

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *HAEMOPHILUS*
INFLUENZAE SUŞLARININ MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ VE
ANTİBİYOTİK DUYARLILIĞI**

Proje No: TSU-12-3825

Proje Türü

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Adı Soyadı

Birimi/Bölümü

Prof. Dr. Hüseyin KILIÇ

Erciyes Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji

Araştırmacının Adı Soyadı

Birimi/Bölümü

Arş. Gör. Dr. Selcan Çolakoğlu AKYOL

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji

Eylül 2013

KAYSERİ

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	4
ABSTRACT	6
1. GİRİŞ	7
2.GEREÇ VE YÖNTEM	8
3.BULGULAR	10
10	
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	12
5. KAYNAKLAR	15

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *HAEMOPHILUS INFLUENZAE*
SUŞLARININ MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIĞI
ÖZET

Haemophilus influenzae sağlıklı kişilerin üst solunum yolu florasında bulunabilen küçük Gram negatif bakterilerdir. *Haemophilus influenzae* kökenleri yetişkinlerde ve çocuklarda solunum yolu enfeksiyonlarının yanı sıra bakteriyemi, menenjit gibi ciddi invaziv enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Son yıllarda *H. Influenzae* kökenlerinde başta ampisilin olmak üzere bir çok antibiyotiğe karşı gelişen direnç tedavide önemli sorunlar oluşturmaktadır.

Bu nedenle bu çalışmada klinik örneklerden izole edilen *H. Influenzae* kökenlerinin Beta-Laktamaz(BL) aktivitesiyle birlikte bazı antibiyotiklere duyarlılıkları ve kökenlerin klonal yakınlığının araştırılması amaçlanmıştır.

Mart 2011-Mayıs 2012 tarihleri arasında klinik örneklerden izole edilen 92 *H.influenzae* kökeni çalışmaya alınmıştır. Duyarlılık testleri CLSI M 100-S21 önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemiyle yapılmıştır. BL aktivitesine ise nitrosefin diski ile bakılmıştır. *H. Influenzae* kökenlerinin arasındaki klonal yakınlığın belirlenmesi için rep-PCR yöntemi kullanılmış ve yöntem dört aşamada gerçekleştirilmiştir: (1) Manuel DNA ekstraksiyonu (2) Termal döngü cihazında parmak-izi kitleri ile rep-PCR (3) Biyoanalizör ile otomatik mikroakışkan elektroforez (4) İnternet tabanlı DiversiLab yazılım programı ile analiz ve hızlı değerlendirme

Tanımlanan 92 *H. Influenzae* kökeninde %3 oranında beta laktamaz aktivitesi saptanmıştır. Sefotaksim ve levofloksasin antibiyotiklerine kökenlerin hepsi duyarlı iken Ampisiline 4(%4), Amoksisilin-klavulanik aside1(%1), Trimetoprim-sülfametoksazole (STX) karşı 21(%23) oranında direnç saptanmıştır. Ayrıca bir kökende ise BL negatif ampisilin direnci saptanmıştır.

BL aktivitesi saptanan üç kökenin klonal yakınlığı incelendiği zaman bu kökenlerin her birinin farklı olduğu görülmüştür. STX dirençli kökenlerde A,B ve C olmak üzere üç ana klon tespit edilmiştir. A klonunu oluşturan kökenler eş zamanlı hematoloji servisinden izole edilip A1 ve A2 olmak üzere iki farklı alt klon oluşturmuştur. Ampisilin dirençli dört kökenin klonal yakınlığı incelendiğinde ise dört kökenin

benzerliği %95 oranın altında kaldığı için bunların tamamen birbirinden farklı olduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak bölgemizde *H. Influenzae* kökeninde antibiyotik direnç yönünden herhangi bir sorunla karşılaşılmamıştır. STX direncinin diğer antibiyotik direnç oranları ile kıyaslandığında en yüksek direnç oranına sahip olduğu görölmüştür.

Anahtar kelimeler: H. İnfluenza, rep-pcr, beta laktamaz

ABSTRACT

Haemophilus influenzae is a Gram-negative bacteria that can be found in the upper respiratory tract of healthy people. *Haemophilus influenzae* can cause severe invasive infections such as meningitis, bacteremia and respiratory tract infections in adults and children in recent years, *H. Influenzae* strains developing resistance to antibiotics, particularly ampicillin treatment, including a lot of important problems.

Thus, the study aimed to investigate of clinical isolates of *H. Influenzae* strains of beta-lactamase (BL) activity and some antibiotic resistance and clonal origins.

March 2011-May 2012 at 92 clinical isolates of *H. influenzae* strains were studied. Susceptibility testing by disk diffusion method according to CLSI M 100-S21. BL activity has been examined by the nitrocefin disk. rep-PCR method was used for the determination of *H. Influenzae* strains proximity between the clonal and method were realized in four steps: (1) Manual DNA extraction (2) with the thermal cycling device, finger-print rep-PCR kits (3) with the automated microfluidic Biyoanalizor electrophoresis (4) Internet based analysis and rapid assessment software program DiversiLab

Defined 92 *H. Influenzae* strains beta-lactamase activity was 3%. All strains were susceptible to the antibiotics levofloxacin and cefotaxime, ampicillin 4 (4%), amoxicillin-clavulanic aside 1 (1%), trimethoprim-sulfamethoxazole (STX) 21 (23%) were resistant. One strain is also a BL negative but were resistant to ampicillin.

BL's activity when examined three cases of clonal origin of each of these strains were found to be different. STX-resistant strains A, B and C are the three main clones have been identified. A clone of the hematology service forming strains were isolated simultaneously in two different sub-clones consisted of A1 and A2. Ampicillin-resistant clonal origin proximity to the four analyzed the ratio is below 95% of the similarity of origin for the four of them were found to be completely different from each other.

As a result, our region *H. Influenzae* encountered any problems in terms of the origin of antibiotic resistance. STX resistance rates compared with other antibiotic resistance was found to have the highest resistance rate.

Key words: H. İnfluenza, rep-pcr, beta laktamaz

GİRİŞ:

Haemophilus influenzae kökenleri yetişkinlerde ve çocuklarda solunum yolu enfeksiyonlarının yanı sıra bakteriyemi, menenjit gibi ciddi invaziv enfeksiyonlara neden olabilmektedir (1,2). İnvaziv enfeksiyon etkeni olması ve özellikle de çocuklarda önemli menenjit etkeni olması *H. influenzae* kökenlerinin tanımlanmasının önemini artırmıştır.

Tanımlanması yapılan *H. İnfluenzae* enfeksiyonlarında tedavide ampisilin ,ikinci ve üçüncü kuşak sefalosporinler, kinolon grubu antibiyotikler kullanılmaktadır (3). İlk zamanlar klinisyenler ampirik tedavi olarak ampisilini kullanmış olsalarda zamanla çeşitli mekanizmalarla bu ilaca karşı direnç gelişip 1974 yılında ilk Beta-Laktamaz(BL) pozitif ampisilin dirençli (BLPAR) köken bildirilmiştir (4). Daha sonra ampisiline dirençli kökenlerin dünyada yaygınlığının giderek arttığı saptanmıştır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda çeşitli Avrupa ülkelerinde ve Kuzey Amerikada % 8 den 30' a ve bazı Doğu Asya ülkelerinde % 50' ye ulaşan direnç oranları bildirilmiştir (5,6). *H. İnfluenzae* kökenlerinde ampisiline dirençten sorumlu tutulan enzimler TEM-1 ya da ROB-1 tipi enzimlerdir (7). Kökenlerde saptanan bu enzimler tüm beta laktam antibiyotiklerde etkili olabilmektedir. Dirençten sorumlu olan bir diğer mekanizma ise penisilin bağlayan proteinlerdeki değişimdir. İlk olarak 1980'li yıllarda beta laktamaz negatif ampisin dirençli (BLNAR) kökenlerde beta-laktam antibiyotiklerin bağlanma afinitelerini azaltan penisilin bağlayan protein-3 (PBP 3) mutasyonlarının dirençten sorumlu olduğu bildirilmiştir (8). BLNAR sıklığınının Avrupa ve Asya' daki çeşitli ülkelerde giderek arttığı bildirilmektedir. *H. İnfluenza* klinik izolatlarında çeşitli antibiyotiklere karşı artan direnç zamanla in-vitro duyarlılık testlerine karşı ilginin artmasına neden olmuştur.

GEREÇ VE YÖNTEM

Mart 2011-Mayıs 2012 tarihleri arasında Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri Bakteriyoloji Laboratuvarı'na gelen klinik örneklerden izole edilen 92 *H.influenzae* kökeni çalışmaya alınmıştır. Kökenler koloni morfolojisi ve Gram boyama özelliklerinin yanısıra X ve V faktör (Difco) gereksinimleri ve biyokimyasal reaksiyonları ile tanımlanmıştır. Tanımlanan kökenler polivalan antiserumlar (Difco) kullanılarak doğrulanmıştır. BL varlığına nitrosetine (Cefinase,BBL) diski konularak bakılmıştır. Nitrosetine diskiye kültürden bir miktar sürüldükten sonra pembe –kırmızı renk oluşturan kökenler BL pozitif kabul edilmiştir. Nitrosetin disklerini kontrol etmek amacıyla pozitif kontrol olarak *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, negatif kontrol olarak *H.influenzae* ATCC 10211 kullanılmıştır. Duyarlılık testleri CLSI standartlarına göre *Haemophilus* Test Medium (HTM)(Oxoid)'da disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Bunun için bakterilerin 24 saatlik kültürlerinden 0,5 McFarland bulanıklığına eşdeğer süspansiyonlar hazırlanıp steril eküvyonlarla HTM besiyerini yüzeyine eşit derecede sürülmüş ve kısa sürede ampisilin(10µg), amoksisilin-klavulanik asit (30 µg), sefotaksim (30 µg),levofloksasin (5 µg),trimetoprim-sülfametoksazol (25 µg), eritromisin (15 µg),doksisisiklin (30 µg),sefazolin (30 µg) diskleri yerleştirilmiştir. Plaklar %5 CO2 'li ortamda 35 derecede 18 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Zon çapları CLSI M 100-S21 yorumlama standartlarına göre duyarlı,orta duyarlı ve dirençli olarak yorumlanmıştır.

Dirençli *H.influenzae* kökenlerinin genetik yakınlığın belirlenmesi için rep-PCR (Diversilab, Biomerieux, Fransa) yöntemi kullanıldı. Saf *H.influenzae* kökenleri elde edildikten sonra dört aşamada (manuel DNA ekstraksiyonu; termal döngü cihazında parmak-izi kitleri ile rep-PCR; biyoanalizör ile otomatik mikroakışkan elektroforez; internet tabanlı yorumlama yazılım programı ile hızlı değerlendirme) genotiplendirildi. Kısaca; tüm suşlardan DNA izolasyonu "UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit" (MoBio Laboratories, ABD) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı. Elde edilen DNA ekstraktlarının yeterli olup olmadığı jel elektroforezi uygulanarak kontrol edildi. Uygun şekilde elde edilen tüm DNA

ekstraktlarına “Diversilab™ DNA Fingerprinting Kit” (bioMerieux, Fransa) kullanılarak rep-PCR uygulandı. Bu şekilde örneklerdeki nükleik asitler çoğaltıldıktan sonra “Diversilab™ DNA LabChip Kit”i (bioMerieux, Fransa) kullanılarak mikroakışkan elektroforez yapıldı. Tüm *H.influenzae* kökenlerinin rep-PCR tabanlı parmak izi kalıpları, internet tabanlı yorumlama ve yazılım programı (DiversiLab, version 2.1.66, bioMerieux, Fransa) ile elde edildi. Değerlendirme için benzerlik hesaplarının yapılmasında, DiversiLab yazılımı Pearson korelasyon katsayısı ve UPGMA (Unweighted Pairwise Grouping Mathematical Avenaging; matematiksel ortalamayla ağırlıksız çiftlerin gruplandırılması) yöntemi, rep-PCR profillerini otomatik olarak karşılaştırmak amacıyla kullanıldı. Verilerin analizinde, her bir izolat için jel benzeri görüntü, yüzde benzerlik oranları ve dendrogram raporu oluşturuldu. İzolatlar; ayırt edilemez (benzerlik > %97), benzer(benzerlik %95-97 arasında, 1-2 bant farkı) ve farklı (benzerlik < %95 ve > 2 bant farkı) olarak sınıflandırıldı. Birbirleriyle %95’in üzerinde benzerlik gösteren suşlar ana klon; ana klonlar içerisinde de %97’nin üzerinde benzer klonlar alt tip olarak kabul edildi. Benzerlik oranları %95’in altında olan suşlar ise farklı klon olarak değerlendirildi.

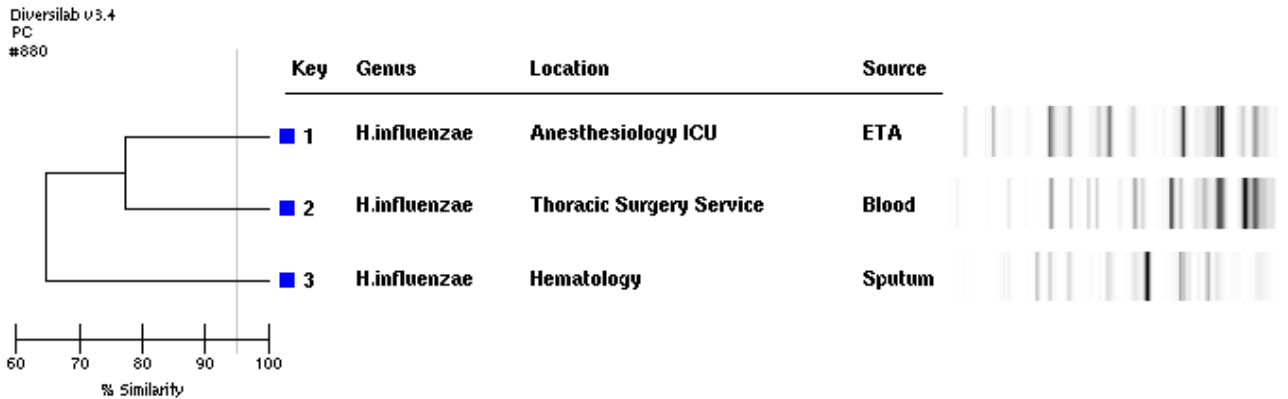
BULGULAR

Kökenler 50 balgam (%54.4), 16 bronkoalveolar lavaj (%17.5) , 16 endotrekeal aspirat (%17.5), 4 kan (%4), 3 kulak sürüntüsü (%3.6), 1beyin omurilik sıvısı(%1), 1 göz sürüntüsü(%1), 1 nazotrakeal aspirat (%1) örneklerinden izole edilmiştir. Elde edilen kökenlerden %3'ünde BL aktivitesi saptanmıştır. Ayrıca bir tane BL negatif ampisilin dirençli köken saptanmıştır. Kökenlerin antibiyotik duyarlılıkları Tablo. 1 'de gösterilmiştir.

Tablo.1 *H.influenzae* kökenlerinin antibiyotik duyarlılıkları

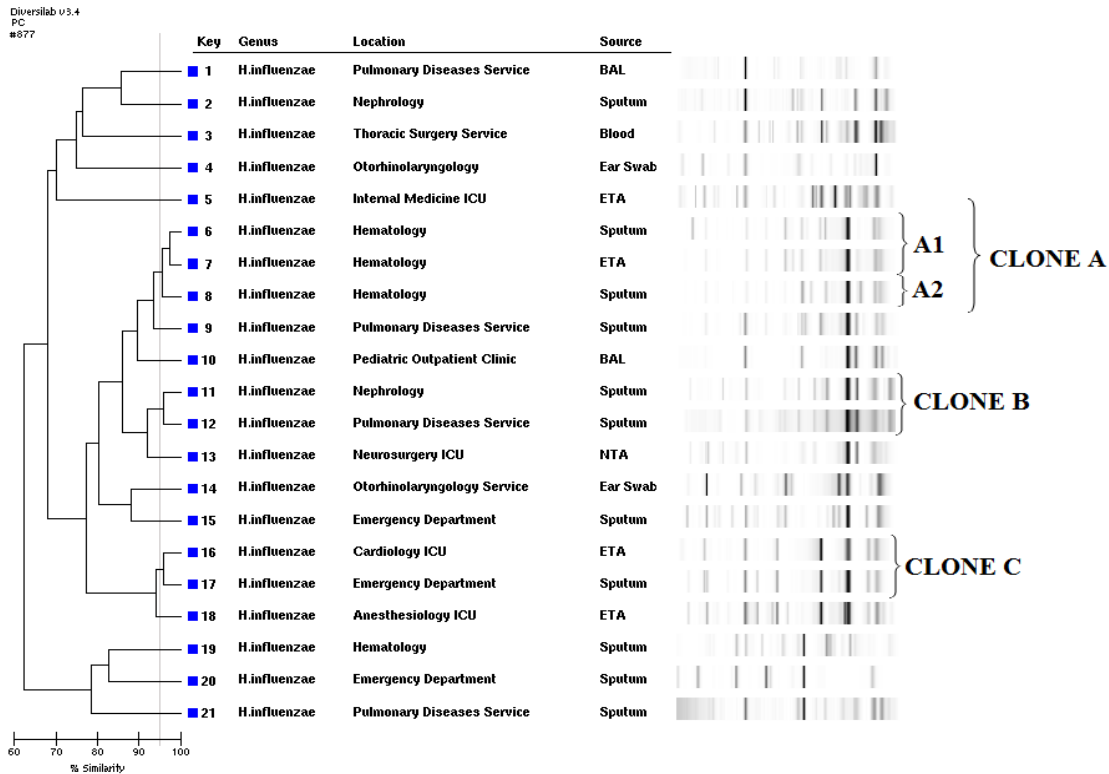
Antibiyotik	Duyarlı	Orta Duyarlı	Dirençli
Ampisilin	88 (%96)	-	4 (% 4)
Amoksisilin-klavulanikasit	91 (% 99)	-	1 (% 1)
Sefotaksim	92 (% 100)	-	-
Levofloksasin	92 (% 100)	-	-
Trimetoprim-sülfametoksazol	69 (% 75)	2 (% 2)	21 (% 23)

BL aktivitesi pozitif olan kökenlerin klonal yakınlıkları incelendiğinde; üç kökenin de hepsinin birbirinden farklı olduğu saptanmıştır(Figure 1).



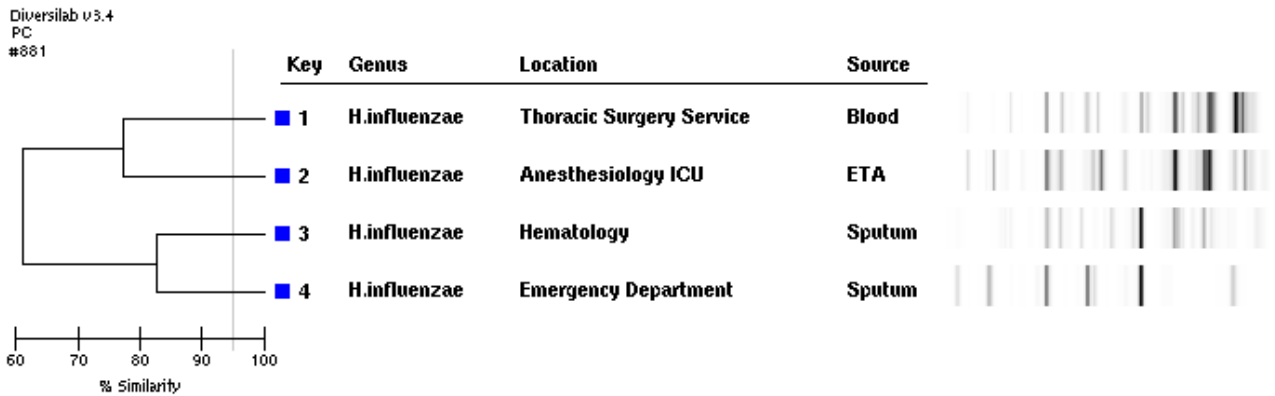
Figür 1. BL aktivitesi pozitif olan kökenlerin klonal yakınlıkları

STX dirençli kökenlerde A,B ve C olmak üzere üç ana klon tespit edilmiştir. A klonunu oluşturan kökenler eş zamanlı hematoloji servisinden izole edilip A1 ve A2 olmak üzere iki farklı alt klon oluşturmuştur(Figure 2).



Figür 2. STX dirençli kökenlerin klonal yakınlığı

Ampisilin dirençli dört kökenin klonal yakınlığı incelendiğinde ise dört kökenin tamamen birbirinden farklı olduğu saptanmıştır(Figure 3).



Figür 3. Ampisilin dirençli kökenlerin klonal yakınlığı

TARTIŞMA VE SONUÇ

H.influenzae enfeksiyon sıklığı ve antibiyotik direnç durumları ülkeler arasında farklılık göstermektedir (9,10). Bölgesel farklılıkların yanısıra tedavideki başarısızlıklar özellikle *H.influenzae* kökenlerinde saptanan beta-laktamaz(BL) varlığına dikkatleri çekmektedir. Bu yöndeki çalışmalar incelendiğinde BL sıklığı Çinde %35.8, Amerika'da (11) %36.4, Brezilya'da (12)%27.6,Yunanistan'da (13)%9.5 olarak bildirilmiştir. Sonuçta farklı bölgelerdeki BL sıklığının önemli ölçüde değişkenlik gösterdiği saptanmıştır.

Ülkemizdeki BL salgılanma sıklığını incelediğimizde Uncu ve ark. (14) yaptıkları çalışmada BL pozitifliğini %3.2, Gönüllü ve ark. (15), % 5.7, Berkiten ve ark. (16) %3 olarak bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda %3 oranında BL varlığı saptanmıştır. BL pozitif üç kökenin klonal yakınlığı incelendiğinde; üç kökenin de benzerliği %95 oranının altında tespit edilmiştir ve bu kökenlerin hepsinin birbirinden farklı olduğu saptanmıştır.

Ampisilin direncinin saptandığı bir diğer mekanizma kökenlerde penisilin bağlayan proteinlerdeki değişimdir. Beta laktamaz negatif ampisilin dirençli (BLNAR) kökenler genellikle düşük oranda (% 0.04 - 2.5) saptanmaktadır (9). Ancak bazı çalışmalarda BLNAR kökenlerinin Japonya ve İspanya' da daha yüksek olduğu bildirilmiştir (17-19). İspanya ' da yapılan ulusal bir sürveyans çalışmasına göre BLNAR kökenleri 1996-1997 yıllarında % 13.5 den 2006- 2007 yıllarında % 0.7 ye düşmüştür. Bu azalışın muhtemel sebebi reçeteleme alışkanlığının değişmesi ve duyarlı klonlarının yayılması olarak yorumlanmıştır (20).

H.influenzae kökenlerinin duyarlılıkları ile ilgili yapılmış dünya çapında pek çok çalışma bulunmaktadır. Bunlardan Park ve ark. (21) 123 *H.influenzae* kökeninin% 26.2 sinde beta laktamaz negatif ampisilin duyarlı (BLNAS), %9'unda beta laktamaz pozitif ampisilin dirençli (BLPAR), %40.2'sinde ise BLNAR köken saptadıklarını bildirmişlerdir. Japonya'da yapılan surveyans çalışmasında % 29.1 BLNAS, %15,4 BLPAR, %30.6 BLNAR kökenlerin saptandığı bildirilmiştir (22). Bizim çalışmamızda üç köken BLPAR, bir köken de BLNAR toplam dört köken de ampisilin direnci saptanmıştır. Bu kökenlerin klonal yakınlığı incelendiğinde de dört kökenin tamamen birbirinden farklı olduğu saptanmıştır.

Son zamanlarda bazı çalışmalarda ise amoksisilin klavunik aside (AMC) de duyarlılığının azaldığı bildirilmektedir. Mekanizması henüz bilinmeyen bu dirençli kökenlerin oranları aslında düşüktür (23). AMC direnci Japonya'da(21) % 24.6 olarak bildirilirken Arabistan'da %1.6 (24) Amerika'da (25) %0.7 olarak bildirilmiştir. Japonya'da 1999-2008 tarihleri arasında yapılan çalışmada AMC direncinin sıklığının yıllara göre arttığı bildirilken izole edilen 23 kökenin klonal yakınlığı incelenmiş ve hepsinin birbirinden farklı özellikte kökenler olduğu saptanmıştır (26). Bu çalışmada bir köken de AMC direnci saptanmıştır.

Sefalosporin direnci kromozomal olup PBP'de meydana gelen mutasyon sonucu ortaya çıkar. Tayland'da yapılan bir çalışmada sefotaksim duyarlılığı %100 olarak bildirilirken sefuroksim duyarlılığı %96.6 olarak bildirilmiştir (27) .Kore'de 582 sağlıklı çocukta kolonizasyon olarak izole ettikleri H influenza kökenlerinde %52.1 oranında sefaklor direncin saptandığı bildirilmiştir (28). Kore'de yapılan bir başka çalışmada solunum yolundan izole edilen *H.influenza* kökenlerinde %46 oranında sefoklor direncinin saptandığı bildirilmiştir (29).Yapılan bu çalışmada sefalosporin grubu antibiyotiklerden Sefotaksim kullanılmış ve kökenlerin hepsinin duyarlı olduğu görülmüştür.

Trimetoprim direnç oranları diğer antibiyotiklerin direnç oranlarıyla kıyaslandığında daha yüksek oranlarda saptanmıştır. Trimetoprim direnci trimetoprim affinitesindeki değişiklik ve dihidrofolat redüktaz enzimlerinin üretimin artmasıyla oluşmaktadır(30). Çin'de yapılan çok merkezli bir çalışmada trimetoprim direnci %47, %54, %35 olarak bulunmuştur (31). Mahd-Zain ve arkadaşları yaptıkları çalışmada *H influenza* kökenlerindeki Trimetoprim direncini ampisilin ve tetrasiklinden sonra üçüncü sırada,

%26.5 oranında bildirmişlerdir (32) . Kuba'da yapılan bir çalışmada ise bazı çalışmaların aksine direnç oranı%51.3 bulunmuştur. Bu çalışmada çeşitli antibakteriyel duyarlılıklarına göre trimetoprim direnci en yüksek oranda bulunmuştur (33). Bizim çalışmamızda da trimetoprim direnci % 23 olarak bulunmuştur . Dirençli kökenler arasında klonal yakınlığı incelendiğinde üç ana klon tespit edilmiştir. A klonunu oluşturan kökenler eş zamanlı hematoloji servisinden izole edilip A1 ve A2 olmak üzere iki farklı alt klon oluşturmuştur. Bu durumda bu üç türün endojen kökenli bulaş olabileceği kanatine varılmıştır. Diğer B ve C klonlarını farklı servis ve farklı örneklerden izole edilen kökenler oluşturmuştur.

Kinolon direnci günümüzde nadir görülmektedir ve dirençten DNA giraz ve topoizomeraz 4 enzimlerini kodlayan genlerde meydana gelen mutasyon sorumlu tutulmaktadır (3). Brezilyada yapılan bir çalışmada levofloksasinin çeşitli bakterilere etkileri araştırıldığında *H influenza* kökenlerinin hepsinin levofloksasine duyarlı bulunduğu bildirilmiştir (34). Japonyada çocuklarda yapılan bir çalışmada ise levofloksasine duyarlılık beş kökende %0.9 oranında azaldığı saptanmıştır (35). Çeşitli merkezlerde yapılan çalışmalarda düşük oranda direnç bildirilirken bizim çalışmamızda da tüm kökenler levofloksasine duyarlı olarak bulundu.

Sonuç olarak antiyotiklere dirençli *H influenza* kökenlerinin dağılımı ülkeler arasında farklılık gösterebildiği gibi ülke içinde bölgelere göre de farklılık gösterebilmektedir. Yapılan bu çalışmada bölgemizde önemli bir direnç sorunuyla karşılaşılmamıştır. Düşük ampisilin direnci ve STX hariç diğer antibiyotiklere duyarlılığın yüksek olması tedavide önemli bir sorunla karşılaşılmayacağı kanatine varılmıştır.

Proje amacına uygun olarak gerçekleştirilmiş ve bu çalışma ile bölgemizdeki *H. Influenzae* suşlarının antibiyotik direnci profilinin belirlenmiş ve klonal yakınlık arasındaki durum saptanmıştır.

KAYNAKLAR

- 1-Dash N, Panigrahi D, Al Khusaiby S, Al Awaidy S, Bawikar S. Acute bacterial meningitis among children < 5 years of age in Oman: a retrospective study during 2000-2005. J Infect Dev Ctries. 2008; (2): 112-5
- 2- MacNeil JR, Cohn AC, Farley M, et al. Current epidemiology and trends in invasive *Haemophilus influenzae* disease-United States 1989-2008. Clin Infect Dis. 2011;53(12):1230-6
- 3-Tristram S, Jacobs MR, Appelbaum PC. Antimicrobial resistance in *Haemophilus influenzae*. Clin Microbiol Rev 2007;20(2):368-89
- 4-Medeiros AA, O'Brien TF. Ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type B possessing a TEM-type beta-lactamase but little permeability barrier to ampicillin. Lancet. 1975;1(7909).716-9
- 5- Hotomi M, et al. 2007. Genetic characteristics and clonal dissemination of beta-lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* strains isolated from the upper respiratory tract of patients in Japan. Antimicrob. Agents Chemother. 51:3969 –76.
- 6- Jacobs MR. 2003. Worldwide trends in antimicrobial resistance among common respiratory tract pathogens in children. Pediatr. Infect. Dis. J. 22:109 –19.

- 7-Farrell DJ, Morrissey I, Bakker S, Buckridge S, Felmingham D. Global distribution of TEM-1 and ROB-1 beta-lactamases in *Haemophilus influenzae*. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56(4):773-6
- 8-Parr TR Jr, Bryan LE. Mechanism of resistance of an ampicillin-resistant, beta-lactamase-negative clinical isolate of *Haemophilus influenzae* type b to beta-lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*. 1984;25(6):747-53
- 9-Jacobs MR, Felmingham D, Appelbaum PC, Grüneberg RN, Alexander Project Group: The Alexander Project 1998–2000: susceptibility of pathogens isolated from community-acquired respiratory tract infection to commonly used antimicrobial agents, *J Antimicrob Chemother* 2003;52(2):229-46.
- 10- Jansen WTM, Verel A, Beitsma M, Verhoef J, Milatovic D: Longitudinal European surveillance study of antibiotic resistance of *Haemophilus influenzae*, *J Antimicrob Chemother* 2006;58(4):873-7.
- 11- Doern GV, Brueggemann AB, Pierce G, Holley HP Jr, 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: results of a national multicenter surveillance study. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41(2):292-7
- 12-Ferreira JA, Castro AC, Rocha MP, Riboldi G, d'Azeyedo PA. Beta-lactamase production *Haemophilus* spp. and resistance to ampicillin in a general hospital in Porto Alegre city, RS, Brazil (2001-2005) *Brazil J Infect Dis*. 2007;11(1):50-2)
- 13- Kofteridis DP, Notas G, Maraki S. Antimicrobial susceptibilities of 930 *Haemophilus influenzae* clinical strains isolated from the island of Crete, Greece. *Chemotherapy*. 2008;54(6):492-8
- 14-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. *Mikrobiyoloji Bülteni* 2007; 41:441-6
- 15-Gonullu N, Catal F, Kucukbasmaci O, Ozdemir S, Torun MM, Berkiten R. Comparison of in vitro activities of tigecycline with other antimicrobial agents against

Streptococcus pneumoniae, *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* in two university hospitals in Istanbul, Turkey. *Chemotherapy*. 2009;55(3):161-7

16-Berkiten R, Gürol SD. Solunum yolu infeksiyonlarından izole edilen *Haemophilus influenzae* suşları ve çeşitli antimikrobik maddelere direnç, *ANKEM Derg* 2001;15(4):718-23.

17- Goto H, Shimada K, Ikemoto H, Oguri T. 2009. Antimicrobial susceptibility of pathogens isolated from more than 10,000 patients with infectious respiratory diseases: a 25-year longitudinal study. *J. Infect. Chemother.* 15:347–60.

18- Hasegawa K, et al. 2004. Rapidly increasing prevalence of beta-lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b in patients with meningitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:1509 –14

19-Sakata H, et al. 2009. Nationwide survey of the development of drugresistance in the pediatric field: drug sensitivity of *Haemophilus influenzae* in Japan. *J. Infect. Chemother.* 15:402– 9.

20- Pe´rez-Trallero E, Martı´n-Herrero JE, Mazo´n A, Garcı´a-Delafuente C, Robles P, Iriarte V, et al. Antimicrobial resistance among respiratory pathogens in Spain; latest data and change over 11 years (1996–1997 to 2006–2007). *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:2953–9.

21- Park C, Kim KH, Shin NY. Genetic Diversity of the *ftsI* Gene in β -Lactamase-Nonproducing Ampicillin-Resistant and β -Lactamase-Producing Amoxicillin-/Clavulanic Acid-Resistant Nasopharyngeal *Haemophilus influenzae* Strains Isolated from Children in South Korea. *Microb Drug Resist.* 2013;19(3):224-30

22- Hasegawa K, Chiba N, Kobayashi R et al. Rapidly increasing prevalence of beta-lactamase-nonproducing, ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* type b in patients with meningitis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48(5): 1509-14

23- Barbosa AR, Giufrè M, Cerquetti M, Bajanca-Lavado MP. Polymorphism in *ftsI* gene and β -lactam susceptibility in Portuguese *Haemophilus influenzae* strains: clonal dissemination of beta-lactamase-positive isolates with decreased susceptibility to amoxicillin/clavulanic acid.

- 24- Abdel-Rahman EM, Ismael NA, Dixon RA Antibiotic resistance and prevalence of beta-lactamase in *Haemophilus influenzae* isolates-a surveillance study of patients with respiratory infection in Saudi Arabia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;36(3):203-8
- 25- Jacops MR, Bajaksouzian S. Evaluation of *Haemophilus influenzae* isolates with elevated MICs to amoxicillin/clavulanic acid. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997;28(3):105-12
- 26- Ito M, Hotomi M, Maruyama Y et al. Clonal spread of beta-lactamase-producing amoxicillin-clavulanate-resistant (BLPACR) strains of non-typeable *Haemophilus influenzae* among young children attending a day care in Japan. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2010; 74(8): 901-6
- 27- Lulitanond A, Chanawong A, Pienthaweechai K. Prevalence of β -lactamase-negative ampicillin-resistant *haemophilus influenzae* isolated from patients of a teaching hospital in Thailand. *Jpn J Infect Dis* 2012;65(2):122-5
- 28- Bae SM, Lee JH, Lee SK, Yu JY, Lee SH, Kang YH. High prevalence of nasal carriage of β -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae* in healthy children in Korea. *Epidemiol Infect* 2012 May 30:1-9
- 29- Bae S, Lee J, Kim E, Lee J, Yu j, Kang Y. Serotype distribution and beta-lactam resistance in *Haemophilus influenzae* isolated from patients with respiratory infections in Korea. *J Microbiol* .2010;48(1):84-8
- 30- De Groot R, Chaffin DO, Kuehn M, Smith AL. Trimethoprim resistance in *Haemophilus influenzae* is due to altered dihydrofolate reductase(s). *Biochem J*. 274 (Pt 3):657-62.
- 31- Shen XZ, Lu Q, Deng L. et al. Resistance of *Haemophilus influenzae* isolates in children under 5 years old with acute respiratory infections in China between 2000 and 2002. *J Int Med Res*. 2007;35(4):554-63

- 32- Mohd-Zain Z, Kamsani NH, Ismail IS, Ahmad N. Antibiotic susceptibility profile of *Haemophilus influenzae* and transfer of co-trimoxazole resistance determinants. *Trop Biomed* 2012;29(3):372-80
- 33- Tamargo I, Fuentes K, Llop A, Oteo J, Campos J. High levels of multiple antibiotic resistance among 938 *Haemophilus influenzae* type b meningitis isolates from Cuba (1990-2002). *J Antimicrob Chemother* 2003;52(4):695-8
- 34- Mendes C, Kiffer CR, Blosser-Middleton RS, et al. Antimicrobial susceptibility to levofloxacin and other antibacterial agents among common respiratory pathogens—a Brazilian perspective from the GLOBAL Surveillance Initiative 2001-2002. *Clin Microbiol Infect*. 2004; 10(6) :521-6
- 35- Ho PL, Chow KH, Mak GC, et al. Decreased levofloxacin susceptibility in *Haemophilus influenzae* in children, Hong Kong. *Emerg Infect Dis* 2004;10(11):1960-2