

To cite this article: Haciseyitoğlu D, Sümerkan B. Klinik örneklerden izole edilen *Haemophilus influenzae* suşlarının serotiplendirilmesi ve bazı antimikrobilyallere duyarlılık durumlarının araştırılması. Ortadoğu Tıp Derg 2019; 11(4): 497-503. <https://doi.org/10.21601/ortadogutipdergisi.544493>

■ Orijinal Makale

Klinik örneklerden izole edilen *Haemophilus influenzae* suşlarının serotiplendirilmesi ve bazı antimikrobilyallere duyarlılık durumlarının araştırılması

Serotyping strains of Haemophilus influenzae isolated from clinical specimens and investigating their susceptibilities towards certain antimicrobials

Demet Haciseyitoğlu ^{1*} , Bülent Sümerkan ² 

¹ İstanbul Kartal Dr. Lütfi Kırdar Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul, Türkiye

² Acıbadem Kayseri Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Kayseri, Türkiye

* Sorumlu Yazar: Demet Haciseyitoğlu E-posta: demet634@gmail.com ORCID: 0000-0001-7404-8347

Gönderim: 25 Mart 2019 Kabul: 18 Mayıs 2019

ÖZ

Amaç: Çocuklarda, ciddi enfeksiyonların etkeni olan *Haemophilus influenzae*, önemli bir mortalite ve morbidite nedenidir. Kapsüllü suşları a'dan f'ye kadar 6 gruptur. İçlerinde tip b en invaziv olanıdır. Diğer serotipler de ciddi enfeksiyonlar ve invaziv hastalıklara yol açabilir. Giderek artan beta laktamaz üretimi ve beta laktamaz negatif olup ampisilin dirençli suşlar nedeniyle antibiyotik duyarlılık testi tedavinin yönlendirilmesi açısından yararlı olmaktadır.

Bu çalışma ile çeşitli klinik örneklerden izole edilen *H. influenzae* suşlarının serotiplendirilmesi, beta laktamaz üretimi ve antimikrobilyallere duyarlılık durumunun araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntemler: Çeşitli klinik örneklerde üreyen 100 *H. influenzae* çalışmaya alındı. Bakteriler X ve V faktörü ihtiyacına bakılarak veya API NH kullanılarak tanımlandı. Beta laktamaz üretimi, nitrosefin diskleriyle araştırıldı. Serotiplendirme, spesifik antiserumlarla lam aglütinasyon yöntemiyle yapıldı. Çeşitli antimikrobilyallere duyarlılıkları, *Haemophilus* Test Medium'da gradient testle belirlendi.

Bulgular: Örneklerin 59'u balgam, 23'ü nazotrakeal aspirat, 3'ü bronkoalveoler lavaj, 7'si orta kulak sıvısı, 3'ü beyin omurilik sıvısı, 2'si göz, 2'si plevra sıvısı ve 1'i kan idi. Yaş grupları dikkate alınmaksızın yapılan sıralamada a > b > d > THi > c > e idi. Suşlar arasında serotip f bulunamadı. Steril vücut boşluğu sıvılarının hepsinden tip b izole edildi. Beta laktamaz pozitifliğinin %2 ve BLNAR oranının %2 olduğu bulundu. Hepsisi sefotaksime ve siprofloksasine duyarlı, %66,6'sı azitromisine ve %93'ü TMP-SMX'e duyarlıydı.

Sonuçlar: Antimikrobiyal direnci izlemek amacıyla standardize duyarlılık testlerinin rutinde yapılması uygundur. *H.influenzae* tip b'nin aşılama programlarına alınması Hib dışı izolatlarla enfeksiyonlarda artışa yol açabileceğinden serotiplendirme yapılması önemlidir.

Anahtar kelimeler: *H.influenzae*, serotiplendirme, antimikrobiyal duyarlılık

ABSTRACT

Aim: *Haemophilus influenzae* is an agent of severe pediatric infections, and a significant cause of mortality and morbidity in children. Its capsulated strains are grouped from 'a' to 'f' in six groups, the most invasive among which is Type B. The other serotypes are also capable of causing severe infections and invasive diseases. Antibiotic sensitivity testing proves to be useful in directing course of treatment in view of the beta-lactamase-negative and ampicillin-resistant strains as well as the ever-increasing production of beta-lactamase.

In this study it has been aimed to serotype *Haemophilus influenzae* strains isolated from various clinical specimens, and to investigate their status of beta-lactamase production and susceptibilities towards antimicrobials.

Materials and Methods: 100 samples of *H. influenzae* proliferating in various clinical specimens were included in the study. The bacteria were identified according to their requirements of X and V factors, or through the usage of API NH. Detection of beta-lactamase production was made with nitrocefin disks. Serotyping was performed via slide agglutination method with specific antisera. Susceptibilities towards various antimicrobials were specified with gradient test in *Haemophilus* Test Medium.

Results: 59 of the specimens were sputum, 23 were nasotracheal aspirates, 3 were bronchoalveolar lavages, 7 were middle ear fluids, 3 were cerebrospinal fluids, 2 were eye fluids, 2 were pleural fluids, and 1 was a blood sample. The ranking was made without keeping age groups in regard and turned out as a>b>d>THi>c>e. Serotype f was not found among the strains. Type b was isolated from all of sterile body cavity fluids. Beta-lactamase positivity was found as 2% and the BLNAR ratio was found as 2%. All were found as susceptible towards cefotaxime and siprofloxacın while 66.6% were susceptible towards azithromycin, and 93% were susceptible towards TMP-SMX.

Conclusion: It will be appropriate to perform standardized susceptibility tests in routine in order to monitor antimicrobial resistance. Serotyping is important as inclusion of *H. influenzae* type b in vaccination programs may cause an increase in infections with non-Hib isolates.

Keywords: *H.influenzae*, serotyping, antimicrobial susceptibility

GİRİŞ

Haemophilus influenzae, üst solunum yolunda ya da genital florada bulunan bir insan patojenidir. Solunum yolundan kana veya komşu organlara yayılımı sonucu enfeksiyon gelişir. Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerdeki çocuklarda, ciddi enfeksiyonların majör etkeni ve önemli mortalite ve morbidite nedenidir. *H. influenzae* bakteriyemileri sonucu gelişen en sık enfeksiyon menenjitidir. Çocuklarda pürülan bakteriyel konjunktivitinin en sık, akut bakteriyel otitis media'nın ise ikinci sıklıktaki etiyolojik ajanıdır. Ayrıca epiglottit, sellülit, osteomyelit, septik artrit yapabilir. Kronik bronşit alevlenmelerinin önde gelen bakteriyel sebepleri arasındadır. *H.influenzae*'nin kapsüllü suşları a'dan f'ye kadar 6 gruptur. Bu gruplar arasında *H.influenzae* tip b (Hib) en

invaziv olanıdır ve özellikle 5 yaş altı çocuklardaki enfeksiyonların %90'nından sorumludur. Diğer serotipler de invaziv hastalık yapabilir. Farklı serotiplerin farklı enfeksiyonlara ve invaziv hastalıklara yol açması sebebiyle serotiplendirme önemlidir [1].

H. influenzae'de beta laktam antibiyotiklere direnci oluşturan en önemli mekanizma beta laktamaz üretimidir. Beta laktamaz direnci genellikle plazmid aracılı TEM-1 ve ROB-1 tip beta laktamaz üretimi sonucu oluşur. En yaygın beta laktamaz TEM-1 tiptir, ROB-1 ise nadiren görülür. Beta laktamaz üreten suşlar, aminopenisilinlere dirençlidir, sefakloram ise azalmış duyarlılık gösterir. Beta laktamaz üretimi dışında bir başka beta laktam direnç mekanizması ise

penisilin bağlayan proteinlerdeki değişikliklerdir. TEM-1 beta laktamaz aktivitesi nitrosefin yöntemiyle belirlenir. Beta laktamaz negatif, ampisiline dirençli ise beta laktam ile beta laktam inhibitörüne de dirençlidir [2].

1980'de beta laktamaz negatif, ampisiline dirençli (BLNAR) suşlar tanımlanmıştır. Burada ampisilin direnci beta laktam ile ilişkili değildir, kromozomal olabilir veya PBP 3A ve 3B'deki değişikliklerle ilgilidir. Son zamanlarda hücre duvarındaki peptidoglikan sentezinden sorumlu olan *ftsI* genindeki mutasyonların direnç mekanizmasında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir [3]. BLNAR suşlar, ampisilin, amoksisilin-klavulanat, ampisilin-sulbaktam, sefaklor, sefuroksim, sefonisid, sefamandol, sefprozil ve lorakarbefe dirençli kabul edilmelidir [4]. Bu nedenle sadece beta laktamaz testi, *Haemophilus* türlerinin ampisiline duyarlı ya da dirençli olduğunu belirlemek için yeterli değildir. Giderek artan beta laktamaz üretimi ve BLNAR suşlarının varlığı nedeniyle antibiyotik duyarlılık testi uygulanması tedavinin yönlendirilmesi açısından yararlı olmaktadır.

Bu çalışma ile çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve hastalık etkeni olduğu anlaşılan *H. influenzae* suşlarının serotiplendirilmesi, yaş grupları ve hastalıklara göre serotip dağılımının belirlenmesi, beta laktamaz üretimi ve antimikrobiallere duyarlılık durumunun araştırılması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri'ne başvuran hastalardan izole edilen 100 *H. influenzae* kökeni çalışmaya alındı. Örneklerin 59'u balgam, 23'ü nazotrakeal aspirat (NTA), 3'ü bronkoalveoler lavaj (BAL), 7'si orta kulak sıvısı, 3'ü beyin omurilik sıvısı (BOS), 2'si göz, 2'si plevra sıvısı ve 1'i kan idi. BOS'unda *H. influenzae* üreyen 2 hastanın aynı anda kanında da üreme oldu, ancak sadece BOS izolatları çalışmaya alındı. Balgam ve NTA örnekleri, Gram boyamasının değerlendirilmesinde 25'ten fazla lökosit ve 10'dan az epitel görülmesi üzerine pürülan kabul edilerek ekimi yapıldı. Solunum yolu örneğinde üreme olan hastalardan akciğer enfeksiyonu tanısı alanlar çalışmaya alındı. Suşlar, çalışmaya alınacağı kadar %15 gliserin içeren triptik soy buyyon içeren besiyerinde, -70 °C'de saklandı. Çalışmaya alınan hastaların yaşları 0-5, 6-18, 19-64, 65 ve üzeri şeklinde 4 gruba ayrıldı.

Bakteri İdentifikasyonu

Laboratuvara gönderilen balgam, NTA, BAL örnekleri %5 koyun kanlı, basitrasinli çikolata ve eosin metilen blue (EMB) agara, diğer örnekler çikolata agar ve %5 koyun kanlı agara ekildi. Çikolata ve basitrasinli çikolata agarda üreyen şüpheli

kolonilerden alınarak, bakterilerin X ve V faktörü gereksinimleri, bunları içeren disklerle triptik soy agar besiyeri kullanılarak belirlendi. Hem X hem de V faktörü gereksinmesi olan bakteriler *H. influenzae* olarak tanımlandı, bazı kökenler ise API NH (BioMérieux, Fransa) kullanılarak tanımlandı. Beta laktamaz üretimi, nitrosefin (Oxoid BR 0066A, U.K.) diskleri kullanılarak araştırıldı.

Serotiplendirme

Serotiplendirme, kapsüler polisakkrit antijenlerini araştırmak suretiyle, spesifik antiserumlarla (Denka Seiken, Japonya) lam aglütinasyon yöntemiyle yapıldı. Sırasıyla a, b, c, d, e, f antiserumlarıyla karşılaştırıldı. Bunlardan herhangi biri ile olumlu reaksiyon görülmeyen suşlar tiplendirilemeyen *H. influenzae* (THi) olarak kabul edildi.

Antibiyotik Duyarlılık Testi

Duyarlılık testinde *Haemophilus Test Medium* (HTM) kullanıldı. HTM Base (CM898) kullanılarak yarım litre hazırlanan besiyeri otoklavda steril edildi, 50 °C'ye soğuyunca, 2 ml steril distile su ile çözünen, 7,5 mg hematin ve 7,5 mg nikotinamid adenin dinükleotid içeren *Haemophilus Test Medium Supplement* (Oxoid, SR158E,U.K.) yarım litre besiyeri içine aktarıldı. Petrilere 4 mm kalınlıkta dökülerek kullanıma hazır hale getirildi.

Suşların hepsine (n=100) amoksisilin/klavulanat, TMP-SMX, tetrasiklin, kloramfenikol ve sefotaksim test edildi, suşların 93'üne ampisilin, azitromisin, siprofloksasin ve sefuroksim için duyarlılık testi yapılabildi. Duyarlılıkları HTM'da, E test (AB Biodisk Solna, İsveç) kullanılarak belirlendi.

Duyarlılığı araştırılacak suşlar, çalışmanın yapılacağı döneme kadar -70°C'de saklandı. Çalışmak için -70°C'den çıkarılarak çikolata agara iki kez pasaj yapıldı. Buradan alınan kolonilerden 0,5 McFarland bulanıklığına eşit bulanıklıkta bakteri süspansiyonu hazırlandı. Süspansiyon HTM'a eküvyon aracılığı ile yayıldı. E test şeritleri yerleştirildi. %5-10 CO₂'li ortamda 37 °C'de 18-24 saat inkube edildi. Duyarlılık durumuna CLSI sınır değerleri ile kıyaslanarak karar verildi. Standart suş olarak *H. influenzae* ATCC 49766, ATCC 49247, ATCC 10211 kullanıldı [4].

BLNAR Suşları Belirleme

Ampisilin için MİK'u ≥ 8 µg/mL olan ve amoksisilin/klavulanat'a dirençli olan suşlar BLNAR olarak kabul edildi [4].

BULGULAR

Çalışmaya alınan hastalar, yaş gruplarına göre incelendiğinde, 0-5 yaş grubunda 19, 6-18 yaş grubunda 5,

Tablo 1. Yaş gruplarına göre serotip dağılımı

| Yaş | a | b | c | d | e | f | THi | Toplam |
|-------------|----|----|---|----|---|---|-----|--------|
| 0-5 | 4 | 7 | - | 6 | - | - | 2 | 19 |
| 6-18 | 2 | 1 | 1 | 0 | - | - | 1 | 5 |
| 19-64 | 17 | 14 | 6 | 9 | 1 | - | 5 | 52 |
| 65 ve üzeri | 15 | 3 | 0 | 1 | - | - | 5 | 24 |
| Toplam | 38 | 25 | 7 | 16 | 1 | - | 13 | 100 |

Tablo 2. Hastalıklara göre serotip dağılımı

| Hastalık | a (%) | b (%) | c (%) | d (%) | e (%) | f (%) | THi (%) | Toplam |
|---------------------|-----------|-----------|----------|-----------|-------|-------|-----------|--------|
| Akut AC enf. | 25 (36,8) | 13 (19,1) | 5 (7,3) | 12 (17,7) | - | - | 13 (19,1) | 68 |
| KOAH alevlenmesi | 9 (7,4) | 5 (25,3) | 2 (10,5) | 2 (10,5) | 1 | - | - | 19 |
| Menenjit | - | 3 (100,0) | - | - | - | - | - | 3 |
| Sepsis | - | 1 (100,0) | - | - | - | - | - | 1 |
| Orta kulak iltihabı | 3 (42,8) | 2 (28,6) | - | 2 (28,6) | - | - | - | 7 |
| Konjunktivit | 1 (50,0) | 1 (50,0) | - | - | - | - | - | 2 |
| Toplam | 38 | 25 | 7 | 16 | 1 | 0 | 13 | 100 |

Tablo 3. Beta laktamaz durumuna göre duyarlılık dağılımı

| Beta Laktamaz | AMP | | | A/K | | | AZ | | | C | | | CT | | | CXM | | | CIP | | | T | | | TMP-SMX | | |
|---------------|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|-----|---|---|---------|---|---|
| | H | A | D | H | A | D | H | A | D | H | A | D | H | A | D | H | A | D | H | A | D | H | A | D | H | A | D |
| Pozitif | 0 | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 |
| Negatif | 87 | 4 | 0 | 96 | 0 | 0 | 60 | 0 | 0 | 98 | 0 | 0 | 98 | 0 | 0 | 90 | 1 | 0 | 98 | 0 | 0 | 98 | 0 | 0 | 91 | 0 | 7 |
| Toplam | 93 | | | 100 | | | 62* | | | 100 | | | 100 | | | 93 | | | 100 | | | 100 | | | 100 | | |

*: CLSI'da azitromisin için orta duyarlı ve dirençli sınır değerleri verilmediğinden MİK'u 4 µg/mL'den yüksek olan 31 suşun dirençli veya orta duyarlı olup olmadığı söylenememektedir

19-64 yaş grubunda 52, 65 ve üzeri yaş grubunda 24 hasta vardı. 0-5 yaş grubunda en fazla tip b, 19-64 yaş grubunda ve 65 yaş ve üzerinde birinci sırada tip a görüldü. Yaş grupları dikkate alınmaksızın yapılan sıralamada a > b > d > THi > c > e idi. Suşlar arasında serotip f bulunamadı (**Tablo 1**).

Klinik örneklerinden *H. influenzae* üretilen, akciğer enfeksiyonu tanısı alan toplam 68 hastanın 36'sında sadece akciğer enfeksiyonu tanısı yer almaktaydı, geri kalan 32 hastada akciğer enfeksiyonuna ilave olarak serebrovasküler hastalık, diyabet, malignensi, siroz, hipotiroidi gibi alt hastalıklar da bulunmaktaydı (**Tablo 2**).

Serotiplerin örneklere göre dağılımı incelendiğinde steril vücut boşluğu sıvılarının hepsinden (3 menenjit, bir sepsis olgusunda ve 4 plevra sıvısında) tip b izole edildiği görüldü. Balgamların %25'inde Hia, %9'unda Hid, %9'unda THi, %8'inde Hib ve %7'sinde Hic ürettiği saptandı.

Yüz suştan ikisinin beta laktamaz ürettiği tespit edildi ve ampisilin MİK'u yüksek bulundu. Beta laktamaz üreten suşlardan birisinin aynı zamanda azitromisin, kloramfenikol ve tetrasikline de dirençli olduğu, diğerinin sadece ampisiline dirençli olduğu belirlendi. Her iki suşun da Hia olduğu saptandı.

Beta laktamaz üretmeyen suşlardan 4'ünün ampisiline orta duyarlı (MİK=2 µg/mL) olduğu, bunlardan 2'sinin

amoksisilin/klavulanata dirençli (MİK=8/4 µg/mL) olduğu bulundu ve bu iki suş BLNAR olarak tanımlandı. BLNAR suşlardan birinin sefuroksime orta duyarlı (MİK=8 µg/mL), diğerinin duyarlı (MİK=4 µg/mL) olduğu tespit edildi. Beta laktamaz varlığına göre diğer antibiyotiklere duyarlılık durumu **Tablo 3**'te gösterilmiştir.

Yüz *H. influenzae* suşunun hepsi sefotaksime, 93 izolatın hepsinin siprofloksasine duyarlı, 100 izolatın 7'sinin TMP-SMX'e dirençli olduğu bulundu (**Tablo 4**).

TARTIŞMA

Tüm dünyada her yıl 5 yaşın altında milyonlarca çocuk, çoğunu pnömonilerin oluşturduğu akut solunum yolu enfeksiyonundan ölmektedir. *S. pneumoniae*, *H. influenzae* tip b gibi bakteriyel etkenler, pnömoniye bağlı ölümlerin çoğundan sorumludur. *H. influenzae* tip b menenjit, orta kulak iltihabı ve sinüzit gibi enfeksiyonların da nedenidir. Faringeal taşıyıcılık Hib'in bulaştırılmasında, Hib hastalığının patogenezinde ve bakteriyeye bağımsızlık geliştirilmesinde önemlidir. Asemptomatik taşıyıcılık enfeksiyonun major kaynağı olarak kabul edilmektedir [1]. Rutin aşılama dahil edilmesinden sonra THi suşlar da bakteriyemi ve menenjit gibi invaziv hastalıklara neden olarak önem kazanmıştır [5].

Türkiye'den bir çalışmada kreşe bırakılmadan önceki zamanda faringeal Hib kolonizasyon oranı %4 olarak

Tablo 4. MİK değerleri ve duyarlılık durumu

| Antibiyotikler | MİK (µg/mL) | | | Yorumlama kriterleri n (%) | | |
|-----------------------|-----------------|-------------|-----------|-------------------------------|--------------|-----------|
| | MİK aralığı | MİK 50 | MİK 90 | Dirençli | Orta Duyarlı | Duyarlı |
| Ampisilin (n=93) | ≤0.016-≥256 | 0.25 | 0.5 | 2 (2.1) | 4 (4.3) | 87 (93.5) |
| Amoksi/klav (n=100) | ≤0.016-8 | 0.5 | 1 | 2 (2) | – | 98 (98) |
| Azitromisin (n=93) | 0.016-≥256 | 4 | 8 | – | – | 62 (66.6) |
| Kloramfenikol (n=100) | ≤0.016-8 | 0.25 | 0.5 | 1 (1) | – | 99 (99) |
| Sefotaksim (n=100) | ≤0.002-0.125 | 0.016 | 0.064 | – | – | 100 (100) |
| Sefuroksim (n=93) | 0.032-8 | 0.5 | 2 | – | 2.1 (2) | 91 (98.9) |
| Siprofloksasin (n=93) | ≤0.002-0.125 | 0.016 | 0.032 | – | – | 100 (100) |
| Tetrasiklin (n=100) | ≤0.016-16 | 0.25 | 0.25 | 1 (1) | – | 99 (99) |
| TMP-SMX (n=100) | ≤0.002/0.038≥32 | 0.064/1.216 | 0.25/4.75 | 7 (7) | – | 93 (93) |

bulunmuş, kreşe geldikten 3 ay sonra oran %22'ye, 6 ay sonra %42,6'ya yükseldiği saptanmıştır [6].

Brezilya'da Hib aşılama öncesi ve sonrası dönemi kapsayan 4 yıl süresince menenjit olgularından izole edilen suşların %96,7'sini Hib, %2,7'sini Hia, %0,4'ünü kapsülsüz ve %0,2'sini Hif oluşturmaktadır. Burada aşılama çalışmanın son bir yılında rutin yapılmıştır. Bir yıllık bu dönemde Hib menenjiti sıklığı istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşmüştür [7].

Japonya'da çocuk hastalarda solunum yolundan izole edilen suşlar PCR ile serotiplendirilmiş, %2,5 serotip b, %0,8 serotip f ve %96,7 THi bulunmuştur [8]. Çalışmamızda 0-5 yaş grubundaki 19 çocuktan alınan klinik örneklerde 7 adet Hib, 6 adet Hid, 4 adet Hia, ve 2 adet THi bulunmuştur. Bu bulgulara bakılarak Hib'nin bizim ülkemizde yaşayan çocuklarda halen sorun teşkil ettiği söylenebilir.

Son yıllarda, aşının uygulanması ile *H.influenzae* enfeksiyonlarının epidemiyolojik ve klinik özellikleri dramatik şekilde değişmiş ve tiplendirilemeyen suşlarla enfeksiyonların ön plana çıktığı gözlemlenmiştir [9].

Ülkemizde Hib aşısı Sağlık Bakanlığı'nca yürütülen bağışıklama programına 1 Ocak 2007 tarihinden itibaren 5'li karma aşısı şeklinde dahil edilmiştir [10]. Uygun aşılama rağmen doğuştan veya kazanılmış immune yetmezliği olan çocuklarda yeterli antikor cevabı gelişmediğinden invaziv Hib enfeksiyonu gelişebileceği bildirilmektedir [11]. Ülkemizde de aşılanmış çocuklarda gelişen invaziv Hib, Hia ve yeni doğmuş matür bebekte THi enfeksiyonu olguları bildirilmiştir [12, 13].

Ülkemizden bir diğer çalışmada 2008-2010 yılları arasında izole edilen suşların serotiplendirilmesi sonucunda en sık serotipin THi (%75,5) olduğu, bunu Hib (%13,7), Hia (%6,4), Hid (%1,4), Hif (%1,4) ve Hic (%0,7)'nin takip ettiğini bildirilmiştir [14]. Bizim çalışmamızda farklı olarak THi bulunmamıştır.

H.influenzae'da beta laktam antibiyotiklere direnci oluşturan en önemli mekanizma beta laktamaz üretimidir. Beta laktamaz pozitifliği coğrafik bölgeye göre farklılık göstermektedir [15, 16]. Örneğin beta laktamaz varlığı Asya'da %5,7-%61,4 arasında değişirken Avrupa'da %2,6-%26,2 arasında değişmektedir [16].

Kanada'da 2007-2014 yılları arasında izole edilen invaziv suşlardan tiplendirilen suşlarda beta laktamaz oranı %10,5 iken tiplendirilemeyen suşlarda %21,4, BLNAR oranı ise tiplendirilen suşlarda %0,3 ve tiplendirilemeyen suşlarda %27,7 olarak bildirilmektedir [17].

Çin'de toplum kökenli solunum yolu enfeksiyonlarının araştırıldığı çok merkezli bir çalışmada beta laktamaz oranı %31, BLNAR oranının %15 olduğunu, ampisilin direncinin %35 ve TMP-SMZ direncinin %54,4 olduğu bulunmuştur. Test edilen seftriakson, tetrasiklin ve azitromisin etkili olduğu bildirilmektedir [18].

Ülkemizde farklı bölgelerden beta laktamaz oranını %1,6, %5,5 ve %15,6 olarak bildiren çalışmalar yayınlanmıştır [19, 20, 21]. Bu bölgede daha önceden yapılan bir çalışmada %4 olarak bildirilmiştir [15]. Bizim çalışmamızda beta laktamaz üreten suşların oranı diğerlerinden farklı (%2) bulunmuştur. Yukarıdaki çalışmalardan birinde BLNAR izolat bulunmamışken [19] diğerlerinde %0,5 ve %8,6 olarak verilmiştir [20, 21].

Ülkemizden son yıllardaki bir çalışmada araştırmacılar ampisilin resistansının THi ve Hia suşlarında olduğunu rapor etmişlerdir. Çalışmada BLNAR suşlarına rastlamamışlar, fakat PBP-3-INT kodlayan gen bölgesinin mutasyonuna bağlı düşük BLNAR suşlarının varlığını tespit etmişlerdir, bu suşlarla gelişen enfeksiyonlarda empirik tedavi başarısının etkilenebileceğini vurgulamışlardır [14].

Bölgemizde önceki yıllarda yapılan diğer çalışmada amoksisilin/klavulanata %100 duyarlılık bulunmuş ve BLNAR izolata rastlanılmamıştır [15]. Bizim çalışmamızda suşların

ikisi (%2) ampisiline dirençli bulunmuştur, bunların aynı zamanda beta laktamaz ürettiği saptanmıştır. Orta duyarlı 4 suştan 2'sinin amoksisilin/klavulanata dirençli bulunması penisilin bağlayan proteinlerdeki bir değişikliğe bağlı olabileceğini düşündürmektedir, bunlar BLNAR (%2) olarak tanımlanmıştır. BLNAR olan suşlardan birisinin sefuroksime duyarlı, diğerinin orta duyarlı olduğu görülmüştür. Böylece sadece beta laktamaz bakılmasının yeterli olmadığı sonucuna varılmıştır.

Beta laktamaz üretimi, sefalosporinlere duyarlılığı etkilememektedir [22]. Brezilya'da menenjit etkeni olan tüm suşlarda beta laktamaz oranı %6 iken sefotaksim, sefuroksim ve ofloksasine %100 duyarlı olarak saptanmıştır [23]. Bu çalışmada da beta laktamaz pozitif ve negatif suşların hepsi sefotaksime duyarlı ve %98,9'u sefuroksime duyarlı bulunmuştur.

Bu çalışmada hem kloramfenikol hem de tetrasiklin direnci %1 olarak bulunmuştur. Bu suşlar aynı zamanda beta laktamaz üreten suşlardır. TMP-SMX'e %7 oranında direnç saptanmıştır, bu durumda direnç konusunda azitromisinden sonra ikinci sırada yer almaktadır. Bölgemizde yapılan bir başka çalışmada kloramfenikol direnci %3, tetrasiklin direnci %7 olarak bildirilmiştir, TMP-SMX direnci ise %15 ile birinci sıradadır [15]. Aynı bölgede farklı zamanlarda yapılan çalışmalarda görülen bu farklılık antibiyotik kullanımındaki değişime bağlı olabilir.

2012-2014 yıllarında alt solunum yolu örneklerinde üreyen suşların duyarlılıklarını değerlendiren bir çalışmada ampisiline %63,4, ampisilin-sulbaktama %90,1, sefuroksime %89,3 ve TMP-SMX'e %61,7 oranında duyarlı olduklarını bulmuşlardır [24].

Çalışmamızda duyarlılık oranı en düşük olan antibiyotik azitromisin olarak görülmektedir (%66,6). Türkiye'nin de aralarında olduğu çok merkezli bir çalışmada azitromisine direnç bulunmamıştır [16]. 2004-2005 yıllarında ülkemizin farklı bölgelerinden toplanan izolatlarda totalde azitromisine %98,9 oranında duyarlılık bildirilmiştir [20]. Makrolidlerle duyarlılık testi yapmak makrolidlerin aktivitesi besiyeri pH'sından hayli etkilendiği için oldukça zordur ve pH değişiklikleri duyarlılık yorumlamayı da değiştirmektedir. Çünkü makrolidler noniyonize olduklarında daha aktiftirler, fakat asidik pH'da iyonize hale geldiklerinden daha az aktif olmaktadır [25]. Biz çalışmamızda HTM'un pH'sını ölçmediğimiz için duyarlılığın etkilenip etkilenmediğini bilememekteyiz.

SONUÇLAR

Direnç durumundaki farklılıklar, *H. influenzae* kökenlerinin farklı bölgelerden izole edilmesine ve duyarlılık testlerinin birbirinden farklı yöntemlerle yapılmış olmasına bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Aynı yöntemlerin farklı laboratuvarlarda uygulanması durumunda bile farklı sonuçlar alınabileceği düşünülerek duyarlılık testlerinin standardize edilmesi ve standart yöntemlerle çalışılması önem arz etmektedir. Bu mikroorganizmanın antimikrobiyal duyarlılık testlerinin, izolatların azalan duyarlılıklarını veya direnç oranındaki artışları izlemek amacıyla sürekli yapılması uygun olacaktır. *H.influenzae* tipb'nin aşılama programlarına alınması Hib dışı enfeksiyonlarda artışa yol açabileceğinden serotiplendirme yapılarak takibi önemlidir.

ÇIKAR ÇATIŞMASI / FİNANSAL DESTEK BEYANI

Çalışmayı maddi olarak destekleyen kişi/kuruluş yoktur ve yazarların herhangi bir çıkar dayalı ilişkisi yoktur.

KAYNAKLAR

1. Jordens JZ, Slack MPE. Haemophilus influenzae: Then and Now. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis 1995; 14: 935-48.
2. Gür D, Özalp M, Sümerkan B, ve ark. Prevalance of antimicrobial resistance in Haemophilus influenzae, Streptococcus pneumoniae, Moraxella catarrhalis and Streptococcus pyogenes: results of a multicentre study in Turkey. Int J Antimicrob Agents 2002; 19: 207-11.
3. Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, ve ark. Association of amino acid substitution in Penicilin-Binding Protein 3 with -lactam resistance in -lactamase-negative ampicillin-resistant Haemophilus influenzae. Antimicrobial Agents Chemother 2001; 45: 1693-99.
4. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty- Informational Supplement. CLSI Document M. Wayne, PA: Clinical Laboratory Standards Institute; 2011.
5. O'Neil MJ, St. Geme III JW, Cutter D, Adderson EE, Anyanwu J, ve ark. Invazive disease due to nontypeable Haemophilus influenzae among children in Arkansas. Journal of Clinical Microbiology 2003; 41: 3064-69.
6. Akçakaya N, Camcıoğlu Y, Belbek Ş, Eşkazan G, Çokuğraş H. Haemophilus influenzae type b colonization in children in a hospital-based day care center. European Journal of Epidemiology 2001; 17: 313-16.

7. Guilherme SR, Joice NR, Soraia MC, ve ark. Prevention of Haemophilus influenzae type b (Hib) meningitis and emergence of serotype replacement with type a strains after introduction of Hib immunization in Brazil. The Journal of Infectious Diseases 2003; 187: 109-16.
8. Luong DC, Ishiwada N, Takeda N, Kohno Y. Serotypes of Haemophilus influenzae strains isolated from pediatric patients with respiratory tract infections. Tohoku J. Exp. Med 2004; 202: 245-54.
9. Agrawal A, Murphy TF. Haemophilus influenzae infections in the H.influenzae type b conjugate vaccine era. J Clin Microbiol. 2011 Nov; (11): 3728-32. (doi: 10.1128/JCM.05476-11).
10. Mevsim V. H.influenzae type b aşısı. Türkiye Klinikleri J Fam Med-Special Topics 2011; 2(6): 82-6.
11. Rainbow J. H.influenzae Type b diseases in five young children-Minnesota. MMWR Weekly 2009; 58; 58-60).
12. Ödek Ç, Özdemir H, Tapısız A, ve ark. H.influenzae type b aşılması yapılan iki çocukta invaziv Haemophilus influenzae enfeksiyonları. Çocuk Enf Derg 2010; 4: 76-8.
13. Karademir F, Aydınöz S, Süleymanoğlu S, Meral C, Ataş E, Göçmen İ. Tiplendirilemeyen Haemophilus influenzae'ya bağlı neonatal sepsis. Nobel Med 2008; 4(3): 37-39.
14. Budak F, Ocak Z, Gür D. Prevalence and Genotypic Characteristics of β -Lactamase Negative-Ampicillin-Resistant Haemophilus influenzae in a Children's Hospital in Turkey. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2016; 36(2).
15. Eşel D, Karaca N, Sümerkan B. Klinik örneklerden izole edilen Haemophilus influenzae kökenlerinde antibiyotiklere duyarlılık. ANKEM Der 2000; 14: 555-59.
16. Turnak MR, Bandak SI, Bouchillon SK, Allen BC, Hoban DC. Antimicrobial susceptibilities of clinical isolates of Haemophilus influenzae and Moraxella catarrhalis collected during 1999-2000 from 13 countries. Clin Microbiol Infect 2001; 7: 671-677
17. Tsang RSW, Shuel M, Whyte K, Hoang L, Tyrrell G, Horsman G, Wylie J, Jamieson F, Lefebvre B, Haldane D, Gad RR, German GJ, Needle R. Antibiotic susceptibility and molecular analysis of invasive Haemophilus influenzae in Canada, 2007 to 2014. J Antimicrob Chemother 2017; 72: 1314-1319. (doi: 10.1093/jac/dkw565).
18. Zhang Y, Zhang F, Wang H, ve ark. Antimicrobial susceptibility of Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae and Moraxella catarrhalis isolated from community-acquired respiratory tract infections in China: Results from the CARTIPS Antimicrobial Surveillance Program. J Glob Antimicrob Resist 2016 Jun;5:36-41. (doi: 10.1016/j.jgar.2016.03.002).
19. İlki A, Sağıroğlu P, Elgörmüş N, Söyletir G. Streptococcus pneumoniae ve Haemophilus influenzae izolatlarının antibiyotik duyarlılık paternlerindeki değişim: dört yıllık izlem. Mikrobiyol Bul 2010; 44: 169-175.
20. Şener B, Tunçkanat F, Ulusoy S, ve ark. A survey of antibiotic resistance in Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenzae in Turkey, 2004-2005. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2007; 60: 587-593. (doi: 10.1093/jac/dkm232).
21. Alışkan HA, Çolakoğlu Ş, Göçmen JS. Solunum yolu örneklerinden izole edilen Streptococcus pneumoniae ve Haemophilus influenzae suşlarının antibiyotiklere dirençlerinin belirlenmesi. Cukurova Med J 2016; 41(2): 201-20. (doi: 10.17826/cutf.196127).
22. Jones ME, Karlowsky JA, Blosser-Middleton R, Critchley IA, Thornsberry C, Sahm DF. Apparent plateau in β -lactamase production among clinical isolates of Haemophilus influenzae and Moraxella catarrhalis in the United States: results from the LIBRA Surveillance initiative. Int J Antimicrob Agents 2002; 19: 119-123.
23. Reis JN, Lima JB, Ribeiro GS, ve ark. Antimicrobial resistance in Haemophilus influenzae isolated during population-based surveillance for meningitis in Salvador, Brazil. Antimicrobial Agents Chemother 2002; 46: 3641-43.
24. Beşli Y, Karatuna O, Akyar I. 2012-2014 Yıllarında alt solunum yolu örneklerinden izole edilen Streptococcus pneumoniae ve Haemophilus influenzae suşlarında antibiyotiklere duyarlılığın yıllara ve yaş gruplarına göre değerlendirilmesi. ANKEM Derg 2015;29 (3): 114-121. (doi: 10.5222/ankem.2015.0114).
25. Nilius AM, Beyer JM, Flamm RK, Tanaka SK. Variability in susceptibilities of Haemophilus influenzae to clarithromycin and azithromycin due to medium pH. J Clin Microbiol 1997; 35(6): 1311-1315.

