study. Diagn Microbiol Infect Dis 1986; 4: 95-107.
6. Doern GV, Jones RN, Pfaller MA, Kugler K. *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* from patients with community-acquired respiratory tract infections: antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (United States and Canada 1997). Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 385-9.
7. Berkiten R. Türkiye'de *Haemophilus influenzae*: Beta-laktamaz pozitifliği ve antibiyotiklere direnç (1987-2002). Ankem Derg 2004; 18(1): 53-60.
8. Özkul H, Özbek ÖA, Çoban H, Gülay Z. Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesinde 2003-2006 yıllarında üretilen *Haemophilus influenzae* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. Ankem Derg 2007; 21(2): 86-90.
9. Miyazaki S, Fujikawa T, Kanazawa K, Yamaguchi K. In vitro and in vivo activities of meropenem and comparable antimicrobial agents against *Haemophilus influenzae* including beta-lactamase negative ampicillin resistant strains. J Antimicrob Chemother 2001; 48: 723-6.

10. Markowitz SM. Isolation of an ampicillin-resistant, non- β -lactamase producing strain of *Haemophilus influenzae*. Antimicrob Agents Chemother 1980; 17: 80-3.
11. Mendelman PM, Chaffin DO, Stull TL, Rubens CE, Mack KD, Selanser RK. Characterization of non-beta-lactamase-mediated ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae*. Antimicrob Agents Chemother 1984; 26: 235-44.
12. Mendelman PM, Chaffin DO, Kalaizoglou G. Penicilin binding proteins and ampicillin resistance in *Haemophilus influenzae*. J Antimicrob Chemother 1990; 25: 525-34.
13. Qin L, Watanabe H, Asoh N, Watanabe K, Oishi K, Mizota T, Nagatake T. Antimicrobial susceptibilities and genetic characteristics of *Haemophilus influenzae* isolated from patients with respiratory tract infections between 1987 and 2000 including beta-lactamase-negative ampicillin resistant strains. Epidemiol Infect 2006; 6: 1-4.
14. Kishii K, Chiba N, Morozumi M, Hasegawa KH, Kurokawa I, Masaki J, Ubukata K. Diverse mutations in the *ftsI* gene in ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* isolates from pediatric patients with acute otitis media. J Infect Chemother 2010; 16: 87-93.
15. Hotomi M, Fujihara K, Billal SD, Suzuki K, Nishimura T, Baba S, Yamanaka N. Genetic characteristics and clonal dissemination of β -Lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* strains isolated from the upper respiratory tract of patients in Japan. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 3969-76.
16. Jacobs MR, Bajaksouzian S, Zilles A, Lin G, Pankuch GA, Applebaum PC. Susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* to 10 oral antimicrobial agents based on pharmacokinetic parameters: 1997 U.S. surveillance study. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 1901-8.
17. Rittenhouse SF, Miller LA, Kaplan RL, Mosely GH, Poupard JA. A survey of β -lactamase-producing *Haemophilus influenzae*: an evaluation of 5750 isolates. Diagn Microbiol Infect Dis 1995; 21: 223-5.
18. Thornsberry C, Ogilvie PT, Holley HP, Sahm DF. Survey of susceptibilities of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*

- isolates to 26 antimicrobial agents: a prospective U.S. study. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 2612-23.
19. Sriver SR, Hoban DJ, McGeer A, Moore TC, Walmsley SL, Low DE. Surveillance of susceptibility testing methodology for *Haemophilus influenzae* in Canada including evaluation of disk diffusion tests. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2013-5.
 20. Fluit AC, Florijn A, Verhoef J, Milatovic D. Susceptibility of European beta-lactamase positive and negative *Haemophilus influenzae* isolates from the periods 1997/1998 and 2002/2003. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56: 133-8.
 21. Jansen WT, Verel A, Beitsma M, Verhoef J, Milatovic D. Longitudinal European surveillance of antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 873-7.
 22. Berkiten R, Bal Ç, Gürol SD. Solunum yolu infeksiyonlarından izole edilen *Haemophilus influenzae* suşlarının çeşitli antibiyotiklere in-vitro duyarlılıkları. *Ankem Derg* 1998; 12(1): 20-5.
 23. Murphy TF. *Haemophilus* infections. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R. (eds). *Mandell, Douglas and Bennet's Principles and Practice of Infectious Diseases*. 6th ed. New York: Churchill Livingstone, 2005: 2661-9.
 24. Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Sixth Edition: Philadelphia, Lippincott Williams-Wilkins A Wolters Kluwer Company, 2006: 431-52.
 25. Kilian M. *Haemophilus*. Winslow, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers, Smith 1917. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, Garrity GM (eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. New York: Springer, 2005; 2: 883-904.
 26. Kilian M, Poulsen K, Lomholt H. Evolution of the paralogous hap and iga genes in *Haemophilus influenzae*: evidence for a conserved hap pseudogene associated with microcolony formation in the recently diverged *Haemophilus aegyptius* and *H. influenzae* biogroup *aegyptius*. *Mol Microbiol* 2002; 46(5): 1367-80.

27. Raymond J, Armand-Lefevre L, Moulin F, Dabemat H, Commeau A, Gendrel D, Berche P. Nasopharyngeal colonization by *Haemophilus influenzae* in children living in an orphanage. *Pediatr Infect Dis J* 2001; 20: 779-84.
28. Demirci M. İstanbul'da çocuk yuvaları ve ilkokullara giden sağlıklı çocuklarda solunum yolu patojenlerinin nazofarengeal taşıyıcılığı. Yüksek Lisans tezi, İstanbul: İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fak, Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü, 2003.
29. Aydın N, Sarı C, Okyay P, Karakaş S, Kapdağlı A, Beşer E, Gürel M. Aydın ilinde 7-14 yaş grubu çocuklarda A grubu β -hemolitik streptokok, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* ve *Staphylococcus aureus* taşıyıcılığı ve beden kitle indeksi ile ilişkisi. *İnfeksiyon Derg.* 2002; 16(4): 427-434.
30. Murphy TF, Brauer AL, Schinmacher AT, Sethi S. Persistent colonization by *Haemophilus influenzae* in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170: 266-72.
31. Takala AK, Eskola J, Leinonen M, Kayhty H, Nissinen A, Pekkanen E, Makela PH. Reduction of oropharyngeal carriage of *Haemophilus influenzae* type b (*Hib*) in children immunized with an *Hib* conjugate vaccine. *J Infect Dis* 1991; 164: 982-6.
32. Musser JM, Kroll JS, Granoff DM, Moxon ER, Brodeur BR, Campos J, Dabernat H, Frederiksen W, Hamel J, Hammond G, Hoiby EA, Jonsdottir KE, Kabeer M, Kallings I, Khan WN, Kilian M, Knowles K, Koomhof HJ, Law B, Li KL, Montgomery J, Pattison PE, Piffaretti JC, Takala AK, Thong ML, Wall RA, Ward JI, Selander RK. Global genetic structure and molecular epidemiology of encapsulated *Haemophilus influenzae*. *Rev Infect Dis* 1990; 12: 75-111.
33. Murphy TF, Bernstein JM, Dryja DM, Campagnari AA, Apicella MA. Outer membrane protein and lipooligosaccharide analysis of paired nasopharyngeal and middle ear isolates in otitis media due to nontypable *Haemophilus influenzae*: pathogenetic and epidemiological observations. *J Infect Dis* 1987; 156(5): 723-31.
34. Clements DA. *Haemophilus influenzae* type b. In: Katz SL, Gershon AA, Hotez PJ(eds). *Krugman's Infectious Disease of Children*, St Louis: Mosby, 1998: 140-56.
35. Ceyhan M. *Hemofilus influenza* tip b aşısı. *Katkı pediatri dergisi* 1998; 19(2-3): 308-12.

36. Takala AK, Meurmen O, Kleemola EK, Rönnerberg PR, Eskola J, Makela H. Preceding respiratory infection predisposing for primary and secondary invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. *Ped Infect Dis J* 1987; 6: 779-82.
37. Levine OS, Schwartz B, Pierce N, Kane M. Development evaluation and implementation of *Haemophilus influenza* type b vaccines for young children in developing countries: current status and priority actions. *Ped Infec Dis J* 1998; 17: 95-113.
38. Hall DB, Lum MKW, Knutson LR, Heyward WL, Ward JI. Pharyngeal carriage and acquisition of anticapsular antibody to *Haemophilus influenzae* type b in a high-risk population in southwestern Alaska. *Am J Epidemiol* 1998; 126: 1190-7.
39. Shapiro ED, Ward JI. The epidemiology and prevention of disease caused by *Haemophilus influenzae* type b epidemiologic reviews. *Oxford Journals* 1991; 13: 113-42.
40. Muhleman K, Alexander ER, Weiss N, Pepe M, Schopfer K. *Haemophilus influenzae* study group risk factors for invasive *Haemophilus influenza* disease among children 2-16 years of age in the vaccine era Switzerland 1991-93. *Int J Epidemiol* 1996; 25: 1280-5.
41. Murphy TF, Sethi S. Chronic obstructive pulmonary disease: Role of bacteria and guide to antibacterial selection in the older patient. *Drugs Aging* 2002; 19:761-75.
42. Polsky B, Gold JWM, Whimbey E. Bacterial pneumonia in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 1986; 104: 38-41.
43. Başak S, Aydın N, Nar H, Metin KT, Eyigör M. Orta meatus aspirasyonu tekniğiyle örnek alınarak akut maksiller sinüzitin mikrobiyolojik tanısı. *İnfeksiyon Derg.* 2000; 14(1): 71-74.
44. Bilgehan H. *Haemophilus influenzae*. *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*.3. Baskı İzmir: Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları, 2002: 478-82.
45. Kilian M. *Haemophilus*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Phaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds). *Manuel of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington: ASM press, 2003; 623-35.

46. Çolak D. Antimikrobiyal ilaçlar ve etki mekanizmaları. Ustaçelebi Ş (ed). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999: 81-89.
47. Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M. Asya Mikrobiyoloji. 4. Baskı İzmir: Asya Tıp Kitabevi, 2005: 1-59.
48. Jawetz E. Penicillins and cephalosporins. Katzung BG (ed). Basic and Clinical Pharmacology, 3rd ed. California: Appleton and Lange, 1987: 516-7.
49. Ulusoy S. Antibiyotikler. Ekim N, Uçan ES (yazarlar). Solunum sistemi infeksiyonları. Ankara: Toraks Kitapları, 2002: 125-30.
50. Töreci K. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmaları. Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S (yazarlar). Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2003: 15-30.
51. Chen ST, Clowes RC. Nucleotide sequence comparisons of plasmids pHD131, pJB1, pFA3 and pFA7 and beta-lactamase expression in *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, and *Neisseria gonorrhoeae*. J Bacteriol 1987; 169: 3124-30.
52. Hasegawa K, Chiba N, Kobayashi R, Murayama SY, Iwata S, Sunakawa K, Ubukata K. Rapidly increasing prevalence of beta-lactamase-nonproducing ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b in patients with meningitis. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 1509-14.
53. Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, Chiba N, Hasegawa K, Takeuchi Y, Sunakawa K, Inoue M, Konno M. Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with beta-lactam resistance in beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(6): 1693-9.
54. Peric M, Bozdogan B, Galderisi C, Krissinger D, Rager T, Appelbaum PC. Inability of L22 ribosomal protein alteration to increase macrolide MICs in the absence of efflux mechanism in *Haemophilus influenzae* HMC-S. J Antimicrob Chemother. 2004; 54(2): 393-400.

55. Peric M, Bozdogan B, Jacobs MR, Appelbaum PC. Effects of an efflux mechanism and ribosomal mutations on macrolide susceptibility of *Haemophilus influenzae* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47(3): 1017-22.
56. Bogdanovich T, Bozdogan B, Appelbaum PC. Effect of efflux on telithromycin and macrolide susceptibility in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50(3): 893-8.
57. Yüce A. Antimikrobik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. *Klinik Dergisi* 2001; 14(2): 41-6.
58. www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/hib.
59. Velipaşaoğlu S. Çocukluk çağı bakteriyel pnömonilerinden korunma. *Aknem Derg*. 2004; 18: 62–64.
60. Mehta N. Meningitidis. *Hospita Pharmacist*. 1999; 6: 256-263.
61. Billal DS, Hotomi M, Suzumoto M, Yamauchi K, Kobayashi I, Fujihara K, Yamanaka N. Rapid identification of nontypeable and serotype b *Haemophilus influenzae* from nasopharyngeal secretions by the multiplex PCR. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2007; 71(2): 269-74.
62. Sanbongi Y, Suzuki T, Osaki Y, Senju N, Ida T, Ubukata K. Molecular evolution of beta-lactam-resistant *Haemophilus influenzae*: 9-year surveillance of penicillin-binding protein 3 mutations in isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(7):2487-92.
63. Nelson KL, Smith AL. Determination of capsulation status in *Haemophilus influenzae* by multiplex polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 66(3): 235-40.
64. Kim IS, Ki CS, Kim S, Oh WS, Peck KR, Song JH, Lee K, Lee NY. Diversity of Ampicillin Resistance Genes and Antimicrobial Susceptibility Patterns in *Haemophilus influenzae* Strains Isolated in Korea. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2007; 51: 453-60.
65. Mendelman PM, Chaffin DO, Musser JM, Groot RD, Sefrass DA, Selander RK. Genetic and phenotypic diversity among ampicillin-resistant, non beta-lactamase-

- producing nontypeable *Haemophilus influenzae* isolates. Infect. Immun. 1987; 55: 2585-9.
66. Degani N, Navarro C, Deeks SL, Lovgren M. Invasive Bacterial Diseases in Northern Canada. Emerg Infect Dis. 2008; 14(1): 34-40.
67. Marco F, Lomas JG, Rey CG, Bouza E, Aguilar L, Mazarrasa CF, And The Spanish Surveillance Group For Respiratory Pathogens. Antimicrobial Susceptibilities of 1,730 *Haemophilus influenzae* Respiratory Tract Isolates in Spain in 1998-1999 Antimicrobial Agents And Chemotherapy. 2001; 45: 3226-8.
68. Ladhani S, Slack MP, Heath PT, Gottberg A, Chandra M, Ramsay ME. Invasive *Haemophilus influenzae* Disease, Europe, 1996-2006. Emerg Infect Dis. 2010; 16(3): 455-63.
69. Önlen Y, Dinç E, Ağaç E, Çetmeli G, Özgüneş N. 0-5 Yaş grubu çocukların boğaz kültürlerinde *Haemophilus influenzae* sıklığı Klimik Derg 2000; 13 (2 l): 54-7.
70. Eşel D, Karaca N, Sümerkan B. Klinik örneklerden izole edilen *Haemophilus influenzae* kökenlerinde antibiyotiklere duyarlılık. Ankem Derg 2000; 14: 555-9.
71. Berkiten R, Gürol SD. Solunum yolu infeksiyonlarından izole edilen *Haemophilus influenzae* suşları ve çeşitli antimikrobik maddelere direnç. Ankem Derg 2001; 15: 718-22.
72. Saydam C, Tünger A, Özinel MA, Tokbaş A. *Haemophilus influenzae* kökenlerinin serotipleri, beta-laktamaz salgılama özellikleri ve antibiyotik duyarlılıkları. Ankem derg 1996; 10: 415-8.
73. <http://www.klimik.org.tr/FileUpload/bL2Rg2Rz9wQC.pdf>
74. Morrissey I, Robbins M, Viljoen L, Brown DF. Antimicrobial susceptibility of community-acquired respiratory tract pathogens in the UK during 2002/3 determined locally and centrally by BSAC methods. J Antimicrob Chemother. 2005;55(2):200-8.
75. Bae S, Lee J, Lee J, Kim E, Lee S, Yu J, Kang Y. Antimicrobial Resistance in *Haemophilus influenzae* Respiratory Tract Isolates in Korea: Results of a Nationwide

- Acute Respiratory Infections Surveillance. Antimicrob agents chemother 2010; 54: 65-71.
76. Tanaka K, Ichikawa T, Yano J. Acute otitis media due to *Haemophilus influenzae* with antibiotic resistance: Experience of a tertiary hospital in Tokyo city. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology 2009; 73: 817-9.
 77. Nakamura S, Yanagihara K, Morinaga Y, Izumikawa K, Seki M, Kakeya H, Yamamoto Y, Kamihira S, Kohno S. Multiplex real-time polymerase chain reaction for rapid detection of β -lactamase-negative, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. Diagn Microbiol Infect Dis 2009; 64(1): 64-9.
 78. Cerquetti M, Cardines R, Giufre M, Mastrantonio P. Antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae* strains isolated from invasive disease in Italy. J Antimicrob Chemother. 2004; 54(6): 1139-43.
 79. Cobos SG, Campos J, Roman F, Carrera C, Vazquez MP, Aracil B, Oteo J. Low beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* strains are best detected by testing amoxicillin susceptibility by the broth microdilution method. Antimicrob agents chemother 2008; 52: 2407-14.
 80. Hoban D, Felmingham D. The PROTEKT surveillance study: antimicrobial susceptibility of *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* from community-acquired respiratory tract infections. J Antimicrob Chemother. 2002; 50: 49-59.
 81. Jones RN, Jacobs MR, Washington JA, Pfaller MA. A 1994-95 Survey of *Haemophilus influenzae* Susceptibility to Ten Orally Administered Agents A 187 Clinical Laboratory Center Sample in the United States. Diagn Microbiol Infect Dis 1997; 27: 75-83.
 82. Mendes C, Marin ME, Quinones F, Sifuentes-Osornio J, Siller CC, Castanheira M, Zoccoli CM, Lopez H, Sucari A, Rossi F, Angulo GB, Segura AJ, Starling C, Mimica I, Felmingham D. Antibacterial resistance of community-acquired respiratory tract pathogens recovered from patients in Latin America: results from the PROTEKT surveillance study (1999-2000). Braz J Infect Dis. 2003; 7(1): 44-61.

83. Uncu H, Çolakoğlu Ş, Turunç T, Demiroğlu YZ, Arslan H. *Streptococcus pneumoniae* ve *Haemophilus influenzae* klinik izolatlarının tedavide kullanılan antibiyotiklere karşı in vitro direnç oranları. Mikrobiyol Bül 2007; 41: 441-6.
84. Çöplü N, Aktepe OC, Uluutku S. *Haemophilus influenzae* suşlarının in-vitro antibiyotik duyarlılıkları. Ankem Derg 1999; 13(1): 87-91.
85. Harrison CJ, Woods C, Stout G, Martin B, Selvarangan R. Susceptibilities of *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, including serotype 19A, and *Moraxella catarrhalis* pediatric isolates from 2005 to 2007 to commonly used antibiotics. J Antimicrob Chemother. 2009; 63(3): 511-9.
86. Erdoğan H, İnan N, Nazik H, Öngen B, Gürler N. Çocuklarda Alt Solunum Yollarından izole Edilen Bakterilerde Antibiyotik Direnci. Ankem Derg 2004; 18(1): 12-8.
87. Perez-Trallero E, Martin-Herrero JE, Mazon A, Garcia-Delafuente C, Robles P, Iriarte V, Dal-Re R, Garcia-de-Lomas J; Spanish Surveillance Group for Respiratory Pathogens. Antimicrobial resistance among respiratory pathogens in Spain: latest data and changes over 11 years (1996-1997 to 2006-2007). Antimicrob Agents Chemother. 2010; 54(7): 2953-9.
88. Hirakata Y, Ohmori K, Mikuriya M, Saika T, Matsuzaki K, Hasegawa M, Hatta M, Yamamoto N, Kunishima H, Yano H, Kitagawa M, Arai K, Kawakami K, Kobayashi I, Jones RN, Kohno S, Yamaguchi K, Kaku M. Antimicrobial activities of piperacillin-tazobactam against *Haemophilus influenzae* isolates, including beta-lactamase-negative ampicillin-resistant and beta-lactamase-positive amoxicillin-clavulanate-resistant isolates, and mutations in their quinolone resistance-determining regions. Antimicrob Agents Chemother. 2009; 53(10): 4225-30.