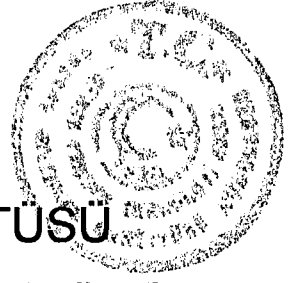


150226

T.C

GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



3-6 YAŞ ARASINDAKİ KREŞ
ÇOCUKLARINDA HAEMOPHILUS
INFLUENZAE PREVALANSININ
ARAŞTIRILMASI

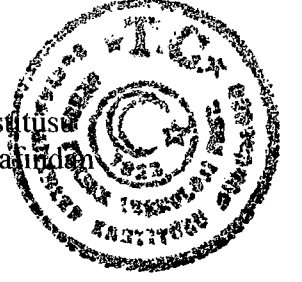
150226

Burçak TUNÇ ÇAKMAK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Prof.Dr.İ.Yavuz SEZEN

GEBZE
2004

Burçak TUNÇ ÇAKMAK'ın tez çalışması, GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 07/06/2004 tarih ve 2004/23 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından BİYOLOJİ Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



JÜRİ

ÜYE
(Tez Danışmanı)

: Prof. Dr. İ. Yavuz SEZEN

ÜYE

:Yrd. Doç.Dr. Aziz TANRISEVEN

ÜYE

: Yrd. Doç. Dr. Murat ÖZDEMİR

ONAY

GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 01/07 /2004 tarih ve 2004/27.sayılı kararı.



İmza / Mühür
Yrd. Doç. Dr. Ahmet ÇAPOĞLU
GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Müdür Yardımcısı



ÖZET

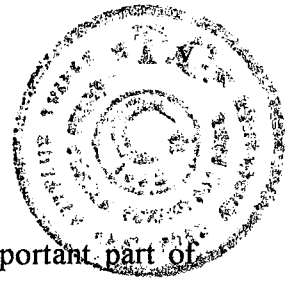
Haemophilus cinsi mikroorganizmalar çocukluk çağında görülen invasive bakteriyel hastalıkların önemli bir bölümünden sorumlu olup enfeksiyon kaynağı da genellikle mikroorganizmayı nasofarinkslerinde taşıyan sağlıklı bireylerdir. Taşıyıcılık prevalansı 6 yaşa kadar olan ve özellikle kreş gibi çocukların toplu halde bulunduğu yerlerde artar.

Bu çalışmada 3-6 yaş arasındaki kreş çocuklarında H.influenzae sıklığının tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Bunun için İstanbul'da seçilen çeşitli anaokullarından 500 çocuktan boğaz kültürü alınarak incelenmiştir. Bu amaçla Brain Heart Infusion Agar ;%7 at kanı, 300mg/lt bacitracin, 5mg/lt vancomycin, 1mg/lt clindamycin içeren çukulata agar kullanılmıştır.

Sonuç olarak 500 çocuk içinde 111 (%22.2)'inde H.influenzae türü bakteri izole edilmiştir. 500 çocuk arasında H.influenzae tip b 64(%12.8) olarak bulunmuştur.

SUMMARY



Microorganisms of genus *Haemophilus* responsible for an important part of invasive bacterial disease seen during childhood period. The source of infection caused by this microorganism is usually healthy children carrying the bacteria in their nasopharynx. The prevalence of carriage is high in children under 6 years.

It was aimed in this study to determine the rate of nasopharyngeal carriage of *Haemophilus influenzae* in children between 3-6 years.

Nasopharyngeal swabs taken from totally 500 children living in İstanbul and attending day care centers.

This swabs were streaked into chocolate agar medium to which 7% horse blood, 300mg/L bacitracin, 5mg/L vancomycin, 1mg/L clindamycin and Brain Heart Infusion agar added.

As a result microorganisms of *H. influenzae* were isolated from 111 (22.2%) children. Microorganisms of *H. influenzae* type were isolated 64 (57.7%) children.

TEŞEKKÜR



Değerli hocam ve danışmanım, Prof.Dr. İ.Yavuz Sezen'e; bana GATA mikrobiyoloji laboratuvarında çalışma imkanı sunan, çalışmamı yakından takip eden ve yardımcı olan Mikrobiyoloji Bölüm Başkanı Prof.Dz.Tbp.Kd.Alb. Tunçer Haznedaroğlu'na, Doç.Dr.Hv.Vet.Alb.Mustafa Özyurt'a, Yrd.Doç.Tbp. Bnb.Nurettin Ardiç'a, Uzm.Dr.Hv.Vet.Kd. Alb Ali Erdemoğlu'na, Tbp.Ütgm. Uğur Demirpek'e, Lab. Pınar Ölmez'e, bütün Mikrobiyoloji çalışanlarına ve manevi desteği için sevgili eşim Dz.Tbp.Ütgm.Selami Çakmak'a çok teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
GRAFİKLER DİZİNİ	x
1.GİRİŞ	1
1.1.Tarihçe	3
1.2.Sınıflama	4
2.HAEMOPHILUS INFLUENZE	5
2.1.Genel Özellikleri	5
2.2.Morfoloji ve Boyanma Özellikleri	5
2.3.Üreme ve Kültür Özellikleri	6
2.4.H.influenzae'nin Üretilmesinde Kullanabilecek Besiyerleri	8
2.5.Dirençlilik	13
2.6.Hücreyel Bileşenler	13
2.7.Antijen Yapıları	15
2.7.1.Kapsül Antijenleri	15
2.7.2.Somatik Antijenleri	16
2.8.Patogeneze	16
2.8.1.Kapsül	16
2.8.2.IgA proteaz	16
2.8.3.Bakteriyosin	17
2.8.4.Endotoksin ve Glikopeptit	17
2.8.5.Fimbrialar ve Diğer Yüzey Adezinleri	18
2.8.6.Lipopolisakkarit ve Dış Membran Proteinleri	18
2.8.7.Nöraminidaz	18
2.8.8.Histamin	18
2.8.9.Transferrin Bağlama Yeteneği	19

2.9. Yaptığı Hastalıklar	19
2.9.1. <i>Haemophilus influenzae</i>	20
2.9.1.1. Tip b Hastalıkları	20
2.9.1.2. Diğer serotipler ve tiplendirilemeyen <i>H. influenzae</i> kökenleriyle oluşan infeksiyonlar	22
2.9.2. <i>H. parainfluenzae</i>	22
2.9.3. <i>H. aphrophilus</i>	23
2.9.4. <i>H. paraphrophilus</i>	23
2.9.5. <i>H. aegyptius</i>	23
2.9.6. <i>H. haemolyticus</i> ve <i>H. parahaemolyticus</i>	23
2.9.7. <i>H. haemoglobinophilus</i>	24
2.9.8. <i>H. paraaphrohaemolyticus</i>	24
2.9.9. <i>H. pleuropneumonia</i>	24
2.9.10. <i>H. segnis</i>	24
2.9.11. <i>H. ducreyi</i>	24
2.10. İmmünite	24
2.11. <i>H. influenzae</i> 'nin Tiplendirilmesi	25
2.12. Tedavi ve Korunma	30
2.13. Kolonizasyon, Taşıyıcılık ve Epidemiyoloji	32
3. MATERYAL VE METOT	38
3.1. Materyaller	38
3.1.1. Besiyerleri	38
3.1.2. Antiserumlar	39
3.1.3. X, V, X+V Faktörleri İçeren Diskler	39
3.1.4. Kullanılan Diğer Gereçler	40
3.1.5. Örneklerin İncelenmesi	40
4. BULGULAR	43
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇLAR	62
KAYNAKLAR	63

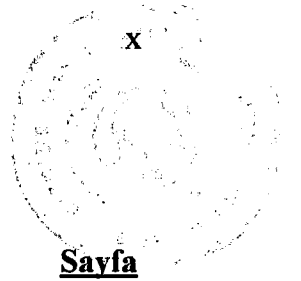
TABLolar DİZİNİ

Tablo

Sayfa

1.1. İnsanlarda ve hayvanlarda bulunan Haemophilus türleri	4
2.1. H.influenzae'nin biyokimyasal özellikleri	12
2.2. H.influenzae'nin farklı serotiplerinin kimyasal özellikleri	15
2.3. H.influenzae ve H.parainfluenzae'nin biyotiplendirilmesi	28
4.1. Seçilen 500 çocuğun yaş ve cinsiyete göre dağılımı	43
4.2. Nasofarinks kültür sonuçları	43
4.3. Boğaz kültürü değerlendirilen çocukların cinsiyete ve yaşa göre dağılımı	43
4.4. Elde edilen H.influenzae suşlarının serotiplere göre dağılımı	44
4.5. Tespit edilen serotiplerin yaş ve cinsiyete göre dağılımı	45

GRAFİKLER DİZİNİ



Grafik

Sayfa

4.1. İzole edilen H.influenzae suşları içinde herbir serotipin dağılımı	44
4.2. 3 yaşındaki kız çocuklarında tespit edilen H.influenzae serotiplerinin 3yaş grubu içindeki yüzde dağılımı	46
4.3. 3 yaşındaki erkek çocuklarında tespit edilen H.influenzae serotiplerinin 3yaş grubu içindeki yüzde dağılımı	46
4.4. 4 yaşındaki kız çocuklarında tespit edilen H.influenzae serotiplerinin 4yaş grubu içindeki yüzde dağılımı	47
4.5. 4 yaşındaki erkek çocuklarında tespit edilen H.influenzae serotiplerinin 4yaş grubu içindeki yüzde dağılımı	47
4.6. 5 yaşındaki kız çocuklarında tespit edilen H.influenzae serotiplerinin 5yaş grubu içindeki yüzde dağılımı	48
4.7. 5 yaşındaki erkek çocuklarında tespit edilen H.influenzae serotiplerinin 5yaş grubu içindeki yüzde dağılımı	48
4.8. 6 yaşındaki kız çocuklarında tespit edilen H.influenzae serotiplerinin 6yaş grubu içindeki yüzde dağılımı	49
4.9. 6 yaşındaki erkek çocuklarında tespit edilen H.influenzae serotiplerinin 6yaş grubu içindeki yüzde dağılımı	49
4.10. Hib suşlarının yaşlara göre dağılımı	50

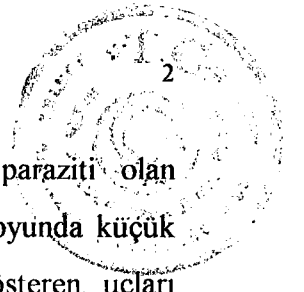


1.GİRİŞ

Sağlıklı kişilerin üst solunum yolunda organizmaya zarar vermeksizin yaşayan mikroorganizma topluluğuna üst solunum yolu normal florası denir. Üst solunum yolu normal florasında nonhemolitik ve alfa hemolitik streptococcus, Neisseria, Staphylococcus, Difteroid, Haemophilus türleri ve Pneumococcuslar bulunur. Flora dengesi bozulmadığı sürece zararsız olan bu bakteriler, vücut direncinin azalması ve immunosupresif kemoterapi gibi çeşitli faktörler sonucu enfeksiyonlara yol açabilirler. Belirli şartlarda bu bakterilerden bazıları özellikle S.pyogenes, S.pneumoniae ve Haemophilus influenzae çeşitli süpüratif enfeksiyonlara yol açarlar. (Anonym.MMWR,1997, Mastro T.et al,1993)

Üst solunum yolları enfeksiyonları arasında en sık rastlanan soğuk algınlığıdır. Diğerleri ise akut farinjit, tonsillit, faringokonjiktival ateş, akut epiglottittir. Soğuk algınlığı solunum yolunun primer viral enfeksiyonudur. Hastada rinit, boğazda kuruluk ve irritasyon gibi farengeal semptomlar görülür. Rhinoviruslar %15-30, Coronaviruslar %10, Myxo ve Paramyxoviruslar %10-15, diğer viruslar %2 ve bilinmeyen viruslar ise %25-40 oranında soğuk algınlığına sebep olurlar. Viral enfeksiyonlar sıklıkla konak direncini azaltarak normal floradaki patojen bakterilerin mukozaya invazyonu sonucu sekonder bakteriyel enfeksiyonları geliştirebilirler. (Mackowiak PA,1982, Takal AK. et al,1993)

A grubu β hemolitik streptococcus(%32), H.influenzae(%18-24), diğer bakteriler (%6.5), Rhinovirus(%18.4), Coronavirus(%4.6), Adenovirus(%6), Herpes simplex virus(%2), Mycoplasma pneumoniae(%3) sıklıkla akut farenjite sebep olurlar. Akut farenjit vakalarının %30-40'ında ise patojenik ajan tespit edilememektedir. Bu belirsiz patojenler, bilinmeyen viruslar veya Chlamydia grubunda yer alan Chlamydia'lar olabilir. Major bakteriyel ajan olan Streptococcus'ların sebep olduğu farenjit daha çok 5-15 yaş grubunda , kalabalık yerlerde ve soğuk aylarda görülür. H.influenzae ise özellikle 3 ay-6 yıl dönemde bebek ve çocuklarda sıklıkla nazofarenjite neden olur. Buradan doku yayılımı ve hematojen yolla çeşitli komplikasyonlar (otitis media, sinüzit, menenjit gibi) gelişebilir.(Mastro T.et al,1993, Mackowiak PA,1982)



İnsan üst solunum yolu, mukoz membranlarının zorunlu paraziti olan *Haemophilus* genusu üyeleri , yaklaşık 0,3-0,5µm en ve 0,5-2,0µm boyunda küçük kokobasilden, uzun filamentöz yapılara kadar değişebilen morfoloji gösteren, uçları yuvarlak , ikişerli veya kısa zincirler halinde bir kısmı ise lökositler tarafından fagosite edilmiş olarak görülürler.(Gerald L.et al,1999,Mamal M,1986,Ralph D.et al,1998, Samuel L.et al,1998, Sarah S.et al,1999) Gram boyamada Gram negatif olan bakteriler, hareketsiz ve sporsuzdurlar. Organizmadan yeni izole edildiklerinde ve zengin besiyerlerinde yapılan kültürlerinde kapsül bulunur. Genusun pekçok üyesi saprofit ve fırsatçıdır.

Üst solunum yolları florasına katılan *H.influenzae* bebeklik ve çocukluk döneminde görülen menenjit, üst solunum yolu enfeksiyonları , akut otitis media ve pnömoni gibi çeşitli enfeksiyonların major etkenlerinden biridir. Erişkinlerde de *H.influenzae* enfeksiyonları pnömoni ve kronik akciğer hastalıkları başta olmak üzere sıklıkla bildirilmektedir. (Campos JM,1995;Mamal M,1986)

Çocuklarda özellikle 3 ay-6 yaş arası dönemde görülen menenjitlerin yaklaşık %50'sinden *H.influenzae* sorumludur ve vakaların %95'inde kapsüllü *H.influenzae* tip b etkindir.Sağlıklı çocukların %10-100'ü bu organizmayı boğazında taşır. Taşınan bu suşların %75-95' i tiplendirilemeyen (kapsülsüz) olup sadece %5-25 'i kapsüllü suşlardır. Kapsüllü suşların da yarısı serotip b'dir. Yaş arttıkça daha az oranda nasofarinkste bulunmaktadır.(Campos JM,1995)

Çocukların toplu olarak bulunduğu kreş ve okul gibi yerlerde *H.influenzae* taşıyıcılığı yaygındır ve aylarca sürebilir. Yaş, sosyo-ekonomik durum, yetersiz beslenme ve uygun olmayan hijyenik şartlar insidans artımında etkili diğer faktörlerdir. Nazofarengeal taşıyıcıların taranması hem epidemiyolojik incelemeler hem de risk altındaki bireylerin tespit edilmesi bakımından gereklidir.(Barbour ML.et al,1996; Akçakaya N.et al,1994;Er E. et al, Vahaboğlu MH.et al,1994; Granoff DM.et al,1980; Jawetz E.et al,1989;Granoff DM.et al,1979)

H .influenzae ile oluşan enfeksiyonlar dünyanın her yerinde görülmektedir. Son yıllarda gelişen laboratuvar teknikleri sayesinde *H. influenzae*'nin gerçek

insidansının daha önce bildirilenlerden 4 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. (Barbour ML.et al,1996)



Bu çalışmamızda İstanbul Anadolu yakasında 3-6 yaş arasındaki kreş çocuklarında görülen üst solunum yolu enfeksiyonları ile menenjitlerin sebebi olan H.influenzae'nin görülme sıklığı araştırılacaktır.

1.1.Tarihçe

Robert Koch 1883 yılında Mısır'da konjuktivitli hastaların konjuktival eksudalarında Haemophilus benzeri organizmalar tanımlamıştır. Bu bakteri 1887'de New York'lu Dr.Weeks tarafından üretilmiştir.(Konemann E.et al,1992;Mamal M,1995) Koch-Weeks basili denilen bu bakteriye bugün H.aegyptius denilmekte ve H.influenzae tip I olarak bilinmektedir. Kretz'in Pfeiffer basili bulunan deney tüpünü elinde kırması ile meydana gelen enfeksiyon sonucu ciddi bir gribe tutulmuş olması , yine bu bakteri ile çalışırken pipetten kültür yutan 4 şahıstan 2'sinin tipik grip göstermesi, H. influenzae'nin epidemik influenza etkeni olarak kabulüne sebep olmuştur.

1889-1892 yılları arasında grip pandemisi sırasında R.F.J. Pfeiffer epidemik influenzadan yakınan hastaların balgamlarından elde ettiği küçük Gram negatif hemolitik kokobasillerin hastalığın etkeni olduğunu bildirmiştir. Pfeiffer 1892'deki influenzae pandemisi sırasında ölen hastaların balgam örnekleri ve akciğer dokularından H.influenzae'yi elde etti. Bu dönemde influenza etkeni olarak kabul edilen H.influenzae'nin 1933'de influenza virüsünün keşfinden sonra, ancak ikincil bir etken olabileceği anlaşılmıştır.(Bergeron MG.et al,1987; Bilgehan H,1995;Slack MPE,1990) 1899'da Slawyk ve 1911'de Cohen de menenjitli hastaların beyin omurilik sıvılarından H.influenzae'yi ürettiler.

Haemophilus influenzae bakterisinin , influenza etkeni olmayıp ayrı bir bakteri olmasının saptanmasından sonra Margaret Pittman 1930 yılında, kapsüllü Haemophilus influenzae'nin kapsüler polisakkaridindeki farklılıkları baz alarak a'dan f'ye olmak üzere 6 serotip tanımlanmıştır. (Mamal M,1986)

Killian 1976'da *H. influenzae*'nin 6 biyotipini tanımlamış ve çeşitli biyotiplerin kapsül antijeninin varlığı ve yokluğuyla ilişkili olduğunu bildirmiştir. Daha sonra bunlara biyotip VII ve VIII ilave edilmiştir. (Turk DC, 1984)

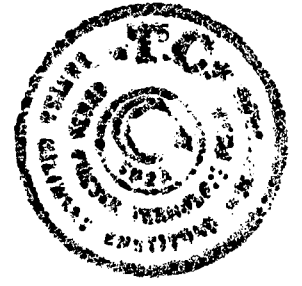


1.2.Sınıflama

Bu bakterinin eritrositlerden sağlanabilecek büyüme faktörlerine ihtiyaç duyması nedeni ile jenerik isim olarak *Haemophilus* 'kan seven' adı verilmiştir. *Haemophilus*lar, *Pasteurella* ve *Actinobacillus* ile birlikte *Pasteurellacea* ailesi içinde yer alırlar. *Haemophilus* kökenlerinin insanda yerleşen 10 türü ve bunun yanında hayvanlarda bulunan 9 türü vardır. Son yıllarda *Actinobacillus* *Actinomycetemcomitans*'ı *Haemophilus*'ların içine dahil eden yeni bir görüş ortaya atılmıştır. *Haemophilus* cinsinde insanla ilgili birçok tür bulunmakla beraber, *H. influenzae* özellikle çocuklarda sebep olduğu hastalıklar bakımından en önemli türdür. (Konemann E. et al, 1992; Baron EJ et al, 1990; Baysallar, 1995; Howard BJ, 1987)

Tablo.1. 1. İnsanlarda ve hayvanlarda bulunan *Haemophilus* türleri

İnsandaki türler	Hayvanlardaki türler
1) <i>H. influenzae</i>	1) <i>H. equigenitalis</i> (at)
2) <i>H. parainfluenzae</i>	2) <i>H. somnus</i> (sığır)
3) <i>H. haemolyticus</i>	3) <i>H. parasuis</i> (domuz)
4) <i>H. parahaemolyticus</i>	4) <i>H. paragallinarum</i> (kümes hayvanı)
5) <i>H. aphrophilus</i>	5) <i>H. paracuniculus</i> (koyun)
6) <i>H. paraaphrophilus</i>	6) <i>H. agni</i> (koyun)
7) <i>H. paraphrohaemolyticus</i>	7) <i>H. haemoglobinophilus</i> (köpek)
8) <i>H. aegyptius</i>	8) <i>H. pleuropneumonia</i> (domuz)
9) <i>H. avium</i>	9) <i>H. segnis</i> (kümes hayvanı)
10) <i>H. ducreyi</i>	



2.HAEMOPHILUS INFLUENZAE

2.1.Genel Özellikleri

Haemophilus influenzae küçük, hareketsiz, spor oluşturmayan, üreme için çeşitli besin ihtiyaçları olan kabaca 0,3-0,5µm en ve 0,5-2,0µm boyunda Gram negatif bir bakteridir. Morfolojik olarak kokobasilden filamentli çomaklara değişen bir çeşitlilik gösterdiğinden pleomorfik olarak anılır.^{17,20} Haemophilus ailesi, insanda, üst solunum yolları florasının normal bir üyesi olarak kabul edilmektedir. H.influenzae, erken çocukluk döneminde (3 ay-6yıl) akut bakteriyel menenjit, bakteriyemi, üst solunum yolu enfeksiyonları, pnömoni, artrit, konjunktivit ve akut otitis media gibi çeşitli enfeksiyonlara sebep olur. Erişkinlerde de özellikle kronik bronşit ve pnömoni etkenidir. (Wives M.et al ,1997 ;Jawetz E.et al,1989)

Kapsüllü ve kapsülsüz formlar olmak üzere iki ayrı sınıfa ayrılmış olup, kapsüllü formlar invazif hastalıklara sebep olurken , kapsülsüz formlar Pfeiffer'in influenzae'den ölen hastaların boğaz mukozalarında tanımladığı bakterilerdir. (Gerald L.et al,1990,Ralph D. et al,1998, Sarah S.et al,1999, Samuel K.et al,1998)

Kapsüllü suşlar içinde özellikle H.influenzae tip b, septisemi, menenjit, septik artrit, epiglottit, pnömoni ve ampiyem gibi invazif hastalıklara sebep olabilir. Diğer Haemophilus türleri arasında H.influenzae (biyogrup aegypticus), H. ducreyi (yumuşak şankır), H. parainfluenzae, H.segnis ve H.aphrophilus sayılabilmekle beraber bu etkenler insanda daha nadir hastalık yapmaktadır.(Ralph D.et al,1998)

2.2.Morfoloji ve Boyanma Özellikleri

Haemophilus influenzae; hareketsiz, sporsuz, fakültatif anaerob, gram negatiftir;uçtan boyanma gösterebilmektedir. Gram boyama işleminde renk gidermeye dikkat edilmediğinde gram labil boyanıp hatalı olarak pnömokoklarla karıştırılabilir.(Mastro T.et al,1993) Loeffler'in metilen mavisi ile 5 dakika veya dilue karbon fuksin (1/10) ile 10 dakika boyama da uygundur.

H. influenzae, yaklaşık 0,3-0,5µm en ve 0,5-2,0µm uzunluğunda olan kokobasil görünümünde, uçları yuvarlak, ikişer ikişer ya da kısa zincirler halinde veya kümeler yapmış şekilde, bir kısmı lökositler tarafından fagosit edilmiş olarak görülürler. Çoğu kez uçları da yuvarlak olduğundan buna Pfeiffer'in kokobasili de denir. 6-8 saatlik kültürlerde bu şekiller hakimdir. Optimum üreme koşullarında genç kültürlerde kokobasiller hakim olmasına rağmen diğer morfolojik şekillere de rastlanır. Bazı kültürlerde kokobasiller şeklinde bazen de filamentöz şekil dahil olmak üzere pleomorfik şekilde görülürler. (Samuel L. et al, 1998; Ralph D. et al, 1998; Gerald L. et al, 1999)

H. influenzae'nin morfolojisi kültür ortamından çabuk etkilenir. Kültür eskidikçe filamentöz şekillere daha sık rastlanır. Sıvı kültürlerde filamentöz şekiller daha sık gözlenir ve sıvı kültürlerde zincir yapma eğilimindedirler. (Samuel L. et al, 1998; Ralph D. et al, 1998; Gerald L. et al, 1999)

Kapsüllü ve kapsülsüz tipleri de bulunmakta olup kapsül patogeneizde önemli bir rol oynar. Organizmadan yeni izole edildiklerinde ve zengin besiyerlerindeki kültürlerde belirgin bir kapsül vardır. Yeni kültürlerde (6-8 saatlik) kolaylıkla gözlenebilen kapsül, 24 saatlik inkübasyonda otolitik enzimlerle hızla eritilir ve kaybolur. (Baysallar M, 1995) Eski kültürlerde, balgam ve kulak aspiratlarında basiller kapsülsüzdür ve daha uzun (10-20 µm) filamentöz yapı gösterirler. Sıvı besiyeri kullanılan kültürde kapsül daha erken kaybolur.

2.3. Üreme ve Kültür Özellikleri

H. influenzae'nin üretilmesinde önemli sorunlar vardır. Kültür ortamının yanı sıra materyalin alınmasında ve transferinde yapılan hatalar, ayrıca solid ortamda *Haemophilus* türlerinin morfolojik benzerliği ve alınan örnekte diğer bakterilerin de olması yanlış sonuçlar elde edilmesine neden olur. (Howard BJ, 1987)

H. influenzae fakültatif anaerob bir bakteridir. Havasız şartlarda çok zayıf ürer.

En iyi üreme 35-37 °C'de, pH 7.4-7.8 arasında ve aerob şartlarda olur. Primer izolasyon için üremeyi artırıcı etkisinden dolayı %5-10 CO₂'li ortam uygundur. *H.influenzae* hem aerobik hem de anaerobik ortamda üreyebilir. Aerobik üreme için faktör X ve V olarak bilinen iki faktör gerekirken, anaerobik üreme için sadece faktör X gereklidir.(Mamal Torun M,1995;Broude AL,1985)

Haemophilus grubu bakterilerin hemofilik yapısı kanda bulunan bir veya iki faktörü sentez edememelerine bağlıdır. Isıya dirençli olan X faktörü ve ısıya duyarlı olan V faktörü diye adlandırılan iki üreme faktörü tanımlanmıştır. *H.influenzae* hem V hem de X faktörüne ihtiyaç gösterirken, diğer bakterilerin çoğu bir faktöre ihtiyaç gösterirler.

Bazı *haemophilus* türleri, bir grup ısıya dirençli tetrapirrol bileşiğinden oluşan X faktörüne ihtiyaç duyar. Bu tetrapirrol bileşiklerinin kaynağı hemin ve hematin gibi Fe(demir) içeren pigmentlerdir. Bu bileşikler katalazların, peroksidazların ve elektron transport zincirinin sitokromlarının sentezinde kullanılırlar.Yani X faktörü, aerobik solunum enzimleri sitokrom, sitokrom oksidaz, katalaz ve peroksidaz sentezinde kullanılan, eritrositlerden kolayca yayılabilen hematindir. Faktör X ısıya dayanıklı demir içeren pigmentlerden sağlanabilir. Protoporfirin IX kaynağı olan hem ve hemoglobinden başka, tetra-pirrol bileşiklerini veren diğer Fe(demir) protoporfirinleri de X faktörü yerine geçebilir. *H.influenzae*'nin X faktörüne ihtiyacı δ -amino-levulinic asitten protoporfirini oluşturmamasından ileri gelmektedir. X faktörü sıradan bir kanlı agar içerisinde bulunur.(Mamal Torun M.et al,1995;Konemann E.et al,1992;Mamal M,1995)

Çoğu *haemophilus* türleri de NAD(koenzim I) veya NADP(koenzimII)'den oluşan V faktörüne ihtiyaç duyar. Önceleri vitamin olduğu düşünülerek V harfi ile adlandırılmış olup daha sonra bu maddenin nikotinamid adenin dinükleotid (NAD), nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADP) ve nikotinamid nükleozidler olduğu belirlenmiştir. Oksido-redüksiyon olayına katılan V faktörü; NAD ve NADP, iki dehidrogenazdan birinin yerine geçer. V faktörü hücre stoplazmasında hücre alıcısı olarak kullanılır. V faktörü ısıya dirençsizdir.120 °C'de birkaç dakikada etkisiz hale gelmektedir. Kanlı besiyerinde V faktörü bozulmamış alyuvarların içinde bulunmaktadır. Fakat üremenin olabilmesi için serbestleşmesi gerekir. Bu nedenle

standart kanlı agar besiyeri *H.influenzae* üretmek için yetersiz bir besiyeridir. Halbuki 80-90 °C'ye kadar ısıtılan kanlı besiyerinde eritrositlerin parçalanmasıyla açığa çıkar ve böylece *H. influenzae*'nin üremesine daha uygun hale gelir. Bazı hayvanların kanında V faktörünü yavaşça hidrolize eden NADaze enzimi bulunmaktadır. Fakat ısıtma sonucu kanda bulunan V faktörünü inaktive eden enzimler de etkisiz hale gelir. (Konemann E.et al,1992; Mamal M,1995; Baron EJ.et al,1990; Mamal Torun M.et al,1995; Campos JM;1995; Mamal Torun M,1995; Moxon ER,1990)

V faktörü mayalarda, patatest ve domates suyunda da bulunmaktadır

Optimal üreme ya ısıtma yoluyla eritrositlerden zenginleştirilmiş besiyerinde (örn; çukulatamsı agar) ya da peptik sindirimle eritrositlerden zenginleştirilmiş besiyerleriyle (örn; Fildes besiyeri) olur.

2.4.H.influenzae'nin Üretilmesinde Kullanılabilecek Besiyerleri

H.influenzae'nin izolasyonunda birçok besiyeri ve teknikleri kullanılmaktadır. Casman's blood agar, Levinthal agar, Haemophilus isolation agar besiyeri, Fildes'in zenginleştirilmiş besiyeri, Trans izolate besiyeri ve satellit tekniği gibi.

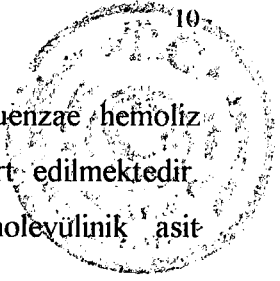
H.influenzae adi besiyerlerinde veya serumlu besiyerlerinde ürememektedir. Alışılmış kanlı agar besiyeri bu bakterilerin üretilmesi için uygun değildir. Bu besiyerindeki V faktörünün eksikliği bakterinin taze kanlı agar besiyerinde üremesine izin vermez. Bu problemin üstesinden gelmek için basit bir yol kanlı agarı çukolata rengine dönüşüncüye kadar yaklaşık 75 °C'de ısıtarak çukulatamsı agara dönüştürmektir. Çukulatamsı agarda hem X hem de V faktörleri bulunur ve kolayca hazırlanabilme üstünlüğüne sahiptir. (Konemann E.et al,1992; Mamal M,1995; Baron EJ.etal,1990)

Isıtma işlemi eritrositlerdeki V faktörünün serbest kalmasını sağlar ve aynı zamanda kanda mevcut olan NADaze'ı inaktive eder. Bu NAD'yi inaktive eden maddelerin yapısı ve ısıya hassasiyeti kanın elde edildiği hayvanın cinsine göre değişir. Koyun, keçi, sığır ve insan kanında NAD'yi inaktive eden NADaze enzimini tanımlanmış. Fakat fare, tavşan ve kobay kanında bulunmadığı bildirilmiştir. At kanının da Haemophilus cinsi bakterilerin üremesi için uygun olduğu bildirilmiştir. Çünkü o da NADaze içermez. (Konemann E.et al,1992;Mamal M,1995;Baron EJ.etal,1990;Mamal Torun M.et al,1995))

Levinthal agar ve Fildes besiyeri Haemophilusların izolasyonu için elverişli besiyerleridir. Levinthal besiyeri ve kanın peptik sindirimi ile hazırlanan Fildes besiyerinin renksiz ve saydam olması, kapsüllü ve kapsülsüz kolonileri ayırt etmede faydalıdır. Levinthal besiyeri için içerisinde %5 defibrine kan bulunan agar sürekli çalkalanarak kaynama noktasına kadar ısıtılır ve presipitat oluştuktan sonra üst sıvıdan hazırlanır. Özellikle serebrospinal sıvı kültürü için bu besiyeri tavsiye edilir.Fildes zenginleştirilmiş besiyeri, koyun kanının sindirilmiş peptik özeti tyripticase soy agar ve beyin kalp infüzyon agarına katılmasıyla hazırlanır. Sindirilmiş peptik NADazeleri yok eder ve V faktörünü eritrositlerden ayırır.(Hirschmann JV.et al,1979; Powell M.et al,1987;Prober CG.et al,1982)

H. influenzae'nin Levinthal'ın kaynamış kanlı agarındaki kültüründe S kolonileri küçük, düz kenarlı, homojen, opak, yüzü sümüksü, şebnem tanelerine benzeyen bir şekildedir. Mukoid, kapsüllü olan koloniler arkadan oblik yönde ışık geçirildiğinde karakteristik pırıltılı refle verir. Kapsülün sıklıkla kaybından dolayı mukoid koloniler R koloniler haline döner ve refle kaybolur. (Hirschmann JV.et al,1979; Powell M.et al,1987)

Çukulatamsı agarda 1mm çapında koloniler ancak iki günde belirir. Kapsüllü şekillerin kolonileri sümüksüdür. Çikolata agardaki kolonileri grimtrak, yarı opak, çiğ tanesi gibi, düz kenarlı ve konveksdir. S şekillerinden başka R şekilleri de vardır. R şekilleri daha ufak, mavimsi, saydam veya hafif opak kolonilerdir.(Konemann E.et al,1992;Mamal Torun M.et al,1995;Campos JM,1995;Mamal Torun M,1995;Prober CG,1982)

Bazı *Haemophilus* türleri hemolitik zon gösterirler. *H.influenzae* hemoliz yapmaz. Bu sayede *H.haemoliticus* ve *H.parahaemoliticus*'dan ayırt edilmektedir. *H.influenzae* at kanlı agarda hemoliz yapmaması ve bir aminolevulinik asit substratından, porfirin üretmemekle de ayrılabilir. 

Grassberg 1897 yılında *H.influenzae* kolonilerinin bazı bakterilerin özellikle *Stafilokok* kolonilerinin yanında daha iyi ürediğini belirleyip bu etkinin diğer bakteriler tarafından oluşturulan ısıya duyarlı maddelerin besiyerine difüzyonu ile olduğunu öne sürmüştür. Meuneier 1898 yılında bu olaya 'satellizm' adını vermiştir. Daha sonraki çalışmaları *H.influenzae*'nin iki önemli büyüme faktörüne ihtiyaç duyduğu ve bunlardan birinin hemoglobin türevi ile *stafilokok* kolonilerinden difüze olan bir faktör olduğunu gözlemişlerdir. Eritrositlerde bulunan ısıya duyarsız büyüme faktörüne X faktörü ve ısıya duyarlı vitamin benzeri büyüme faktörüne V faktörleri adı verilmiştir. *Haemophilus* olduğu şüpheli örnek, koyun kanlı agara paralel çizgiler halinde ekilir. *S.aureus* bunları kesecek şekilde yukarıdan aşağı doğru dik olarak ekilir. *Haemophiluslar* *S. aureus* yakınında çığ tanesi gibi koloniler şeklinde, biraz uzağında ise küçük koloniler şeklinde belirir.(Campos JM,1995;Mamal Torun M,1995;Unat Ek)

Solunum yolundan alınan *H. influenzae*'nin ayrımı için; normal solunum yolu florasının diğer üyelerini inhibe eden maddelerin ilavesi ile hazırlanan selektif besiyerleri de vardır.

%1 hemin, 10µg/ml NAD ve %1 izovitalex ile zenginleştirilmiş %5 at veya koyun kanlı BHIA (Brain Heart Infusion Agar) ve TSA (Tyryptic Soy Agar) ile *H.influenzae*'nin izolasyonu son derece uygundur. Boğaz sürüntülerinde değişik bakteriler bulunduğundan besiyerine Basitrasin 300mg/lt ilave etmek gerekir.(Campos JM,1995;Möller LVM:et al,1993)

İçerisinde yeast dialystate(%2), vancomycin(5mg/lt), basitrasin(300mg/lt), clindamycin(1mg/lt) ve amphotericin-B(1mg/lt) bulunan %7 at kanlı BHIA ile hazırlanan çikolata agar ile iyi sonuçlar elde edilmiştir. Bacitracinin tek başına seçici ilaç olarak kullanılmasının uygun olmadığı ileri sürülmüştür. (Campos JM,1995;Möller LVM:et al,1993)

Alternatif olarak; bacitracin ve H.influenzae tip b antiserumu ilavesi ile hazırlanan Levinthal agar ile yine bacitracin, H. influenzae tip b antiserumu, NAD,hemin ve maya özütü ilavesi ile zenginleştirilmiş Columbia agarı geliştirilmiştir. Bu besiyerinin kullanımı ile 48 saat sonrasında presipitasyon halesi ile çevrilen H.influenzae tip b kolonilerinin saptanması daha kolaylaşmıştır. (Campos JM,1995;Möller LVM:et al,1993;Unat EK)

Nitratları nitritlere veya azota kadar redükler. Oksidaz ve katalaz reaksiyonları pozitifdir. Karbonhidratları fermentleyerek etkileyebilirler. DNA'nın G+C oranı %37-44 Tm'dür.

Tablo2.1.'de Haemophilus türlerinin biyokimyasal özellikleri görülmektedir.(Bilgehan H,1995;Baron EJ,et al,1990;Baysallar M,1995;Campos JM,1995)



Tablo.2.1. Haemophilus Türlerinin Biyokimyasal özellikleri

Haemophilus türleri	ALA → Porfirin	X faktör	V faktör	İndol	Üreaz	Ornitin dekarboksilaz	H ₂ S	Hemoliz	Glukozdan asit	Glukozdan gaz	Sükroz	Laktoz	Ksiloz	Mannitol	Dekarboksilaz	P-Galaktozidaz	α-Galaktozidaz	Katalaz	Oksidaz	CO ₂ ihtiyacı	Alkalen fosfataz	Nitrat reduksiyonu
H. influenzae	-	+	+	D	D	D	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+
H. haemolyticus	-	+	+	D	+	-	+	+	+	D	-	-	D	-	+	-	-	+	+	-	+	+
H. haemoglobinophilus	-	-	+	+	-	-	D	-	+	-	+	-	+	+	D	D	-	+	+	-	-	+
H. ducreyi	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
H. parainfluenzae	+	-	+	D	D	D	+	-	+	D	+	-	-	-	-	D	-	D	+	-	+	+
H. paraphrophilus	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	D	-	+	D	+	+
H. aphrophilus	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	D	-	-	-	D	+	+
H. segnis	+	-	+	-	-	-	-	-	W	-	W	-	-	-	-	D	-	W	-	-	+	+
H. pleuropneumoniae	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	D	D	-	+	+
H. paragaillinarum	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	D	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
H. Parahaemolyticus	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	D	-	-	-	+
H. aegyptius	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+

D: Türlerin % 89'u pozitif, W: zayıf reaksiyon

2.5.Dirençlilik

H.influenzae kuruluğa, ısıya ve dezenfektanların çoğuna duyarlıdır. 50-56°C’de 30 dakikada ölür. Muayene maddelerinde 4-5 saatte ölmektedir.

Kuru balgamda genellikle 48 saatten fazla yaşayamaz. Uygun şartlarda yapılan kültürlerde dahi hemen otoliz olur. Canlı virulan bakterilerin korunması ancak çikolata agar veya başka zengin besiyerlerine sık sık yapılan subkültürlerle sağlanır. Ayrıca, bakteriler kaymağı alınmış sütte liyofilizasyon ile uzun yıllar saklanabilir. Başka bir metod 24 saatlik buyyon kültürlerin %10’luk gliserolde süspanse edilerek -70°C’de dondurulmasıdır. *H.influenzae* suşlarının en uzun süre(30 gün)eritrosit süspanسیونunda canlı kaldığı gözlenmiştir. (Baysallar M;1995)

2.6.Hücresel Bileşenler

Haemophilus suşlarının hücre duvarı,yapı, bileşim ve endotoksin etkinliği bakımından Gram negatif bakterilerinkine benzer. *H. influenzae* suşlarının kalın bir hücre duvarı vardır. *H.influenzae*’nin hücre duvarı hücre membranı ile birlikte 20nm kalınlığındadır.*H.influenzae*’nin dış duvarında veziküler yapılar bulunup bunlar yapı olarak lipopolisakkaritlere benzemekte ve çevreye atılmaktadır.

Bakterinin hücre zarı; bir sitoplazmik membran, bir peptidoglikan tabakası ve bir dış membrandan oluşur.

H.influenzae’den elde edilen lipolisakkaritlerin(LPS) incelenmesi sonucunda, bunların glikoz, galaktoz, glikozamin,heptoz ve 2-keto-3-deoksiaktonate’e benzer(KDO) molekülleri taşıdığını göstermektedir. LPS türünün yeni doğmuş farelerde oluşturulan Hib menenjit infeksiyonunda bakterilerin virulansını etkilediği belirlenmiş bulunmaktadır.

Bu bakterinin dış membran proteini(OMP) yaklaşık olarak 20 protein içermektedir. SDS-page tekniği ile proteinlerin 4-6’ya ayrımı hem tip b hem de kapsülsüz kökenler için alt tip sistemlerinin temelini oluşturmaktadır. Antijen ve

molekül düzeyindeki çalışmalar OMP-P6'nın türler arasında yüksek derecede korunduğunu göstermektedir.(Killian M,1982;Manheim W,1984)

H.influenzae'nin stoplazma enzimleri multilocus enzim elektroforezi ile tespit edilebilmektedir.Bu enzimler kültür aktarımları ile veya faz değişiklikleri ile değişikliğe uğramamaktadır. Bu teknikle dış membran proteini tiplemesinden daha yüksek seviyede değişik tipleme yapılabilmektedir.

Dış membran protein, lipopolisakkarit ve fosfolipidleri içerir. Dış membran proteinlerinin, H.influenzae'nın yol açtığı hastalıkların patogenezi ve immunitesindeki rolünün ne olduğu bilinmemektedir. Bazı membran proteinleri (porinler) hücre transportunda rol oynarken, diğer proteinlerin (adesinler) işlevleri henüz tanımlanamamıştır. Pili ve fimbria dış membrandan uzanan protein filamentleri olup mikroorganizmanın epitel hücrelerine yapışmasını sağlarlar. H. influenzae'nın hemagglütasyon yapan kökenlerinde fimbrialar bulunmaktadır.(Scott ve Old,1981 ;Killian M,1976) H.influenzae'nın hem tip b hem de tiplendirilemeyen kökenleri pililere sahiptir. H.influenzae'nın serolojik olarak tiplendirilemeyen kapsülsüz suşlarının çoğu(%90'dan fazlası) insan epitel hücrelerine yapışabilir. Bu özelliği bakteri fimbrialarının sağladığı gösterilmiştir. Tip b suşlarının ise az bir kısmı (%5) yapışkandır.(Turk DC ;1984) Bu farklılıklar kapsülsüz suşların lokalize infeksiyonlara sebep olmalarını açıklar.

H. influenzae'nın kapsül polisakkaritinin yapısı çizelge1'de gösterilmiştir. Serotiplerin hepsinde teikoik asit bulunmaktadır.Biyokimyasal olarak Enterobacteriaceae'nın lipopolisakkaridinden farklı olmakla beraber, biyolojik olarak benzer aktivite gösterir. Haemophilus influenzae tip b, LPS preparatı dermal Schwartzman reaksiyonuna sebep olur, fareyi öldürebilir, tavşanlarda ateş cevabını ve poliklonal B hücre aktivasyonuna uyarır.

Serotip b'nin kapsül teikoik asitinin molekül ağırlığı (ribosyl ribitol fosfat) ultrasantrifugasyon ile 150.000 olarak veya jel filtrasyonu ile > 200.000 olarak gösterilmiştir.(Rodriquez ve ark.,1971) Serotip d ve e kapsüllerinde fosfat bulunmamaktadır. H. influenzae'nın polisakkarit kapsülü önemli bir virulans faktörüdür.Polisakkarit kapsül, mikrobu fagositozdan korumaktadır. Ayrıca H.

influenzae'nın kapsül polisakkariti serum komplementinin etkisine direnç göstermede de etkili olmaktadır. Haemophilus influenzae izolatları polisakkarit kapsüllerine göre sınıflandırılır. Bu sınıflamaya göre, a'dan f'ye kadar isimlendirilen, yapısal ve antijenik olarak farklı kapsül türlerine sahip 6 serotip mevcuttur. H. Influenzae'nin farklı serotiplerinin kimyasal yapısı tablo.2.2.'de görülmektedir.(Killian M,1982 ;Manheim W,1984)

Tablo.2.2. H.influenzae'nin farklı serotiplerinin kimyasal özellikleri

Tip	Şeker	N-Asetil	Fosfat
a	Glukoz	-	+
b	Riboz,ribitol	-	+
c	Galaktoz	-	+
d	Heksoz	-	+
e	Heksozamin	+	+
f	Galaktozamin	+	+

2.7.Antijen Yapıları

2.7.1.Kapsül Antijenleri

Bakteride polisakkarit yapısında bir kapsül bulunmaka ve bu bakterinin tip spesifikliğini belirlemektedir. H.influenzae'nın major antijenik determinantı kapsüler polisakkaritidir. H.influenzae'nın, kapsül antijenlerine göre, Pittman tarafından a'dan f'ye kadar adlandırılan 6 farklı antijenik tipi açıklanmıştır. H.influenzae tip b'nin polisakkaridi pentoz şekerler, riboz ve ribitol fosfattan diğer serotiplerin polisakkaridi ise heksoz veya heksozaminlerden oluşmaktadır.(Konemann E.et al,1992 ;Mamal M,1995 ;Baysallar M,1995)

Ayrıca H.influenzae suşları kapsülsüz olabilir, bu suşlar kapsüler serotip a,b,c,d,e ve f antiserumlarıyla reaksiyon vermemeleriyle ayırt edilebilirler ve tiplendirilemeyen suşlar olarak adlandırılırlar. Klinik olarak en çok karşılaşılan tipler tip b ve tiplendirilemeyen suşlardır.

2.7.2.Somatik Antijenleri

Hücre zarında bulunan lipopolisakkarid ve protein antijenleridir. Protein antijenlerinin bazıları suşların hepsinde ortak iken, bazıları kapsüllü ve kapsülsüz suşlara göre değişir. Dış membran proteinlerine(OMP) veya lipopolisakkaridlere göre H.influenzae'nin subtiplendirilmesi özellikle epidemiyolojik çalışmalarda ve invaziv suşların tanımında önemlidir. Ancak, tip b'nin sebep olduğu enfeksiyonların çoğunda belirli OMP tipleri bulunduğu halde, tiplendirilemeyen izolatlarda OMP tipleri kısa sürelerde (birkaç ay) çok fazla değişmeye uğrarlar.(Killian M,1982;Manheim W,1984)

2.8.Patogenez

H .influenzae, hasta ve taşıyıcılardan enfekte damlacıkların inhalasyonu ile farenkse yerleşir ve sıklıkla nazofarenjite sebep olur. Buradan doku yayılımı sonucu sistemik enfeksiyonlar gelişebilir.

Bu bölümde patogenezde rol oynayan kapsül, IgA proteaz, bakteriyosin, endotoksin, lipooligosakkaritler, dış zar proteinleri, nöraminidaz aktivitesi, histamin sentezi, transferrin bağlama yeteneği ele alınacaktır.

2.8.1.Kapsül

Sistemik hastalıkların patogenezinde rol oynayan en önemli faktör; H.influenzae tarafından oluşturulan poliribozil fosfat(PRP) yapısındaki kapsüldür. H.influenzae'nin sebep olduğu sistemik hastalıkların hemen tümü kapsüllü suşlarca meydana getirilmektedir.Kapsül fagositozu önlemekte ve komplemanın aktifleşmesini azaltmaktadır.

2.8.2.IgA Proteaz

H.influenzae'nin ürettiği IgA proteazı insan IgA1'ini parçalar. H.influenzae IgA1'i farklı peptit bağlarından parçalayabilen 3 ayrı tipte IgA proteaz üretir. Bu

enzim sadece insan IgA1'inin ağır zincirini özel bölgelerden parçalamaktadır. Konağın mukoza immünitesi salgısal IgA yoluyla sağlandığı için IgA'nın mikroorganizma tarafından parçalanması, bakterinin penetransını sağlayarak, virulansı arttırmaktadır. (Ralph D, 1998)

2.8.3. Bakteriyosin

H.influenzae tip b, hemocin isimli bir bakteriyosin üretir. Diğer serotipler ve kapsülsüz H.influenzae kökenleri, H. parahaemoliticus, bazı H.parainfluenzae kökenleri ve H.haemoliticus ve ayrıca bazı enterik bakteriler bu bakteriyosine duyarlıdır. (Konemann K. et al, 1992; Kuklinska D. et al, 1984) Hemocin diye adlandırılan bu bakteriyosinin etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir.

Lipuma ve arkadaşları 438 H.influenzae kökenini hemocin üretimi ve bu proteine karşı duyarlılık yönünden incelemişler. 212 tip b kökeninden 199'unun(%94) hemocin ürettiği; 134 tiplendirilemeyen kökenden 131'inin(%98) ve tip b dışındaki kapsüllü kökenden 91'inin (%99) hemocine duyarlı olduğunu göstermişlerdir. (Konemann K. et al, 1992; Kuklinska D. et al, 1984)

İnvazif hastalığı olmayan 15 çocuğun mukozasından ve invazif hastalığı olan 14 çocuktan elde edilen 29 Hib kökeni incelenmiş bunların 28'inin hemocin ürettiği saptanmıştır. Buna karşılık kandan ve BOS'tan elde edilen 26 tiplendirilemeyen köken hemocin üretmemiş ve hepsi bu proteine karşı duyarlı bulunmuştur. (Konemann K. et al, 1992; Kuklinska D. et al, 1984)

Hemocin üretimi ve tip b kapsüllü kökenleri arasında güçlü bir ilişki vardır. H.influenzae tip b enfeksiyonunun patogeneğinde hemocinin potansiyel bir rol oynadığı düşünülmektedir.

2.8.4. Endotoksin ve Glikopeptit

H.influenzae silier aktiviteyi inhibe eden 2 madde salgılamaktadır. Biri ısıya dirençli, düşük molekül ağırlıklı bir glikopeptid, diğeri de lipopolisakkarit yapıda bir

endotoksindir. *H.influenzae*, diğer Gram(-) bakteriler gibi endotoksin aktivitesi gösterir. Bazı suşların endotoksinleri yüksek dozlarda verildiklerinde deney hayvanları için toksiktir. Fakat insanlar için patojenitesine dair kesin bir delil yoktur. Toksinler, sıvı besiyerinde 6-8 saatlik inkubasyon sonrası oluşur ve filtre edilebilir. Filtratın 2-4 ml'si parenteral yolla enjekte edildiğinde tavşanları öldürür. Ekzotoksini ise yoktur.(Akan E,1980;Wilson GS.et al,1983)

2.8.5.Fimbrialar ve Diğer Yüzey Adezinleri

Fimbria hareket yeteneğinin olmamasıyla flagelladan ayrılır. Bakterinin insan nasofarinks epitel hücrelerine yapışmasını kolaylaştırır ve eritrositleri hemaglutine ederek bakterinin virulansını artırır. Bunlar kan grubu antijenlerinden Anton ile çapraz reaksiyon verirler.(Bakteriler ve viruslar,Dergah Yayınları,1987)

2.8.6.Lipopolisakkarit ve Dış Membran Proteinleri

H.influenzae'nin endotoksini ve lipopolisakkariti mikroorganizmanın sebep olduğu hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynamaktadır ve suşlar arasında çok az antijenik farklılık göstermektedir. Zhawlen ve arkadaşları *H.influenzae*'nin kapsül ve LPS yapısını tayin eden genlerin ortak veya ilişkili olduğunu ve tip b suşlarının kan dolaşımında canlı kalmasında LPS'nin önemli etkisi olduğunu bildirmişlerdir. Lipopolisakkaritler, silialı solunum yolu epitelü üzerinde paralyze edici etki gösterir ve bakteri proliferasyonunu uyarır. Dış membran proteinleri immun yanıt modülasyonunda etkilidir.

2.8.7.Nöraminidaz

H.influenzae'nin nöraminidaz aktivitesi polimorf lökositlerin kemotaktik aktivitesini inhibe edebilmektedir.

2.8.8.Histamin

H.influenzae ve bazı *H.parainfluenzae* kökenleri tarafından histamin sentezlendiği saptanmıştır.Bu da inflamasyona ve akciğerlerde bronkokonstriksiyona yol açmaktadır.

2.8.9.Transferrin bağlama yeteneği

H.influenzae tip b, H.parainfluenzae, H.paraaphrophilus'da gösterilmiştir. Haemophiluslar için gerekli olan demir, muköz membranlarda düşük konsantrasyonda bulunur, bu da konağın direncini sağlar.

Solunum yoluyla 10^6 miktarında alınan bakteriler, mukus engelini aştıktan sonra ürettiği faktörlerle titrete tüylerin hareketini bozar. H.influenzae hem fimbrialar hem de fimbria olmayan yüzey adezinleri ile nazofarinkteki epitel hücrelerine yapışır, burada çoğalarak mikro koloniler oluşturmak suretiyle kolonileşir. Nasofarinkteki kolonileşme sonucu çoğunlukla belirtisiz bir taşıyıcılık gelişir. Bazen hafif bir solunum yolu enfeksiyonu gelişebilir. Bazen de bu kolonileşme H.influenzae tip b'nin kan dolaşımına geçmesiyle sonuçlanabilir. Epitel hücrelerinin bağlanma yerlerindeki bozulma ve kirpikli epitelin dökülmesi ile belirlenen bir sitotoksite gelişir. Solunum mukozasının kirpiklerinin hareketini durdurma özelliği bulunan hücre dışı toksine benzer bir faktörün H.influenzae'de bulunduğu Denny tarafından saptanmıştır. Isıya dirençli, eter ekstraksiyonu ile nötralize edilemeyen ve dialize olmayan bu faktör, kapsüllü ve kapsülsüz H.influenzae kökenleri tarafından meydana getirilmekte, kirpikli epitelin parçalanmasına yol açmakta ve bakteri kolonileşmesini kolaylaştırmaktadır. Sonra mukoza yüzeylerinde hücreler arası invazyon oluşur ve invazyon sonucu diğer hastalıklar gelişir.

H.influenzae enfeksiyonlarının çoğu 2ay-5 yaş arası çocuklarda görülmektedir.Bu yaş grubunda hastalığın ortaya çıkışında anti-PRP antikor düzeyinin düşüklüğü sorumlu tutlmaktadır.(Baron EJ:et al,1990;Mamal Torun M.et al,1995;Moxon ER,1990;Killian M.et al,1979)

2.9.Yaptığı Hastalıklar

Bu bölümde H.influenzae ve diğer haemophilus türlerinin yaptığı hastalıklar hakkında bilgi verilecektir.

2.9.1.H.influenzae

2.9.1.1.Tip b Hastalıkları

Genellikle H.influenzae tip b'nin sebep olduğu sistemik enfeksiyonlar; menenjit, epiglottit, süpüratif artrit, osteomyelit, lokal hastalıksız bakteriyemi, perikardit, sellülit ve pnömonidir.

Meninjit: H.influenzae'nin oluşturduğu en ağır hastalıktır. Vakaların çoğunu (%80) 3 ay ile 3 yaş arasındaki çocuklar oluşturur. Klinik ve laboratuvar bulguları diğer piyogenik menenjitlerin aynısıdır.

Erişkinde H.influenzae meninjit altta yatan bir hastalık veya bir predispozisyona bağlı olarak gelişir ve genellikle komşu bir enfeksiyon odağından organizmaların direkt invazyonu ile ortaya çıkar.(Konemann E.et al,1992;Baron EJ.et al,1990;Killian M.et al,1979;Murphy TF,1992;Kılıçturgay K,1996)

Akut Epiglottit: H.influenzae enfeksiyonları arasında ikinci sırayı alır. Genellikle 2-7 yaş arası çocuklarda nadiren de erişkinlerde görülür. H.influenzae epiglottitin en sık nedenidir. Akut bir başlangıç ve dramatik bir seyir gösterir Akut olarak obstruktif larinks ödemi ile aniden başlar. Görünüşte sağlıklı olan çocuk aniden solunum yetmezliğine girer ve başlangıçtan sonraki 12 saat içerisinde hava yolunun obstrüksiyonundan kurtarılması için acil trakeostomi gerekebilir.

Vakaların %97'sinden çoğunda kan kültüründe H.influenzae tip b üremektedir. Baron EJ.et al,1990; Murphy TF,1992)

Sellülit: Özellikle 2 yaş altındaki çocuklarda görülür.Nadiren büyüklerde görülür. En yaygın görüldüğü yer yanaktır. Fakat periorbital ve diğer bölgelerde özellikle üst ekstremitelerde de oluşabilir.(Baron EJ.et al,1990 ; Murphy TF,1992;Campos JM,1995) Bu vakalarda birlikte meninjit ve bakteriyemi bulunabilir.

Osteomiyelit: H.influenzae, çocuklarda nadiren uzun kemikleri tutan hematojen osteomiyelite sebep olur. Erişkinlerde ise şimdiye kadar üst solunum yolu enfeksiyonunu takiben H.influenzae tip b'ye bağlı iki vaka, üriner yol enfeksiyonunu takiben tip c'ye bağlı bir vertebral osteomiyelit vakası bildirilmiştir.

Lokal Hastalısız Bakteriyemi: H.influenzae çocuklardaki bu tip bakteriyemilerin %20'sinden sorumludur. Özellikle orak hücre anemili veya splenektomi geçirmiş 6 ay-36 ay arası çocuklar duyarlıdır. Erişkinlerde ise kemoterapi uygulanan neoplastik hastalarda görülür. Erişkinlerde, genellikle orta yaş grubundaki erkeklerde pnömoni ve kronik bronşit ataklarında kapsülsüz H.influenzae önemli bir patojendir. Sık ve erken görülen bir klinik tablodur. Yeni doğanlarda maternal-fetal ya da maternal-perinatal bulaşma sonucu ortaya çıkmaktadır. Yeni doğan döneminden sonra görülen bakteriyemi vakalarının %90-95'i tip b kökeni tarafından oluşturulur.(Baron EJ.et al,1990 ; Campos JM,1995 ; Kılıçturgay K,1996)

Akut Otitis Media: H.influenzae bakteriyel otitis media sebebi olarak Streptococcus pnömoniae'den sonra ikinci sırada yer alır. Vakaların %10-30'una sebep olur ve genellikle kapsülsüzdür. Kapsüllü tip b, %3-10 sıklıkla bulunmuştur. Bu hastalarda , nazofarenks ve orta kulakta bulunan biyotiplerin aynı biyotipler olduğu gösterilmiştir. Bu sonuç şimdi geçerli olan, normal boğaz florasındaki baskın biyotiplerin orta kulağa yayılması sonucu otitis medianın meydana geldiği tezini doğrulamaktadır.(Baron EJ.et al,1990 ; Campos JM,1995 ; Kılıçturgay K,1996)

Pnömoni: Daha çok çocuklarda görülmesine rağmen, erişkinlerde altta yatan hastalık durumlarında görülür. Sistemik enfeksiyonlarla birlikte görüldüğünde etken H.influenzae tip b'dir. (Kılıçturgay K,1996)

Septik artrit: 2 yaş altındaki septik artrit en sık nedenidir. Genellikle tek ve ağırlık taşıyan büyük eklemleri tutar.

Perikardit,orbital sellülit, endoftalmit, üriner sistem enfeksiyonları ve abseler H.influenzae tip b tarafından oluşturulan diğer enfeksiyonlardır.(Murphy TF,1992)



2.9.1.2. Diğer Serotipler ve Tiplendirilemeyen H.Influenzae Kökenleriyle Oluşan Enfeksiyonlar

Kapsülsüz suşların sebep olduğu lokalize enfeksiyonlar ise akut otitis media, akut sinüzit, kronik bronşit ve konjunktivittir. Ayrıca erişkinlerde nadiren üriner ve genital yol hastalıklarına da sebep olabilir. (Murphy TF,1992)

Pnömoni: Altta yatan bir akciğer hastalığının komplikasyonu olarak geliştiğinde tiplendirilemeyen kökenler ve tip b dışı H.influenzae etken olarak tespit edilmektedir.

Otitis media: En sık 6 ay-2 yaş arası çocuklarda görülür. Vakaların %90'ından tiplendirilemeyen H.influenzae kökenleri, kalan %10'undan ise tip b sorumludur.

Sinüzit: Tiplendirilemeyen , kapsülsüz H.influenzae kökenleri etken olarak rol oynamaktadır.

Endokardit: H.influenzae tarafından oluşturulan endokardit, klinik ve anatomik olarak diğer pyojenik bakterilerin endokarditine benzer, ancak nadir görülür. Arter embolisi sıktır. En sık etkenler olarak H.aphrophilus, H. paraaphrophilus, H.parainfluenzae görülür.

Ayrıca tiplendirilemeyen H.influenzae kökenleri puerperal sepsis, perikardit, sellülit, septik artrit, osteomyelit, kolesistit, üriner sistem enfeksiyonları, bakteriyemi, mastoidit, erişkinlerde epiglottite etiyojijisinde rol oynar. (Murphy TF,1992)

2.9.2.H.parainfluenzae

Diğer Haemophilus türleri arasında en sık görülen patojen H.parainfluenzae'dır. Enfeksiyonları H.influenzae'ye benzer. H.parainfluenzae farinjit, epiglottit, otitis media, konjunktivit, diş abseleri, pnömoni, ampiyem, sepsis, endokardit, osteomyelit, peritonit, meninjit, beyin absesi, üriner ve genital sistemi



tutan enfeksiyonlara yol açar. (Konemann E.et al,1992;Baron EJ.et al,1990;Campos JM,1995; Murphy TF,1992)

2.9.3.H.aphrophilus

Sinüzit, otitis media, epiglottit, pnömoni, ampiyem, bakteriyemi, endokardit, osteomyelit, yumuşak doku abseleri, yara enfeksiyonları, nekrotizan fasiit, meninjit ve beyin abselerine yol açabilir. H. aphrophilusa yapıcı çok benzeyen Actinobacillus actinomycetemcomitans'ında endokardit yaptığı bildirilmiştir. (Konemann E.et al,1992;Baron EJ.et al,1990;Campos JM,1995)

2.9.4.H.paraphrophilus

Larinjit, endokardit, beyin abseleri, osteomyelit ve paronşiaya yol açtığı bildirilmiştir. (Konemann E.et al,1992;Baron EJ.et al,1990)

2.9.5.H.aegyptius

Pembe göz denilen, bulaşıcı akut konjunktivite yol açabilir.(Koch-Weeks konjunktiviti) Yarı katı besiyerlerinde kuyrulu yıldız şeklinde koloniler oluşturur. H.aegyptius'dan fenotipik ve biyokimyasal olarak ayıramayamın bir grup Brezilya Purpurik Ateşi adı verilen , yüksek ateş, bulantı, karın ağrısı, peteşial hemorajik deri döküntüleri ve endotoksemi ile seyreden mortalite oranı yüksek şiddetli bir enfeksiyona sebep olur(Konemann E.et al,1992;Baron EJ.et al,1990; Murphy TF,1992)

2.9.6.H.haemolyticus ve H.parahaemolyticus:

İnsanın üst solunum yolunda bulunurlar. Nadiren endokardit, kronik bronşit, pürülan orofarinjit, karaciğer ve pankreas abseleri, sellülit ve ampiyeme yol açarlar. H.parahaemolyticus; ağız boşluğu ve farinksin normal florasında bulunur. Bazı endokardit vakalarında rol oynadığı bildirilmiştir. (Konemann E.et al,1992;Baron EJ.et al,1990)

2.9.7.H.haemoglobinophilus

İnsanlarda herhangi bir infeksiyona yol açtığı bildirilmemekle beraber Khairat bir infektif endokardit vakasından H.haemoglobinophilus'a benzer bir hemofilik bakteri izole etmiştir. (Konemann E.et al,1992;Baron EJ.et al,1990; Murphy TF,1992)

2.9.8.H.paraphrohaemolyticus

İnsanların boğazsekresyonları, balgam ve uretra salgılarından izole edilmiştir. Nadiren endokardit, kronik bronşit, pürülan orofarınjit, karaciğer ve pankreas abselerine, sellülite ve ampiyeme yol açar. (Konemann E.et al,1992;Baron EJ.et al,1990)

2.9.9.H.pleuropneumonia

İnsanlarda herhangi bir infeksiyona yol açtığı bildirilmemiştir. (Konemann E.et al,1992)

2.9.10.H.segnis

Farinks normal florasında ve özellikle diş plağında bulunurlar. Welch ve arkadaşları 5 akut apandisit vakasında H.segnis'i izole etmişlerdir. (Konemann E.et al,1992;Baron EJ.et al,1990)

2.9.11.H.ducreyi

İnsanda şankroid(yumuşak yara) etkenidir. HIV1 ve HIV2 infeksiyonu ile birlikte sık görülür. (Konemann E.et al,1992;Baron EJ.et al,1990)

2.10.İmmünite

H.influenzae enfeksiyonlarına karşı oluşan bağışıklığı, fagositozu kolaylaştıran antikapsüler antikorlar ile somatik antijenlere karşı gelişen komplemanı bağlayan bakteriyolitik antikorlar sağlar.

Yenidoğan enfeksiyonları, anneden transplasental olarak geçen antikorlar sebebiyle hayatın ilk üç ayında çok az görülür. Daha sonra antikorlar kaybolur ve özellikle 3 ay-3 yıl arasında çocukların enfeksiyonlara duyarlılığı artar.

Sistemik H.influenzae tip b enfeksiyonlarına karşı antikor cevabı yaşa bağlıdır. 2 yaşın altındaki çocuklarda oluşan anti PRP antikorları yetersizdir. Aynı yaştaki sağlıklı çocuklarda bulunan düzeylerden bile daha düşüktür. Bu durum, immunglobulin yapımının eksikliğine bağlı olmayıp, daha çok genetik olarak karbonhidrat antijenine karşı immun cevapta spesifik bir eksiklikten ileri gelmektedir. Daha büyük çocuklarda (3-5 yaştan büyük) ve erişkinlerde ise yüksek düzeyde PRP antikorları oluşur.(Gotoff SP,1981;Granoff DM.et al,1980;Joklik SP.et al,1984)

Erişkinlerde H.influenzae tip b enfeksiyonlarının seyrek görülmesine karşılık antikapsüler antikorların yaygın prevalansını açıklamak zordur. Bu antikorların oluşmasına normal bakteri florasında bulunan ve cross reaksiyon veren bakterilerin immunojenik katkısı olabilir. Bu sebeple H.influenzae'ye karşı oluşan tabii direnç, kendisine karşı gelişen multifaktöriyel antikor cevabı kadar, cross reaksiyon gösteren antijenlerin antikor cevabıyla da açıklanabilir.

2.11.H.influenzae'nin Tiplendirilmesi

H.influenzae nazofarenks ve boğaz sürüntüsü, balgam, kan, serebrospinal sıvı, konjunktiva sürüntüsü, vaginal sürüntü ve enfekte eklemlerin aspirasyon sıvısı gibi örneklerden izole edilirler.(Mehtar S.et al,1983;Tebbut GM,1983) Örneklerin çabuk transportu gereklidir. Transport besiyeri olarak Stuart ve Amnies besiyeri kullanılabilir(Li K.et al,1986;Roberts DE.et al,1987)Haemophilus türleri üst solunum yolu normal florasında bulunduğuundan aşağı solunum yolundan örnek alınmasında bronşiyal yıkama, transtrakeal aspirasyon veya endotrakeal entübasyon gibi metodlar tercih edilmelidir.(Kilbourn JP.et al,1983)

Direkt mikroskopik tanı için uygun örnekler; serebrospinal sıvı, artrosentez, thorasentez ve orta kulak aspiratlarıdır.

İzole edilen suşların tanısı, üreme faktörlerine olan (X ve V faktörleri) ihtiyaçlarının tespiti, seçici biyoşimik testlerin yapılması, CO₂'e olan ihtiyaç ve kanlı agarda hemoliz oluşturma özelliklerine göre yapılır.(Gratten M.et al,1984;Juni BA.et al,1982;Simon HB.et al,1980;Qadri SMH.et al,1983;Mamal M.et al,1987)

Türlerin ayrımında kanlı agardaki hemoliz çeşidi de büyük determinanttır. Dana kanı hemolizin saptanmasında en uygun kandır. (Kaythy H.et al,1987)

Stafilokok çizgi tekniği(satellizm), kanlı agarda S.aureus'un hemoliz alanı içerisinde ince, nemli kolonilerin oluşması ile tanımlanır. Bu alanda, Stafilokokal hemolizlerleaçağa çıkan hemin ve hematin şeklinde X faktörü ile Stafilococcusların oluşturdıkları V faktörü birarada bulunmaktadır.

Hem V hem de X faktörüne ihtiyaç, bu faktörlere sahip kağıt disklerin çevresinde üremenin gösterilmesiyle yapılabilir. Morfolojisi Haemophilus'a benzer kolonilerin X ve V faktörlerine olan ihtiyaçlarını belirlemede, bu faktörleri içermeyen besiyerleri kullanılır. Bu amaçla kullanılacak en iyi besiyerleri tyrypticase soy agar ile brain heart infusion agardır. X faktörüne olan ihtiyacın tayini, kanlı agar ve Müller Hinton agar gibi içinde az miktarda X faktörü bulunabilen besiyerlerinde zordur. Bu durumda H.influenzae sadece V faktörü çevresinde ürer ve H.parainfluenzae olarak yanlış tanı konulabilir.(Qadri SMH.et al,1983) X ve V faktörleri emdirilmiş disk veya stripler 1-2 cm aralıklarla besiyeri üzerine yerleştirilip, 37C'de %5-10'luk CO₂'li ortamda 24 saat inkübasyon sonrası üreme değerlendirilir.

Delta-aminolevulinik asit(ALA)- porfirin testi; Killian tarafından tarif edilmiş olup, yine X faktör ihtiyacını belirlemede kullanılır. Test öncül komponent delta amino levulinik asitten hemin biyosentezinde ara madde olan protoporfirini sentezleme yeteneğinin var olup olmadığının belirlenmesi temeline dayanır. H.influenzae X faktörüne ihtiyaç duyduğundan, bu sentezlemeden yoksun olup testte negatif sonuç verir. Test için ALA emdirilmiş filtre kağıt diskleri veya ALA içeren besiyerleri mevcuttur.4si Disk metodu ile;doymuş diskler suyla ıslatılır, daha sonra büyüme besiyerindeki organizmalar emdirilir. 4 saat sonra diskler UV lambasında(Wood's lamp) incelenir. Organizmanın bulunduğu bölgede kırmızı

kiremit rengifloessans, testin sonucunun pozitif olduğunu(bakterinin X faktörüne ihtiyaç duymadığını), mavi floessans, testin negatif olduğunu(bakterinin X faktörüne ihtiyaç duyduğunu gösterir. ALA agar besiyerindeki testte, organizma besiyerine yayılır ve bir gece boyunca üretime bırakılır. Ertesi gün üreme UV lambasında incelenir. Kiremit kırmızısı floessans pozitif sonucu gösterir.(Mamal M.et al,1987;Mamal Torun M,1995)

Diğer biyokimyasal testlerden sükrozdan asit oluşumu, beta galaktozidaz aktivitesi ve indol yapımı H.influenzae ve V faktörü bağımlı Haemophilus türlerinin ayırt edici tanısında önemlidir. H.influenzae, sükrozdan asit oluşturmaz ve beta galaktosidaz negatiftir. Oysa V faktörü bağımlı suşların %97'si sükrozdan asit oluşturur ve %80'i β galaktozidaz pozitifdir. H.influenzae oksidaz oluşturur, safraya dayanıksızdır ve jelatinde üremez.

Haemophilus türlerinin biyokimyasal tanımlanması şu şekilde olur:

Karbonhidrat fermentasyonu: Türlerin tanımlanmasında glikoz, sükroz ve laktozun fermentasyonu önemlidir.Otoklav sonrası X ve V faktör ilaveli ve karbonhidratın %1'ini ihtiva eden fenol kırmızısı sıvı besiyerinde bu test yapılır.(Kaythy H.et al,1987;Killian M,1976)

Ksilozun fermentasyonu: Özellikle H.influenzae'nin H.aegyptiusdan ayırımında önemlidir.(Killian M,1976;Howard B,1987)

İndol, üreaz ve ornitin dekarboksilaz testleri: Elde edilen Haemophilus influenzae suşları ayrıca indol üretimi, ornitin dekarboksilaz ve üreaz varlığını belirleyen biyokimyasal reaksiyonların birlikteliğinden yararlanan bir sistemle biyotip olarak adlandırılan alt tiplere ayrılabilirler Bu testler tablo IV'de görüldüğü gibi H.influenzae'yi 8 biyotipe, H.parainfluenzae'yi 4 biyotipe ayırır.(Baron EJ.et al,1990;Baysallar M,1995;Campos JM,1995;Moxon ER,1990;Killian M.et al,1979)

Biyotiplendirme çalışmalarından elde edilen bilgiler, Haemophilus influenzae tip b izolatlarının biyotip I olduğuna işaret etmektedir. Tiplendirilemeyen izolatlar da biyotip I olabilir. Fakat birçok seride bunlar sıklıkla tip II ve tip III'dür.

Tip V'ten tip VIII'e kadar olan izolatlar klinikte nispeten azdır ve hemen hemen her zaman tiplendirilemeyen suşlardır.

Tablo.2.3. *H. influenzae* ve *H.parainfluenzae*'nin biyotiplendirilmesi

<i>Türler ve biyotipler</i>	<i>indol</i>	<i>üreaz</i>	<i>ornitin</i>
<i>H.influenzae</i>			
Biyotip I	+	+	+
Biyotip II	+	+	-
Biyotip III	-	+	-
Biyotip IV	-	+	+
Biyotip V	+	-	+
Biyotip VI	+	-	-
Biyotip VII	+	-	-
Biyotip VIII	-	-	-
<i>H.parainfluenzae</i>			
Biyotip I	-	-	+
Biyotip II	-	+	+
Biyotip III	-	+	-
Biyotip IV	+	+	+

Haemophilus izolatlarının serotiplendirilmesi, özellikle bazı invaziv enfeksiyonların erken tanısında faydalıdır. Serolojik tanı daha çok kapsüllü suşlar için değerlidir. Kapsüler serotipler, latex partikül aglütinasyon(LPA), kapsül şişme reaksiyonu, zıt yönlü immünelektroforez (CIE), radio immün assay (RIA) ve enzyme- immuno assay(EIA) gibi çeşitli deneylerle tespit edilebilir.(Mamal M.et al,1987;Scheifele DW.et al,1981) En çok kullanılan metod ticari hazır antiserumlar kullanılarak yapılan lam aglütinasyonudur.⁶² Basitlikleri, hızlılıkları, daha ucuz olmaları ve kesin sonuç vermelerinden dolayı lam aglütinasyonu ve koaglütinasyonu tavsiye edilmektedir. Bakteri süspansiyonu, eski kültürlerde kapsül kaybolduğundan 18 saatlik kültürlerden %0.5 formalin bulunan normal tuzlu suda hazırlanır.²⁶ Mevcut antiserumlarda, bazı somatik antijenlere karşı da antikor bulunabileceğinden kapsülsüz suşların çoğu otoaglütinasyon gösterir. Bu yüzden sadece bir dakika içinde

beliren kuvvetli reaksiyonlar pozitif kabul edilmelidir.(Campos JM,1995; Kilbourn JP.et al,1983; Scheifele DW.et al,1981;Wallace RJ.et al,1981)

H.influenzae'nin kapsüler polisakkaridine benzer antijenik yapı gösteren bakteriler, Streptococcus pneumonia serotip 6, 15a, 29 ve 35a, E.coli K:100, Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus faecalis, Streptococcus pyogenes, Lactobacillus plantanum, Bacillus alvei ve Bacillus pumilus'dur.

H.influenzae'nin üretilmesinin zor olduğu BOS gibi vücut sıvılarında latex aglütinasyon, CIE teknikleri ile H.influenzae tip b antijenleri, stafilokokal protein a'nın kullanılabileceği bildirilmiştir. Karşılaştırmalı çalışmalar sonucunda LA ve CoA'nın %82-100 duyarlılık oranları ile CIE'den daha üstün oldukları gözlenmiştir. (Broude AI;1985; Kilbourn JP.et al,1983; Scheifele DW.et al,1981)

Bu yöntemler arasında , LA vücut sıvılarından H.influenzae'nin PRP antijeninin saptanmasında en duyarlı yöntem olarak bildirilmektedir. EIA ile LA karşılaştırıldığında her iki test eşit duyarlılıkta iken EIA'nın daha yüksek özgüllüğe sahip olduğu bulunmuştur. (Broude AI;1985; Kilbourn JP.et al,1983)

H.influenzae'nin P6 olarak adlandırılan kökeninin spesifik dış membran proteinine karşı oluşan monoklonal antikorlar immunoperoksidaz enzimiyle bağlanması ile oluşturulan kompleks ile, balgamda varolan H.influenzae antijeninin yapacağı serolojik reaksiyon sonucunda bakterinin direkt tanımı mümkün olmuştur.

Nükleik asit problrı ve PCR'da direkt olarak bakterinin tanımlamasında kullanılabilecek yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip diğer yöntemlerdir.

Solunum yollarından elde edilen izolatların hızlı tanımı için geliştirilen Minitex system, Trio-Tube Haemophilus system, API-20E gibi kit sistemlerinin kullanımı ile kısa sürelerde ve %100'lere varan uyumlu sonuçlar elde edilmektedir.(Mehtar S.et al,1983)



Ayrıca, Neiseria-Haemophilus Identification Card(Vitek Sistem) (NHID 4) saat gibi kısa sürede bu mikroorganizmaları tanımlayabilmektedir.

Haemophilus influenzae tip b'nin tanımlanabilmesi için dış membran proteinlerinin elektroforetik hareketlilik farklarını saptayan yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler, epidemiyolojik çalışmalarda ve muhtemel aşı immunojenlerini belirlemede faydalı olmaktadır.

Haemophilus influenzae tip b mikroorganizmalarının tanımlanabilmesi için diğer bir yöntem Michaels ve Stonebraker tarafından 1975'te tanımlanmış antiserum agarının kullanılmasıdır. İlk olarak hiperimmün H. influenzae tip b antiserumu içeren uygun saydam bir agar besiyeri hazırlanır, daha sonra besiyeri uygun materyalle inoküle edilir. İnokülasyondan 24-48 saat sonra her Haemophilus influenzae tip b kolonisinin etrafında bir aglutinasyon halosu gözlenir. Bu yöntem kolonizasyonu tespit etmede duyarlı olmasının yanı sıra, niceliksel deneyler için de uygundur.

2.12.Tedavi ve Korunma

H.influenzae'nın diğer önemli bir mikrobiyolojik özelliği ise antibiyotik direnci geliştirebilmesidir. Birçok antibiyotiğe karşı β -laktamaz üretimi (örn; ampisilin direnci) ya da plazmid aracılığı ile (örn; kloramfenikol direnci)direnç geliştirebilir.

H. influenzae , penisilin ve türevleri, kloramfenikol, sülfonamid, trimetoprim, tetrasiklin, gentamisin ve eritromisine duyarlı olmasına karşılık daha sonra bu antibiyotiklerin çoğuna karşı direnç geliştirdiği bildirilmiştir. Bu durum, antibiyotik hassasiyet testlerinin yapılmasından önce tedavinin başlatıldığı menenjit, bakteriyemi ve septik artrit gibi hastalıklarda antibiyotik seçimini zorlaştırmaktadır. Özellikle tedavi edilemeyen menenjit vakalarında mortalite %90 a varabilir. 1960 lı yıllarda en etkili ilaç ampisilin idi. Ampisiline direnç ilk kez 1974'de bildirilmiştir ve çeşitli ülkelerde rezistansta devamlı bir artış görülmüştür. Klinik kullanımda ampisilin H.influenzae infeksiyonlarının tedavisinde ilk seçenek olduğundan, bu antibiyotiğe karşı direnç gelişimi oldukça önemlidir. H.influenzae'nın ampisiline direnç mekanizması beta laktamaz yapımına bağlıdır. Suşların az bir kısmı ise penisilin



bağlayan proteinlerin değişmesinden kaynaklanan bir direnç gösterir. Ampisiline dirençli H.influenzae insidansı coğrafik bölgeler arasında farklılıklar göstermektedir. Klinik yönden lokal rezistans durumunun belirlenmesi gerekir. Günümüzde dünyanın farklı bölgelerinde ampisilin direnci %5 ile %40 arasında değişmektedir.(Campos J.et al,1986)

Sistemik H.influenzae şüpheli vakalarda kesin mikrobiyolojik tanı ve antibiyotik hassasiyet sonuçları belli oluncaya kadar şimdilik uygulanacak başlangıç tedavisi kloramfenikolün ya tek başına veya ampisilinle birlikte verilmesidir. Kloramfenikol serebrospinal sıvıda yüksek düzeylere eriştiğinden özellikle menenjit tedavisinde uygundur. Kloramfenikole rezistans suşlara nadiren rastlanır. Beta laktamaz inhibitörüne (sulfabaktam ve klavulanik asit gibi) sahip antibiyotikler ve üçüncü kuşak sefalosporinler genellikle etkilidir. (Campos J.et al,1986)

Haemophilus tip b'ye bağlı invaziv infeksiyonların önlenmesi amacıyla son 20 yıldır Amerika'da H.influenzae tip b aşısına yönelik çalışmalar yapılmaktadır. (Duangmani C.et al,1980;Granoff DM.. et al,1985; Joklik WF.et al ,1987;Milgrom F.et al,1982;Turk DC,1984)

H.influenzae tip b(Hib) aşı türleri(Kaythy H.et al,1987)

Hib kapsül polisakkarit aşısı

Hib oligosakkarit-CRM 197 konjugat aşısı

Hib polisakkarit-difteri toksoit konjugat aşısı(Kaythy H.et al,1987)

Hib polisakkarit tetanoz-toksoit konjugat aşısı

Hib polisakkarit Neisseria meningitidis dış zar proteini konjugat aşısı

İki yaşın altındaki esas risk grubunda bulunan çocuklar Hib kapsül polisakkarit aşısına yeterince cevap vermemektedir.bu nedenle konjugat aşılarla yönelme eğilimi artmıştır. Konjugat aşılar, T hücre bağımsız bir antijen olan Hib polisakkariti bir protein taşıyıcı ile konjuge edilerek T-hücre bağımlı hale gelmekte ve böylece immünojenitesi artmaktadır.H.influenzae tip b kapsül polisakkarit aşısı 1985'te Amerika'da lisans almıştır. Epidemiyolojik çalışmalar bu aşının 18-24 aylıktan küçük çocuklarda yeterince immünojenik olmadığını göstermiştir.bu yüzden

Amerika ve Finlandiya’da konjuge aşılar daha çok kullanılmaktadır. (Milgrom F,1982;Peltola H.et al,1984)

Hib polisakkarit-difteri toksoid konjugat aşısı 15 aydan küçük çocuklarda yeterince immünojenik bulunmamıştır.

Hib polisakkarit- N.meningitidis dış zar proteini konjugat aşısı 2-6 aylık çocuklara iki doz halinde verildiğinde yeterli antikor düzeyi oluşmaktadır. Ancak bu düzey çok çabuk düşmektedir.

Son çalışmalar özellikle Hib polisakkarit –tetanoz toksoid ve Hib oligosakkarit CRM 197 konjugat aşılarının 2,4 ve 6. aylarda 3 doz halinde verildiğinde oluşan koruyucu bağışıklığın oldukça yüksek olduğunu göstermektedir.

Aşı çalışmaları günümüzde sadece gelişmiş ülkelerde yapılmaktadır. Bu nedenle diğer ülkelerde aşının oluturacağı immünitadaki farklılıklar, genetik faktörler, H.influenzae’a bağlı hastalıkların epidemiyolojisindeki farklılıklar aşıya verilecek olan yanıtı etkileyebilir.

Sağlıklı kişilerin boğaz florasında bulunan H.influenzae suşlarının çoğu kapsülsüzdür. Sağlıklı çocukların kapsülsüz suşları taşıyıcılık oranı %14-35, erişkinlerin ise %32-82 dir. Kapsüllü suşlar ise % 5 sıklıktadır ve bunların yarısı tip b’ye aittir.

2.13.Kolonizasyon, Taşıyıcılık ve Epidemiyoloji

Sistemik H.influeanzae enfeksiyonlarında duyarlılık anti PRP antikorlarının bulunmayışı ile ilgilidir. 5 yaştan üzerindeki çocuklar ve erişkinlerin çoğunda anti PRP antikorları bulunur ve bunlarda enfeksiyonlar az görülür. Fakat erişkinlerin %25’inde bu bakterisidal antikorlar bulunmadığından enfeksiyonlara duyarlıdır. Sistemik H.influenzae enfeksiyonlarının insidansı son 25 yılda 3-4 kat artış göstermiştir. ABD’de menenjit vakaları popülasyonda yaklaşık 5/100000 ve 1 yaştan altındaki çocuklarda 35-50/100000 sıklıkta olup yılda 10000 vakayı bulmaktadır.

Bir mikroorganizmanın bir konak içinde ya da üstünde izole edildiği zaman diliminde herhangi bir bağışıklık cevabına ya da klinik bulguya sebep olmaksızın büyüüp çoğalarak varolması kolonizasyon olarak tanımlanır. (Faden H.et al,1997)

İnsanlarda normal kolonizasyon doğum eylemi sırasında başlar ve canlı cansız faktörlere temas yoluyla normal flora kurulana kadar devam eder. Normal flora bakteri ve mantarlardan oluşur. Ana patojenlerden viruslar ve parazitler ise asemptomatik olarak bireylerde bulunabilseler de normal floranın bir parçası kabul edilmezler.

Normal nasofaringeal flora *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium*, çeşitli *Streptococlar* (*Streptococcus pyogenes* ve *pneumonia*, *Streptococcus viridans* ve *mutans*), *Neisseria* suşları, *Haemophilus influenzae* ve *Actinomyces*, *Fusobacterium*, *Bacteroides*, *Lactobacillus* gibi mikroorganizmalardan oluşmaktadır. Altta yatan bir hastalık, immunomodülatör tedavi, invazif aletlerin kullanımı ya da antimikrobiyal tedavi nedeniyle normal floranın hassas dengesi bozulabilir ve enfeksiyon meydana gelebilir. (Faden H.et al,1997;Levinson EW.et al,;Sutter VL)

Mikroorganizmaların vücutta bulunuşu ve taşıyıcılık durumu arasında önemli farklılıklar mevcuttur. Her iki durumda da bir mikroorganizmanın vücutta taşınması söz konusudur. Taşıyıcılıkta, bir bireyin taşıdığı potansiyel patojen diğer bireyler için enfeksiyon kaynağı olabilir. Genellikle hastalığı atlatmış fakat hala hastalık etkeni olan mikroorganizmayı taşıyan ve uzun süre etrafına bulaştırma olasılığı olan bireyler için bu terim kullanılır. Eğer aynı mikroorganizma konakla geçici bir bağdan ve süreçten daha uzun süre için ilişki kurar ise, bu durumda kolonizasyon söz konusudur. Taşıyıcılık durumu, kısa ya da uzun süreli, aralıklı ya da sürekli olabilir. Taşıyıcılar enfeksiyon ajanını başkalarına bulaştırabilir, latent durum ise taşıyıcılık durumundan farklıdır, latent mikroorganizma bulaşıcı değildir.(Levinson EW.et al,;Sutter VL)

Haemophilus influenzae ile tanışma yaşamın ilk günlerinde başlar. Birçok süt çocuğu 1 yaşından önce bu bakteriyle kolonize olur. Kolonize olan suşlar arasında kapsüllü suşlar bulunmakla beraber, özellikle küçük çocuklarda sıklıkla



tiplendirilemeyen suşlardan oluşmaktadır. Bugüne kadar yapılmış olan çalışmalar çocukların %40-80'inin ve benzer oranlarda da erişkinlerin *Haemophilus influenzae* ile kolonize olduğunu göstermektedir. (Sarah S.et al,1999)

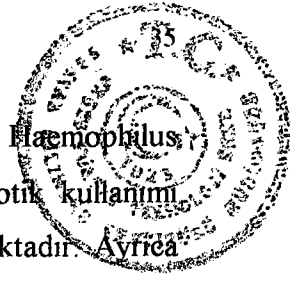
Haemophilus influenzae tip b taşıyıcılığı, *Haemophilus influenzae* tip b kolonizasyonu ile eş anlamlıdır ve insan farinks mukozasında canlı *Haemophilus influenzae* tip b bakterisi bulunması olarak tarif edilir.

Haemophilus influenzae tip b, çocukluk çağının ilk yıllarında, üst solunum yollarında çeşitli faktörlere bağlı olarak kolonize olabilmektedir. Bu faktörler arasında, yaş (0-6), yuvaya devam etme, anne sütüyle beslenme, evde 5 yaşın altında kardeş varlığı sayılmaktadır. Kolonizasyon yaşı ülkeden ülkeye değişmektedir. Bu değişkenliğe coğrafi, genetik ve gelişmişlik düzeyi gibi faktörler etki edebilir. Gelişmiş olan ülkelerde çocukların %3-5'i, gelişmekte olan ülkelerde ise %5-10'u *H. influenzae* tip b taşımaktadır. Beş yaşından itibaren çocukların çoğunda, polisakkarit kapsül bileşeni poliribozil ribitol fosfat (PRP)'a karşı, *Haemophilus influenzae* tip b invazif enfeksiyonlarından koruyacak düzeyde antikorlar kazanılmaktadır. (Barbour M.et al,1996; Akçakaya N.et al,1994; Er E.et al,1994; Vahaboğlu MH.et al,1994; Granoff DM.et al,1980; Viwes M.et al,1997; Jawetz E.et al,1989; Granoff DM.et al,1979)

Haemophilus influenzae taşıyıcılığı epidemiyolojisine katkıda bulunan en önemli faktörler sosyodemografik değişkenlerdir. Küçük çocuklarda *Haemophilus influenzae* tip b taşıyıcılığı mikroorganizmaya maruz kalma olasılığıyla yakından ilişkilidir. Yaş önemli bir belirleyicidir. Taşıyıcılık durumu yaşamın ilk 6 ayında düşüktür, 3-5 yaşları arasında maksimuma çıkar ve yetişkinlerde yavaş yavaş azalır. Kalabalık ve sıkışık topluluklarda *Haemophilus influenzae* tip b hastalığı durumunda taşıyıcılık oranı yüksek olabilir. Amerika Birleşik Devletleri'nde özellikle *Haemophilus influenzae* tip b enfeksiyonlarından sonra taşıyıcılık oranı %50 olarak bulunmuştur. Eş zamanlı üst solunum yolu semptomlarının *Haemophilus influenzae* tip b taşıyıcılığına etkisi tartışmalıdır. (Yogev R.et al,1981)

Çeşitli çalışmalarda taşıyıcılık oranına mevsim, cinsiyet ve ırkın etkisi farklı bulunmuştur. Çalışmaların çoğunda bu faktörlerle *Haemophilus influenzae* tip b

taşıyıcılığı arasında bağlantı saptanamamıştır. Antibiyotik tedavisi Haemophilus influenzae tip b taşıyıcılığını etkileyebilir. Son 10 gün içinde antibiyotik kullanımı boğaz kültüründe Haemophilus influenzae tip b üreme oranını azaltmaktadır. Uygun dozda rifampisin verilirse Haemophilus influenzae tip b boğaz taşıyıcılığı ortadan kaldırılabılır ve temas edenlerde sekonder hastalık riskini azaltabilir. (Ralph D. et al, 1998)



Çocukların çoğunda Haemophilus influenzae tip b taşıyıcılığı geçici olmasına karşın, bazen haftalarca ya da aylarca devam edebilir. Haemophilus influenzae tip bulaşması için yakın temas ve solunum sekresyonlarının paylaşımı gereklidir. Taşıyıcı olduğu bilinen kişiyle duyarlı kişi arasında yakın temas olsa bile, Haemophilus influenzae tip b bulaşması yavaş bir şekilde gelişir ve haftaları alabilir. (Granoff DM. et al, 1980)

Sağlıklı bir insanın Haemophilus influenzae'ya bağlı bir hastalık geliştirebilmesi için, ilk olarak mikroorganizmayla karşılaşması, daha sonra enfeksiyonu edinmesi ve en son solunum yollarının mukoza membranlarının kolonize olması gereklidir. Doğal şartlar altında, H. influenzae sadece insanlarda hastalık yapabilmektedir. Bulaşma kişiden kişiye asemptomatik bir şekilde solunum salgıları yoluyla olmaktadır. Duyarlı kişide hastalık oluncaya kadar birçok bulaşma döngüsü geçirdiğinden, hastalığın inkübasyon süresi bilinmemektedir. Bazı kişilerde, hastalığa sebep olmadan önce bu mikroorganizma aylarca üst solunum yollarında taşınabilmektedir. (Murphy TV. et al, 1985)

Amerika Birleşik Devletleri'nde invazif Haemophilus influenzae tip b hastalığı insidansı 1980'lerin ortalarından itibaren düşmeye başlamıştır. Etkin aşıların kullanımından önce süt çocuklarında ve küçük çocuklarda, Haemophilus influenzae tip b; bakteriyel menenjitin önde gelen etkeni olarak bildirilmekteydi. Her yıl 8000-10000 arası menenjit olgusu ve benzer sayıda da diğer invazif Haemophilus influenzae tip b hastalığı görülmekteydi. Yaklaşık olarak, 5 yaşına gelindiğinde 200 çocuktan birinde invazif Haemophilus influenzae tip b hastalığı görüldüğü bildirilmektedir. Hemen hemen enfeksiyonların tümü 5 yaş altı çocuklarda görülürken kabaca 2/3'ü 12 aylıktan ufak çocuklarda görülmektedir. maksimum atak hızı 6. ve 7. aylar arası değişmektedir. Süt çocukluğu döneminde aşı uygulaması



invazif hastalık oranını %90 oranında düşürürken, konjuge aşılar *Haemophilus influenzae* tip b'nin boğaz taşıyıcılığı oranını %18'den %7'ye düşürmüştür. Konjuge olmayan aşılar boğaz taşıyıcılığını etkilememektedir. (Peltola H.et al,1985;Peltola H.et al,1992;Wenger JD,1998;Peltola H,1998)

Sağlıklı çocuklarda *Haemophilus influenzae* tip b kolonizasyonunun olması, bu çocukların ileride *Haemophilus influenzae* tip b'ye bağlı invazif hastalık geçireceğini göstermemektedir.(Dajani AS.et al,1979)Düşük kolonizasyon oranı gösteren topluluklarda ise hastalığın sık olmadığına dair yayınlar mevcuttur. İnvazif *Haemophilus influenzae* tip b enfeksiyonu, invazif enfeksiyon bulgu ve belirtileriyle normalde steril olması gereken bir vücut sıvısında *Haemophilus influenzae* tip b üretilmesi ya da antijeni tespit edilmesi olarak tanımlanmaktadır. *Haemophilus influenzae* tip b kolonizasyonu tek başına bir risk faktörü değildir. İnvazif *Haemophilus influenzae* tip b enfeksiyonu geçirmiş kişilerle temas dahi ikincil *Haemophilus influenzae* tip b enfeksiyonu riskini belirgin olarak arttırmamaktadır. Tüm *Haemophilus influenzae* tip b enfeksiyonlarının ancak %2-%4'ünü bu ikincil enfeksiyonlar oluşturmaktadır.(Eker DB;2000)

Bugüne dek *Haemophilus influenzae* tip b'ye bağlı invazif hastalık geçiren kişilerde, risk faktörleri olarak yuvaya ya da kreşe devam etme, kalabalık ev ortamında yaşam, ana-babaların eğitim seviyesi ve okula giden kardeşlerin varlığı belirlenmiştir. Yaşamın ilk 6 ayı boyunca anne sütüyle beslenme en önemli koruyucu faktör olarak saptanmıştır. Bu durum anne sütünün içerdiği anti PRP antikorlarının ve diğer antibakteriyel maddelerin emzirme yoluyla bebekte pasif bağışıklık sağlanmasına bağlanmaktadır. Cochi ve arkadaşları tarafından, yuvaya giden 2-5 yaş arası çocuklarda invazif hastalık riskinin çok yüksek olduğu bildirilmektedir. (Osterholm MT.et al,1987;Makintube S.et al,1987;Murphy TV.et al,1987)

Kolonizasyon ve hastalık gelişimi arasındaki ilişki hala tam olarak anlaşılamamıştır. Teksas'ta yapılan bir çalışmada, yuva çocuklarının ortalama *Haemophilus influenzae* tip b kolonizasyon oranı %10 iken, hiçbir invazif *Haemophilus influenzae* tip b enfeksiyonu görülmemiştir. Çalışmanın yapıldığı 18 ay boyunca 18-35 aylık çocukların %71'inin, 36-71 aylık çocukların %48'inin belirli bir süre için *Haemophilus influenzae* tip b ile kolonize oldukları bildirilmektedir.

İnvazif *Haemophilus influenzae* tip b enfeksiyonlarının görüldüğü yuvalardaki çocuklar ile invazif hastalık geçiren çocukların kardeş ve ana babalarında oldukça yüksek oranda kolonizasyona rastlanmaktadır.(Murphy TV.et al,1985;Taştan Y.et al,2000)

Başka bir çalışmada invazif hastalık riski büyük miktarda bakteri bulaşması ve eş zamanlı olarak viral enfeksiyonun geçirilmesiyle oldukça artmaktadır.

3.MATERYAL VE METOT

Haemophilus influenzae'nin nasofaringeal taşıyıcılığının sıklığını araştırmak amacıyla planladığımız bu çalışma 2004 yılının mart-mayıs ayları arasında İstanbul ilinin Anadolu yakasında ana sınıfı ve kreşlere devam eden 3-6 yaş arasındaki 500 çocuk üzerinde yapıldı.

1)Deneklerin Seçimi: Çalışma için Anadolu yakasında bulunan Fehmi Ekşioğlu anasınıfı, Cenap Şehabettin anasınıfı, Bebe kreş, Kaptan Hasanpaşa anasınıfı, Haydarpaşa anaokulu, Göztepe anaokulu, Anafen anaokulu, Zihnipaşa anaokulu, Pembe Köşk anaokulu, Atılğan anaokulu, Erenköy anaokulu seçildi. Bu kreşlerden rastgele örnekleme yöntemiyle, çocuklardan nasofaringeal sürüntü örnekleri toplandı.

2)Risk Faktör Sorgulaması: Nasofarinks sürüntü örnekleri almaya başlamadan önce tüm çocuklara H.influenzae için risk faktörlerini içeren bir anket uygulandı. Ankette kardeş sayısı, aileden herhangi birinin sigara kullanıp kullanmadığı, kardeş sayısı, son 10 gün içinde antibiyotik alıp almadığı soruldu ve bu soruları içeren anket formunu aileleri ile beraber doldurmaları istendi. Bu anketle birlikte çocukların ailelerine çalışma hakkında bilgi verildi ve örnek almak için izin istendi.

3)Nasofarinks sürüntü örneklerinin alınması: Eküvyon çubuğu dil ekarte edildikten sonra dikkatlice ve ağız içinde diğer bölgelere değdirilmemeye özen gösterilerek nasofarinkse sokuldu. Bu noktada nasofarinkse ulaşıldığında nazıkçe 2-3 defa sağa sola döndürülerek sürüntü alındı ve aynı şekilde dil, damak, diş gibi diğer bölgelere değdirilmeden çıkarılarak örnek alma işlemi tamamlandı.

3.1.Materyaller

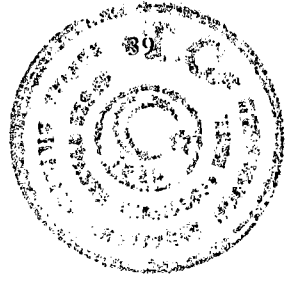
3.1.1.Besiyerleri

Transport besiyeri

Koyun kanlı agar besiyeri

Bacitracin+Vancomycin+Clindamycin ilaveli at kanlı çikolata agar besiyeri

Jeloz



3.1.2. Antiserumlar

3.1.3. X, V, X+V faktörleri içeren diskler

1. Besiyerleri

Koyun kanlı agar besiyeri:

Brain Heart Infusion Agar(Oxoid)	47gr
Distile su	1000ml
Steril koyun kanı	70ml

Brain Heart Infusion Agar , distile suda eritilir, pH=7.4'e ayarlanır. 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilir. Otoklavdan çıkarıldıktan sonra 45-50 °C'ye kadar soğuyunca defibrine koyun kanı ilave edilir. Steril petrilere dağıtılır.

Bu besiyeri, bakterinin V faktörüne olan ihtiyacını süt anne olayı ile araştırmak ve bakterinin Haemophilus cinsi olup olmadığını anlamak amacıyla kullanılmıştır.

Bacitracin+Vancomycin+Clindamycin ilaveli çukolata agar besiyeri

Brain Heart Infusion Agar(Oxoid)	47gr
Distile su	1000ml
Steril at kanı	70ml
Bacitracin	300mg
Vancomycin	5mg/lt
Clindamycin	1mg/lt

Brain Heart Infusion Agar distile su içinde eritilir. pH = 7.4'e ayarlanır. 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilir. Otoklavdan çıkarıldıktan sonra 90-100 °C'de defibrine at kanı ilave edilir. At kanı İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi'nden temin edilmiştir. At kanı laboratuvara ulaştırılana kadar pıhtılaşmaması için önceden steril edilen cam boncuklar kullanılmıştır.



50 °C'ye kadar soğuyunca bacitracin, vancomycin, clindamycin ilave edilir ve steril petrilere dağıtılır.

Bu besiyeri balgam ve boğaz salgısı gibi başka bakterilerle karışık maddelerde H.influenzae'yi ayırmak amacıyla kullanılmıştır. Haemophilus türleri için çok seçici bir besiyeridir.

2.Antiserumlar

H.influenzae polivalan, a,b,c,d,e,f tip antiserumları(Difco), izole edilen H.influenzae suşlarının tiplendirilmesinde kullanılmıştır.

X+V faktör(Difco)

V faktör(Difco)

X faktör(Difco)

Bakterinin X,V,X+V ihtiyaçlarını belirlemek amacıyla hazır diskler kullanılmıştır.

3.1.4.Kullanılan Diğer Gereçler

Tez çalışması süresince aşağıdaki araç ve gereçlerden yararlanıldı. Otoklav,etüv,manyetik karıştırıcı,değişikcam malzemeler, değişik kimyasal malzemeler, eküvyon, benmari, deepfreeze, distile su cihazı, hassas terazi

3.1.5.Örneklerinincelenmesi

Örnekler kısa süre içinde laboratuvara ulaştırılarak, çukulatamsı agar besiyerine ekildi. 37 °C'de %5-10 CO₂'li ortamda 24-48 saat inkübe edilen plaklar daha sonra makroskobik ve mikroskobik olarak incelendi.

48 saat sonra etüvden çıkarılan besiyerinde küçük, homojen ve şebnem tanesine benzeyen koloniler seçildi. Bu kolonilerden hazırlanan preparatlar Gram yöntemiyle boyandı.

Mikroskopik incelemede Gram negatif, küçük, ince ve bazen pleomorfik özellik gösteren kokobasiller görüldüğünde *Haemophilus* cinsi bir mikroorganizma olabileceği düşünülerek bu yönde ileri incelemeye alındı.

Mikroskopik inceleme sonucunda *Haemophilus* olabileceği düşünülen kolonilerden koyun kanlı agara ve çukulatamsı agara pasaj yapıldı.

Haemophilus cinsi bakteriler çukulata agarda ürerken, diğer besiyerinde üremedi. Kanlı agarda üreme gözlenen örnekler *Haemophilus* olmayacakları düşünülerek değerlendirme dışı tutuldu. Bu besiyerinde *H. haemolyticus* ve *H. parahaemolyticus* hemoliz yapar.

Elde edilen bakterinin X,V ve X+V'nin her ikisine birden ihtiyacı olup olmadığını belirlemek amacıyla uydulaşma testi yapıldı. Bunun için bakterinin McFarland'ın 0.5 numaralı standart bulanıklığına eşit bulanıklıkta bir süspansiyonu hazırlandı. Bu süspansiyondan jelozun her yerine eşit olacak şekilde yayılarak ekim yapıldı. X,V ve X+V faktörleri içeren diskler birbirinden 2-2.5 cm uzaklıkta yerleştirildi. 37 °C'de %5-10 CO₂ ortamında 48 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda X faktörü içeren diskin etrafındaki üreme X faktörüne ihtiyacı,V faktörü içeren diskin etrafındaki üreme V faktörüne ihtiyacı, X+V faktörü içeren diskin etrafındaki üreme her iki faktöre olan ihtiyacı göstermektedir.

Hem X hem de V faktörü içeren disklerin çevresinde üreyen bakteri *H. influenzae*, X diskinin etrafında üremeyip diğer disklerin etrafında üreyenler *H. parainfluenzae* olarak idantifiye edildi.

Bakterinin V faktörüne olan ihtiyacı süt anne olayı ile de araştırıldı. Bu amaçla bir *Staphylococcus aureus* suşu incelendi. *Haemophilus* olduğu şüpheli örnek, koyun kanlı agara paralel çizgiler halinde ekildi. *S. aureus* bunları kesecek şekilde yukarıdan aşağı doğru dik olarak ekildi. 48 saat 37 °C'de inkübe edildi. Süre sonunda *S. aureus* yakınında çiğ tanesi gibi şeffaf koloniler şeklinde, biraz uzağında ise küçük koloniler şeklinde beliren bakterilerin *Haemophilus* cinsi ve V faktörüne ihtiyaç duyduğu saptandı.

Katalaz etkinliğini göstermek için bir lam üzerine ince bir cam çubukla saf kültürden bir miktar bakteri alınarak aktarılmıştır. Üzerine bir damla %3 H₂O₂ damlatılmıştır. Karıştırılmadan gaz çıkıp çıkmadığı incelenmiştir. Gaz çıkması olumlu sonuç göstergesidir.

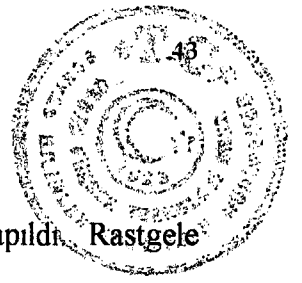
Oksidaz etkinliği Oxoid firmasından temin edilen oksidaz stickler yardımıyla kontrol edilmiştir. Saf kültüre değdirilen sticklerin koyu mor bir renk alması pozitif sonuç göstergesidir.

Koyun kanlı agarda üremeyen, at kanlı çukulata agarda üreyen, at kanlı agarda hemoliz yapmayan, X+V faktörleri içeren diskin etrafında uydulaşma gösteren, katalaz, oksidaz pozitif reaksiyon veren bakteri H.influenzae olarak tanımlandı.

H.influenzae olarak tanımlanan suşlar daha sonra serolojik olarak tiplendirmeye tabi tutuldu. H.influenzae'nın tiplendirilmesi için lam aglütinasyonu yöntemi uygulandı. Bu iş için Difco Haemophilus influenzae tip a,b,c,d,e,f ve polivalan (types a,b,c,d,e,f) antiserum kullanıldı. Deney şu şekilde yapıldı:

Temiz bir lam alınarak iki ayrı yere birer damla %0.9'luk serum fizyolojik ve yanına bir damla H.influenzae polivalan antiserumu damlatıldı. Bakteri her ikisi ile ayrı ayrı karıştırıldı. Serum fizyolojikteki aglütinasyonun yokluğu, antiserumdaki aglütinasyonun varlığı pozitif olarak kabul edildi. Bu şekilde H.influenzae olduğu kesinleşen ve spontan aglütinasyon görülmeyen bakteri, sırasıyla a,b,c,d,e,f antiserumlarıyla denendi. Bunların herhangi birindeki aglütinasyona göre bakterinin serotipi saptandı.

%0.9'luk serum fizyolojikte aglütinasyon görüldüğünde, yani spontan aglütinasyon varlığında, bakteri birkaç defa çukulata agara tekrar pasaj yapıldı. Üreyen bakteriler %0.9'luk serum fizyolojik ile yeniden denendi. Tekrar aglütinasyon görüldüğünde tiplendirilemeyen H.influenzae olarak değerlendirilmeye alındı. Birden fazla antiserumla aynı anda aglütinasyon veren H.influenzae'lerde yine tiplendirilemeyenler olarak değerlendirildi.



4.BULGULAR

Çalışmamız 3-6 yaş arası 500 sağlıklı çocuk üzerinde yapıldı. Rastgele örnekleme metodu ile seçilen 500 çocuktan 242'si kız, 258'i erkek idi.

Tablo.4.1. Seçilen 500 çocuğun yaş ve cinsiyete göre dağılımı

Yaş grubu	Kız(n)	Erkek(n)	Toplam(n)
3 yaş	56	48	104
4 yaş	40	52	92
5 yaş	68	77	145
6 yaş	78	81	159
Toplam	242	258	500

Bu çocuklardan yapılan nasofarinks sürüntü kültürlerinde, 50'si(%20.6) kız, 58'i(%22.4) erkek olmak üzere toplam 108(%21.6) çocukta Haemophilus cinsi mikroorganizma üretilmiş,393(%78.6) çocukta ise üreme saptanamamıştır.

Tablo.4.2. Nasofarinks kültür sonuçları

Cinsiyet	Sayı	Üretilen H.influenzae kökenlerinin sayısı	Oranı(%)
Kız	242	51	21.07
Erkek	258	60	23.25
Toplam	500	111	22.2

Tablo.4.3. Boğaz kültürü değerlendirilen çocukların cinsiyete ve yaşa göre dağılımı

	Cinsiyet				
Yaş	kız		erkek		toplam
	sayı	yüzde	sayı	yüzde	Sayı-yüzde
3yaş	56/11	19.6	48/12	25	104(22.11)
4yaş	40/15	37.5	52/20	38.46	92(38.04)
5yaş	68/13	19.1	77/14	18.18	145(18.62)
6yaş	78/12	15.38	81/14	17.28	159(16.35)
Toplam	242	100	258	100	500

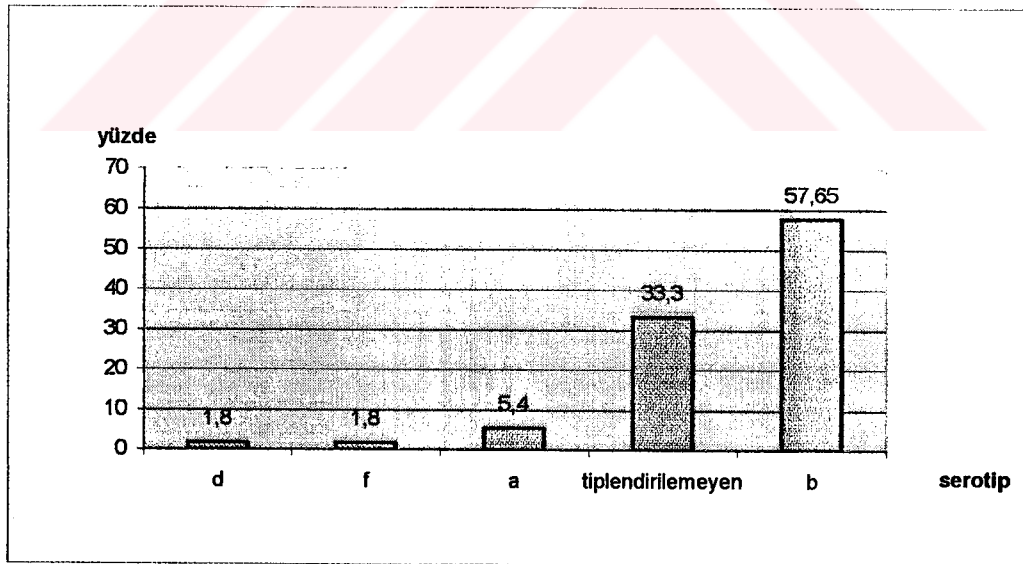


Elde edilen 111 H.influenzae suşunun serotipleri kapsül polisakaritlerine göre lam aglütinasyon yöntemi ile belirlendi.

Buna göre elde edilen H.influenzae suşlarının 64'ü(%57.65) tip b, 6'sı(%5.4) tip a, 2'si (%1.80) tip d, 2'si(%1.80) tip f, 37'si(%33.3) tiplendirilemeyen suş bulunmuştur. Tip c ve tip e'den ise izolasyon yapılamamıştır.

Tablo.4.4. Elde edilen H.influenzae suşlarının serotiplere göre dağılımı

	serotipler						
	a	b	c	d	e	f	serotiplendirilemeyen
sayı	6	64	0	2	0	2	37
yüzde	5.40	57.65	0	1.80	0	1.80	33.3

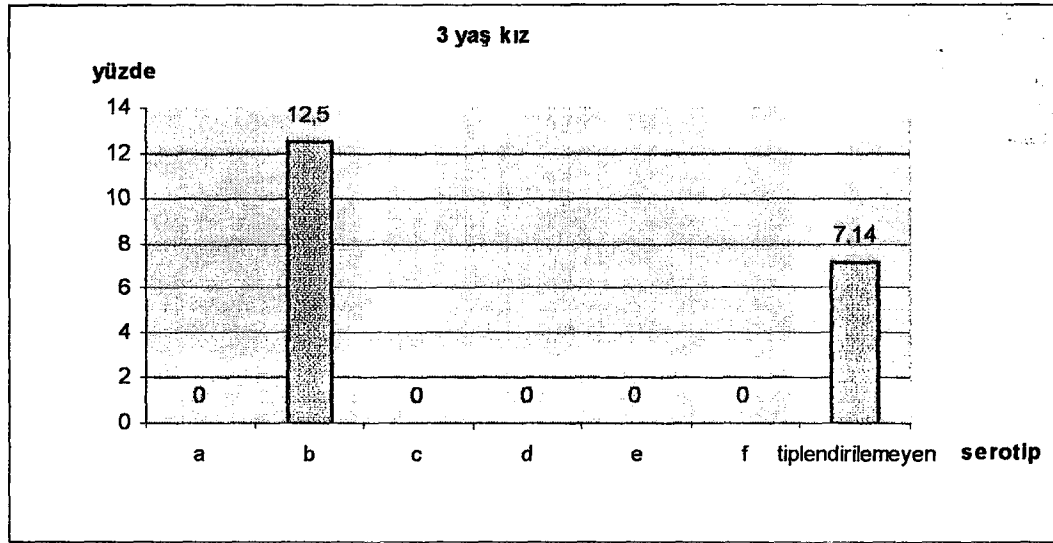


Grafik.4.1. İzole edilen H.influenzae suşları içinde herbir serotipin dağılımı

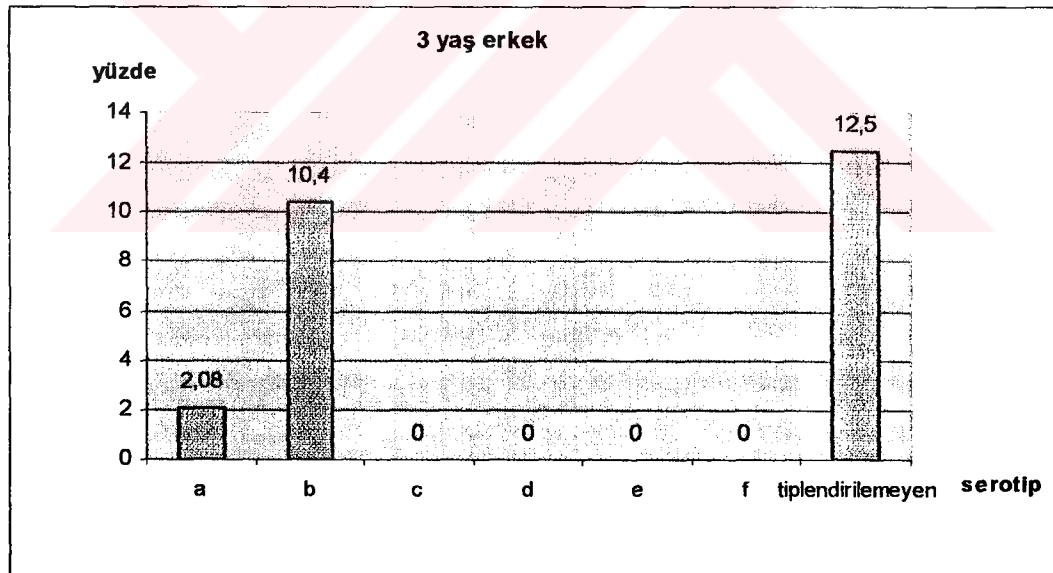
Tespit ettiğimiz oranların yaşlara ve serotiplere göre oranlarını tablo ve grafik halinde gösterecek olursak aşağıdaki sonuç ortaya çıkar:

Tablo.4.5. Tespit edilen serotiplerin yaş ve cinsiyete göre dağılımı

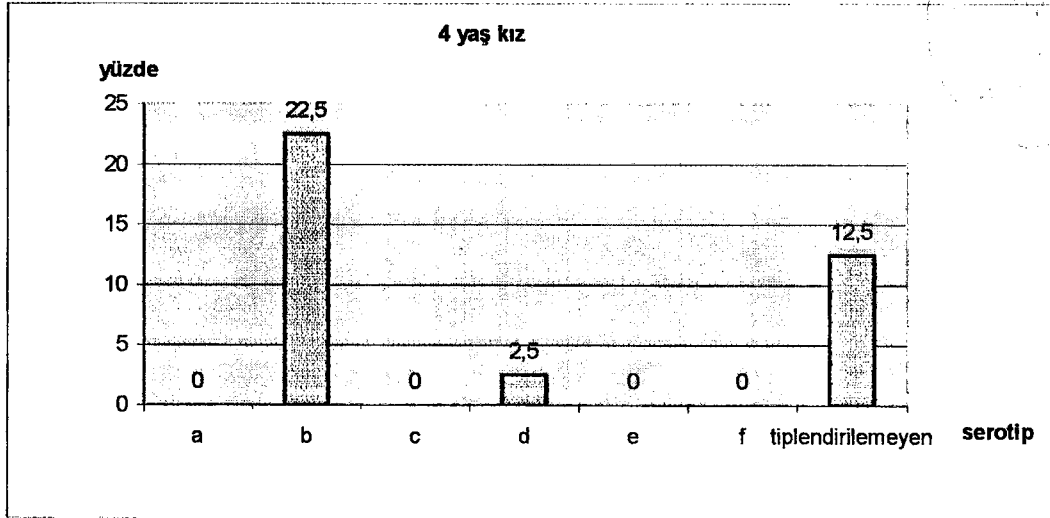
yaş		toplam	a	b	c	d	e	f	tiplendirilemeyen
3	56kız	11(%19.6)	-	7 (%12.5)	-	-	-	-	4(%7.14)
	48erkek	12(%25)	1(%2.08)	5 (%10.4)	-	-	-	-	6(%12.5)
4	40kız	15(%37.5)	-	9 (%22.5)	-	1 (%2.5)	-	-	5(%12.5)
	52erkek	20(%38.4)	1(%1.9)	11 (%21.1)	-	1 (%1.9)	-	-	7(%13.46)
5	68kız	13 (%19.11)	2(%2.94)	6 (%8.8)	-	-	-	1 (%1.47)	4(%5.88)
	77erkek	14(%18.18)	-	8(%10.3)	-	-	-	-	6(%7.79)
6	78kız	12(%15.38)	-	8(%10.2)	-	-	-	1(%1.28)	3(%3.84)
	81erkek	14(%17.28)	2(%2.46)	10(%12.3)	-	-	-	-	2(%2.46)



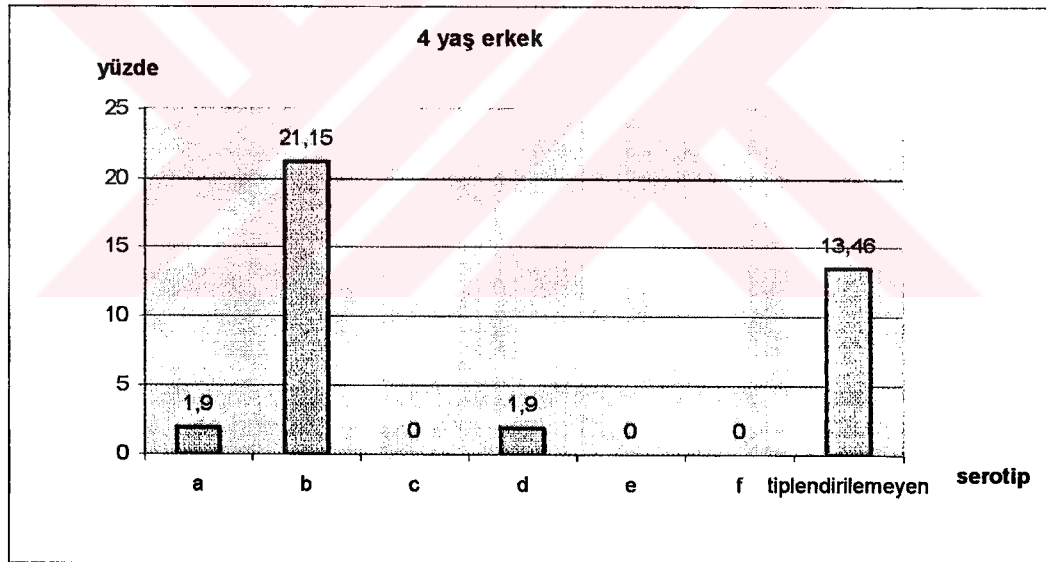
Grafik.4.2. 3yaşındaki kız çocuklarında tespit edilen H.influenzae serotiplerinin 3 yaş grubu içindeki yüzde oranları



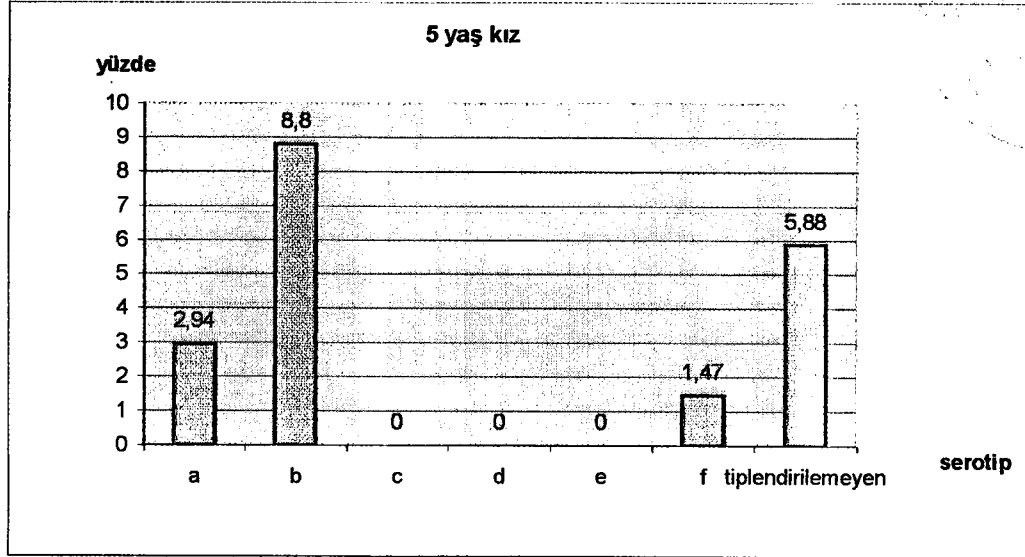
Grafik.4.3. 3 yaşındaki erkek çocuklarında tespit edilen H.influenzae serotiplerinin 3 yaş grubu içindeki yüzde oranları



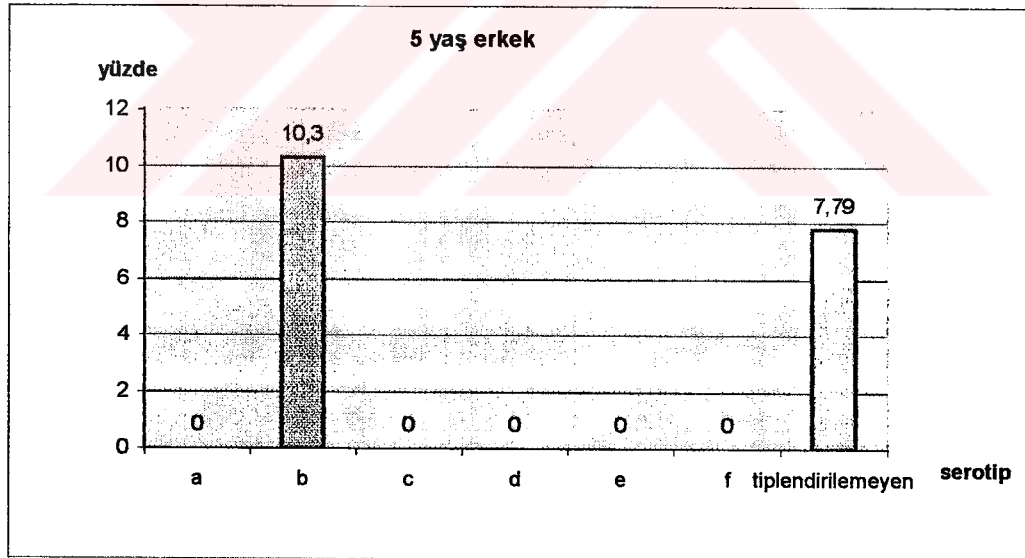
Grafik.4.4. 4yaşındaki kız çocuklarında tespit edilen H.influenzae serotiplerinin 4 yaş grubu içindeki yüzde oranları



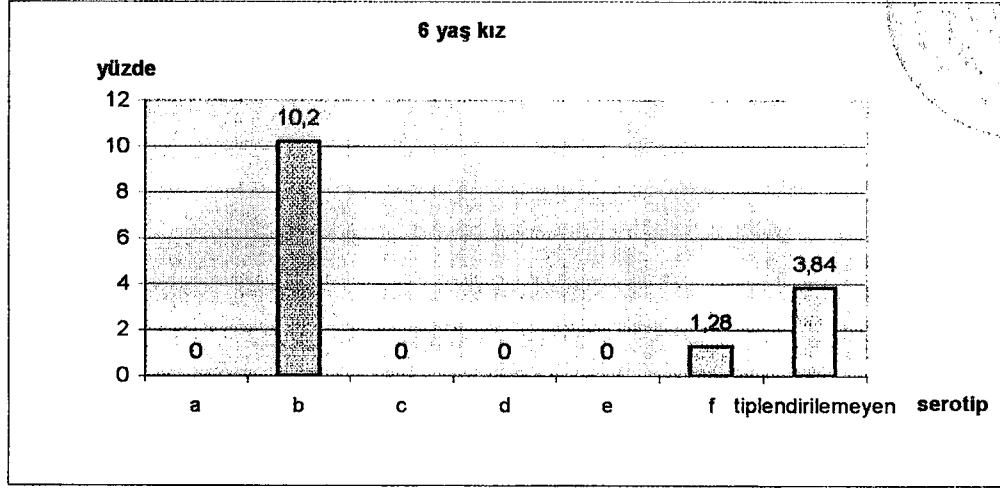
Grafik.4.5. 4yaşındaki erkek çocuklarında tespit edilen H.influenzae serotiplerinin 4 yaş grubu içindeki yüzde oranları



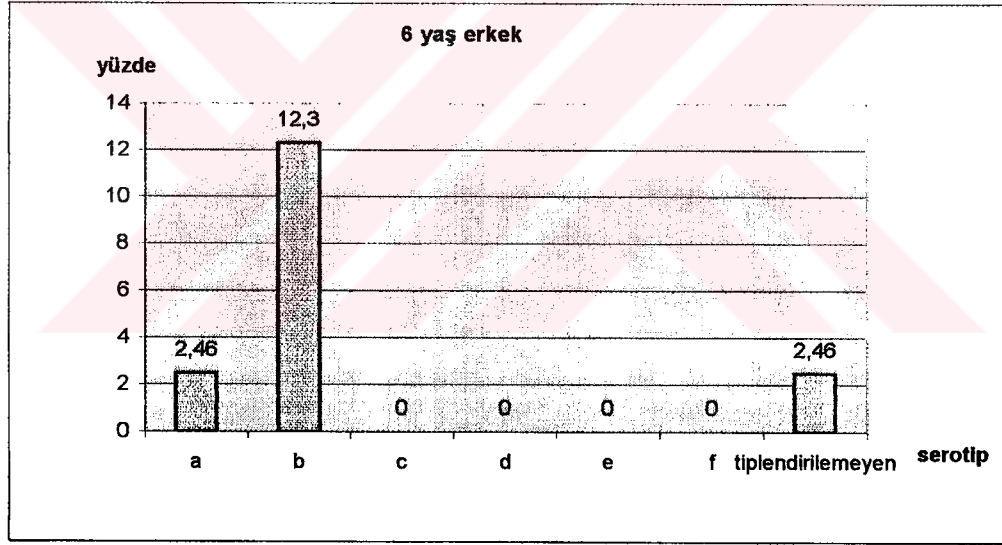
Grafik .4.6. 5yaşındaki kız çocuklarında tespit edilen H.influenzae serotiplerinin 5 yaş grubu içindeki yüzde oranları



Grafik.4.7. 5yaşındaki erkek çocuklarında tespit edilen H.influenzae serotiplerinin 5 yaş grubu içindeki yüzde oranları

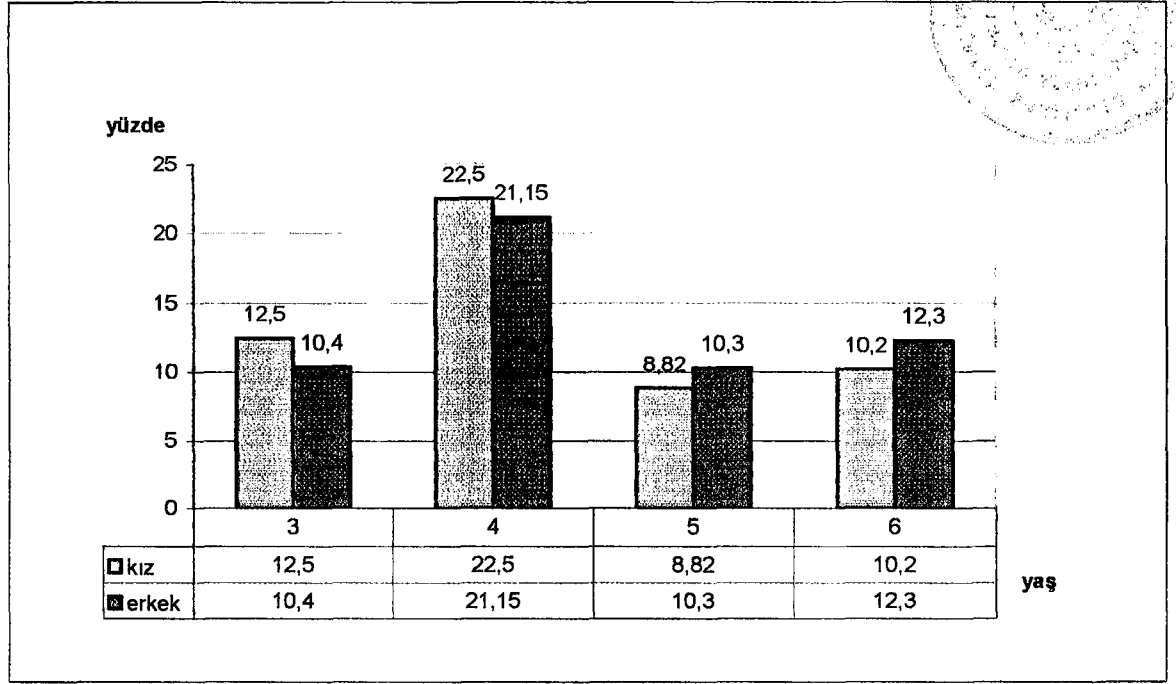


Grafik .4.8. 6 yaşındaki kız çocuklarında tespit edilen H.influenzae serotiplerinin 6 yaş grubu içindeki yüzde oranları



Grafik.4.9. 6yaşındaki erkek çocuklarında tespit edilen H.influenzae serotiplerinin 6 yaş grubu içindeki yüzde oranları

Tip b suşlarının yaş gruplarına göre dağılımına bakıldığında ise 4 yaşındaki 40 kızın 9'unda (%22,5) ve 4 yaşındaki 52 erkeğin 11'inde (%21,1) görülmesiyle 4 yaş grubu tip b taşıyıcılığında en riskli grup olarak tespit edilmiştir.



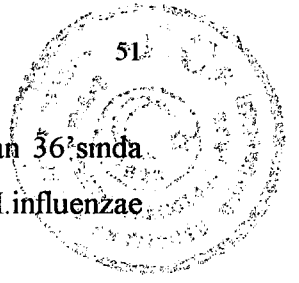
Grafik.4.10. Hib suşlarının yaşlara göre dağılımı

H.influenzae taşıyıcılığına etki eden risk faktörleri irdelendiğinde şu sonuçlar elde edilmiştir:

Kardeş sayısının H.influenzae taşıyıcılığına etkisi incelenmiş ve şu sonuçlar elde edilmiştir: Çalışmaya katılan 146 çocuğun hiç kardeşi yoktu, bu grupta 28(%19.17) çocukta H.influenzae izole edildi. 354 çocuğun ise en az bir kardeşi vardı. Bu grupta ise 83(%23.44) çocukta H.influenzae izole edildi.

Sigara kullanımının H.influenzae taşıyıcılığına etkisi incelenmiş ve şu sonuçlar bulunmuştur: Ailesinde sigara kullanımı bulunan 76 kişinin 12'sinde(%15.7), ailesinde sigara kullanımının bulunmadığı 424 kişinin 96'sında(%23.34) H.influenzae izole edilmiştir.

Hib açısından incelendiğinde 76 kişinin 10'unda(%13.15), 424 çocuğun 54'ünde(%12.73) Hib izole edilmiştir.



Son 30 gün içinde solunum yolu rahatsızlığı geçiren 126 çocuktan 36'sında (%28.57), rahatsızlık geçirmeyen 374 çocuğun 75'sinde(20.05) H.influenzae bulunmuştur.

Hib açısından incelendiğinde, 126 çocuğun 17'sinde(%13.4) 374 çocuğun 47'sinde(%12.56) Hib tespit edilmiştir.





5.TARTIŞMA

Bu bölümde

- H. influenzae'nin çocuklarda bulunma oranları,
- Tip b'nin bulunma oranları,
- Diğer tiplerin bulunma oranları
- Tiplendirilemeyen kökenlerin bulunma oranları ,
- H. influenzae'nin taşınmasına etki eden(yaş, aile, kardeş sayısı, cinsiyet, yuvaya devam etme, ebeveynin sigara içmesi, üst solunum yolları enfeksiyonları) etmenlerden çalışmamızla ilgili olanlar dikkate alınarak tartışılmıştır.

Çocuklarda üst solunum yolunun normal florası hayatın erken dönemlerinde kademe kademe oluşmaktadır. Ne yazık ki bu işlemin belirleyicisi çok az anlaşılmıştır. Diğer yandan normal flora bakterileri çeşit ve sayı bakımından kişiden kişiye çok fazla farklılık göstermemektedir.

Üst solunum yolunun birçok bölümü için bu bakterilerin bir bölümü veya tamamı patojen değildir. Fakat S.pneumoniae, H. influenzae ve M.catarrhalis gibi daha patojen mikroplarda sağlıklı şahısların nazofarenkslerine oturup kolonileşebilmektedir. Aynı bakteriler nazofarenkse komşu ve normalde steril olan bölgelere ulaştıklarında orta kulak iltihabı, konjunktivit, pnömoni, sinüzit ve menenjit gibi enfeksiyonlara neden olmaktadır. Özellikle çocuklarda fırsatçı patojen bakterilerin taşıyıcılık oranlarındaki farklılıklar, orta kulak iltihabı veya tekrarlayan solunum yolu hastalıklarının gelişim riskinin artışıyla öncü rolü oynayabilmektedir.

Sağlıklı çocukların büyük bir çoğunluğu üst solunum yollarında H. influenzae'yi taşımakta ve bu bakteriler seçici antibiyotik içeren besiyerinde kültür örneklerinin ekilmesiyle kolay bir şekilde ayrılabilir.

H.influenzae, dünya ve ülkemiz için önemli patojenlerden birini oluşturmaktadır. Yurdumuzda bu bakterinin üretilmesi konusunda Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda yapılan çalışmalar ve özellikle de Mamal M. tarafından yapılan çeşitli yayınlardan sonra H.influenzae ülkemizde de ilgi ile çalışılan bir konu olmuştur. Bizim çalışmamız sağlıklı çocuklar üzerinde yapılmıştır.



1982 yılında yuva çocuklarında yapılan bir çalışmada H. influenzae'nin farenkste taşınma oranı %60.7 olarak bulunmuştur.

Schwartz ve Rodriquez, 5 aylık ila 4 yaşa sahip 90 sağlıklı çocuğun farenksinde 23(%26) H. influenzae elde etmişlerdir.(Schwartz RH.et al,1984)

Trottier ve arkadaşları bir kreşteki sağlıklı çocukların nazofarenks florasında H. influenzae'nin taşıyıcılık oranını %39 olarak bulmuşlardır.(Trottier S.et al,1989)

Lerman ve arkadaşları 4-7 yaş arasındaki 1084 sağlıklı çocuktan 409'unda (%37.7) H. influenzae elde etmişlerdir.(Lerman SJ.et al,1979)

Howard ve arkadaşları, 6 yaşından küçük 996 çocuktan 304'ünde (%30.5) H. influenzae ayırmışlardır. Scheifele ve Fussel, yaşları 2 aylıktan 18'e kadar değişen 305 sağlıklı çocuğun boğazında tüm Haemophilus bakterilerinin taşıyıcılık oranını ise %25 olarak bulmuşlardır.(Howard AJ.et al)

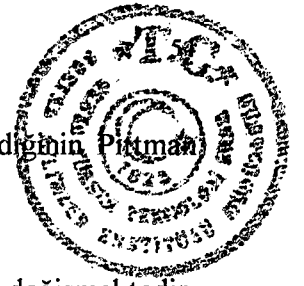
Scwartz RH ve arkadaşları pürülan nasofarinjiti olan 80 çocukta %37.5 oranda H.influenzae izole etmişlerdir ve %31.2 oranda da H.parainfluenzae izole edilmiştir.(Schwartz RH.et al,1984)

Başka bir çalışmada Scheifele DW ve arkadaşları üst solunum yolu enfeksiyonu olan 305 çocuktan 75(%24.6)'sında H.influenzae izole etmiştir.(Scheifele DW.et al,1981)

Yarkin,F çalışmasında 220 çocuğun 81(%36.8)'inde H.influenzae izole etmiştir.(Yarkin F;1990)

Bizim çalışmamızda 3-6 yaş arasındaki sağlıklı çocuklarda H.influenzae taşınma oranı %22.2 olarak bulunmuştur.

Braude'ın Microbiology kitabında H. influenzae ile insandaki hastalık arasındaki gerçek ilişkinin Pittman tarafından açıklığa kavuşturulduğu, bu araştırmacının hem kapsüllü hem de kapsülsüz şekillerin varlığını bildirdiği ve kapsül polisakkaritlerine dayanarak H. influenzae'nin 6 ayrı kapsüllü tipini (a-f) tarif ettiği yazılmaktadır. Ayrıca Braude, bu kitabında invazif hastalığın büyük bir kısmının H.



influenzae'nin kapsüllü türleri ile ve özellikle tip b ile meydana geldiğinin Pittman tarafından da tekrar tekrar doğrulandığını belirtmiştir.

Dünyada H. influenzae tip b(Hib)'in sıklığı ve tipi ülkeye göre değişmektedir. Fakat belirli bir bölgeye bağlı olmaksızın hastalığın %90-95'i 5 yaşından önce meydana gelmektedir.

Hib ile olan en önemli invaziv hastalık menenjitir. Hib meninjitisi burun-boğaz taşınmasının olduğu yerlerde sık görülmektedir.

Eker,D ve arkadaşları , Silivri bölgesindeki 2-72 ay arası 6380 çocuğu yansıtan çalışmasında tüm çocuklarda H.influenzae tip b taşıyıcılığını %21.9 olarak bulmuştur. Yaş grupları arasındaki en yüksek taşıyıcılık oranı %30.3 ile 13-24 ay arası çocuklarda en düşük taşıyıcılık ise 48 aydan büyük çocuklarda (%15.7) saptanmıştır.(Eker D,2000)

Er ve ark. , sağlıklı yuva çocuklarında 0-3 yaş grubunda %12.5, 4-5 yaş grubunda ise %1.7 oranında H.influenzae tip b taşıyıcılığı bulmuştur.Er ve ark.'nın çalışmasında deneklerin kısa bir süre önce antibiyotik kullandıkları belirtilmektedir ki bu da gerçek taşıyıcılık oranının tespit edilmesini engellemiş olabilir.(Er E,1994)

Değişik ülkelerde yapılan çalışmalarda, sağlıklı çocuklarda H.influenzae tip b taşıyıcılık oranı %2.2-%7.7 arasında bulunurken (Turk DC; Gomez E et al), yuva çocuklarında bu oran daha yüksek olmak üzere %2-18 arasında bildirilmektedir. (Murphy TV et al; Lerman SJ et al) İnvazif H.influenzae tip b hastalığının görüldüğü yuvalarda ve bunların ailelerinde ise taşıyıcılık oranı (%38.1-%70) oldukça yüksek saptanmıştır. (Turk DC; Granoff DM et al)

H.influenzae boğaz taşıyıcılığı sürekli olmamaktadır. Yapılan bir çalışma göstermiştir ki oyun çocuklarının %71'i , okul öncesi çocukların ise %48'i çalışma süresince (18ay) en az bir kez H.influenzae tip b ile kolonize olmuşlardır.(Murphy TV)Bu çalışmalarda gözlenen ilginç bulgu, taşıyıcı olan sağlıklı yuva ve yetimhane çocuklarında hiçbir invaziv hastalığa rastlanmamasıdır.(Turk DC; Murphy TV et al)

Yaşa göre dağılıma bakıldığında 3(%22.11) ve 4(%38.04) yaşında en yüksek oranda taşıyıcılık gözlenmiştir. Taşıyıcılığın küçük yaşlarda daha sık olması genel olarak literatür bilgisiyle uyumludur.(Er E et al,1994;Ralph D et al; Turk DC; Vives M et al;Gomez E;1998)

Istre ve ark. Yaşa bağımlı H.influenzae enfeksiyon riskinin motor aktivitenin kazanılmasıyla ilişkili olabileceğini öne sürmüştür.(Istre G et al,1985) Motor aktivitenin artması temas edilen kişi sayısının ve bunun sonucunda H.influenzae ile karşılaşmanın olasılığını arttırabilir.

Lerman ve arkadaşları, 4-7 yaş arası 1084 sağlıklı çocuktan 22'sinde(%2) oranında Hib elde etmişlerdir.(Lerman SJ.et al,1979)

Stephenson ve arkadaşları, 14 yaşından küçük 832 yuva çocuğunun boğazını incelemiş ve Hib taşıyıcılığını %15.1 olarak bulmuşlardır. (Stephenson WP.et al,1985)

Murphy ve arkadaşları, yuvaya devam eden 66 çocuğun nazofarenksinde ortalama %10 Hib elde etmişlerdir.(Murphy TV.et al,1985)

Yogeu ve arkadaşları, 9 aylık ila 6 yaş arası yuva çocuklarında yaptıkları araştırmada, Hib taşıyıcılık oranını %36 olarak bulmuşlardır.(Yogue R,et al,1981)

Turk bir çalışmada, 127 sağlıklı çocuğun nazofarenks örneklerinin 3'ünde(%2.4), diğer bir çalışmada 473 nazofarenks örneklerinin 14'ünde (%2.9) Hib izole etmiş ve yetimhane çocukları üzerinde yaptığı araştırmada ise tip b taşıyıcılığını %70 olarak bulmuştur.(Turk DC;1963)

Mpairwe yaptığı çalışmada, yetimhane çocuklarının nazofarenkslerinde tip b taşıyıcılık oranını %53 olarak bulmuştur.(Mpairwe Y,1970)

Trottier ve arkadaşları, sağlıklı çocukların nazofarenkslerinde %2 oranında tip b taşıyıcılığı bulmuşlardır.(Trottier S,et al,1989)

Yapılan bir çalışmaya göre oyun çocuklarının %71'i, okul öncesi çocukların ise %48 'i çalışma süresince en az bir kere H.influenzae tip b ile kolonize olmuşlardır.

Howard ve arkadaşları, 6 yaşından küçük 996 sağlıklı çocuğun 11'inde (%1.1) tip b elde etmişlerdir. Bu kaynakta Michaels ve arkadaşları 3 ay ile 16 yaşa sahip 1307 sağlıklı çocuğun nasopharynxinde tip b taşıyıcılık oranını %3.2 olarak bulmuşlardır.(Howard AJ,et al)

Howard ve arkadaşları, sağlıklı çocukların nasopharynxlerinde yaptıkları tip b'yi en fazla 2-4 yaş arasında elde etmişlerdir.(Howard AJ,et al)

Bizim çalışmamızda Hib ile ilgili oran, 500 çocukta 64(%12.8) olarak tespit edilmiştir. En yüksek oran 3 ve 4 yaş grubunda tespit edilmiştir.

Serotip b ile meydana gelen H. influenzae infeksiyonları birinci sırayı oluştururken, diğer serotipler de enfeksiyona neden olmaktadır.

Tip b dışındaki diğer serotiplerin taşıyıcılığı ile ilgili bilgiye, sağlıklı çocuklarda H. influenzae'nin üst solunum yollarında taşınması üzerine yapılmış yayınlar ise şöyledir:

Howard ve arkadaşları, 6 yaşından küçük sağlıklı 996 çocukta elde ettikleri 304 H. influenzae kökeninin 2'sinin(%0.2)tip d, 2'sinin (%0.2) tip e ve 2'sinin tip f olduğunu belirlemişlerdir. (Howard AJ,et al)

Lerman ve arkadaşları, 16 okulda yaptıkları çalışmada 4-7 yaş grubu 1084 sağlıklı çocuğun nasopharynxinde 6(%0.5) tip e ve 10(%0.9) tip f kökeni elde etmişlerdir. Çocukların hiçbirinin a,c veya d kökeni taşımadıklarını belirtmişlerdir.(Lerman SJ,et al,1979)

Trottier ve arkadaşları sağlıklı çocukların nasopharynxlerinde %4 oranında tip f kapsülünü taşıyan H. influenzae kökeni elde etmişlerdir.(Trottier S,et al,1989)

Bizim çalışmamızda elde edilen 11 suştan 64'ü(%57.65) tip b,6'sı(%5.4)tip a, 2'si(%1.80)tip d,2'si(%1.80) tip f,37'si(%33.3) tiplendirilemeyen suş olarak bulunmuştur.

Tiplendirilemeyen *H. influenzae*, üst solunum yolunun normal florasının bir parçası olup artan oranda patojen olarak tanınmaktadır. Tiplendirilemeyen *H. influenzae*, orta kulak yangılı hastaların orta kulak sıvılarından en çok ayrılan bakteridir. Her ne kadar bu patojen; orta kulak iltihabı, sinüzit, bronşit ve pnömoni gibi birçok solunum yolu enfeksiyonlarına iştirak ediyorsa da, %80'e varan taşıyıcılık oranı ile de sağlıklı çocukların üst solunum yollarından sıklıkla ayrılabilir.

Solunum yolu örneklerinden bol miktarda tiplendirilemeyen *H. influenzae* eldesinin bakteriyolojik olarak kuvvetlendirilen orta kulak iltihabı ile önemli derecede alakalı olduğu belirtilmiştir.

Faden ve arkadaşları, küçük çocuklarda üst solunum yolu enfeksiyonu sırasında orta kulak patojenlerinin nasopharynx taşıyıcılığının arttığını;ancak otitise meyilli çocukların sağlıklı oldukları zaman bile yüksek oranda tiplendirilemeyen *H. influenzae* taşıdıklarını göstermişlerdir. Yüksek oranda taşınan bu bakterinin tekrarlayan ve süregen seyreden orta kulak iltihabının ana sebebi olabileceğine işaret etmişlerdir.(Faden H,et al,1997)

Spinola ve arkadaşları, çocukların tiplendirilemeyen *H. influenzae* kökenlerini haftalar , aylar boyunca aldıklarını ve onları kaybedip yeni kökenler taşıdıklarını ve eski kökenlerini tekrar kazandıklarını göstermişlerdir.

Nasopharynxde tiplendirilemeyen *H. influenzae*'nin devir ve değişiminden sorumlu bağışıklıkla ilgili ve ilgisiz etmenler henüz tespit edilememiştir. Bernstein ve arkadaşları, serumda bakterisid etki gösteren antikorun tiplendirilemeyen *H. influenzae*'nin kolonileşmesindeki rolünü 26 çocukta incelemişler ve serum bakterisidal antikorunun, nasopharynxde bu bakteri kökeninin kolonileşmesine engel teşkil etmediğini bildirmişlerdir.

Howard ve arkadaşları, 6 yaşından küçük, sağlıklı 996 çocuğun nasopharynxinden elde ettikleri 304 H. influenzae kökeninden 281'inin(%92.4) tiplendirilemeyen kökenler olduğunu göstermişlerdir.(Howard AJ,et al)

Lerman ve arkadaşları, 4-7 yaşa sahip 1084 sağlıklı çocuğun nasopharynxlerinde 371(%34.2) tiplendirilemeyen H. influenzae kökeni taşıdıklarını bulmuşlardır.(Lerman SJ,et al,1979)

Bizim çalışmamızda tiplendirilemeyen suşlar diğer suşlar arasında %33.3 oranında tespit edilmiştir.

Sağlıklı çocukların üst solunum yollarında patojen bir bakteri olan H. influenzae'nin taşınmasına sebep olarak çeşitli hazırlayıcı etmenler üzerinde durulmuştur:

Yaş, aile, kardeş sayısı, cinsiyet, ırk, mevsim, etnik grup, yuvaya devam etme, ebeveynin sigara içmesi, emzirme, sosyoekonomik durum, kapalı toplum(belirli bir bölgede sınırlanmış belirli bir ırka ait toplum), açık toplum(kapalı toplumun karşısı) ve gelenek gibi etmenler üzerinde en fazla durulmuştur.

Kardeş sayısının H.influenzae taşıyıcılığına etkisi incelenmiş ve şu sonuçlar elde edilmiştir :

Çalışmaya katılan 146 çocuğun hiç kardeşi yoktu, bu grupta 28(%19.17) çocukta H.influenzae izole edildi. 354 çocuğun ise en az bir kardeşi vardı. Bu grupta ise 83(%23.44) çocukta H.influenzae izole edildi. Araştırmamızda kardeşi olanlarla olmayanlar arasında H.influenzae taşıyıcılığı açısından bir fark görülmemiştir.

Sigara kullanımının H.influenzae taşıyıcılığına etkisi incelenmiş ve şu sonuçlar bulunmuştur :

Ailesinde sigara kullanımı bulunan 76 kişinin 12'sinde (%15.7), ailesinde sigara kullanımının bulunmadığı 424 kişinin 99'sında(%23.34) H.influenzae izole

edilmiştir. Hib açısından incelendiğinde; ailesinde sigara kullanan bulunan 76 kişinin 10'unda(%13.15), bulunmayan 424 çocuğun 54'ünde(%12.73) Hib izole edilmiştir.

Son 30 gün içinde solunum yolu rahatsızlığı geçiren; 126 çocuktan 36'sında (%28.57), rahatsızlık geçirmeyen 374 çocuğun 75'sinde(20.05) H.influenzae bulunmuştur. Hib açısından incelendiğinde, 126 çocuğun 17'sinde(%13.4) 374 çocuğun 47'sinde(%12.56) Hib tespit edilmiştir.

Eş zamanlı geçirilmekte olan viral enfeksiyonların mukoza bariyerini bozarak enfeksiyonu kolaylaştırdığı ve invaziv hastalık riskini arttırdığı bilinmektedir. Son 30 gün içinde herhangi bir alt veya üst solunum yolu enfeksiyonu geçiren çocukların taşıyıcılık oranlarında belirgin bir fark gözlenmedi. Bu sonuç literatürle uyumlu bulundu.(Lerman SJ et al;Gessner BD et al)

H. influenzae'nin hastalık oluşturmaya ve taşınmasına etki eden faktörlerden biri olan cinsiyetin rolüne de dikkat çekilmiştir. Bu hususta yapılan tüm çalışmalar dikkate alındığında, erkeklerde bu bakterinin daha fazla hastalığa yol açtığı ve kolonize olduğu bilinmekle beraber bu oran düşüktür.

Araştırmada, 242 kız çocuğunun 51(%21.07)'sinde, 258 erkek çocuğun 60(%23.25)'inde H. influenzae üretilmiş ve bunun cinsiyete göre dağılımında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Araştırmamızda elde edilen sağlıklı çocuklardaki yüksek H.influenzae taşıyıcılığına etki eden değişkenler araştırıldığında literatürde uyumlu olarak cinsiyetin etkili bir faktör olmadığı anlaşıldı.(Er E et al;Turk DC; Vives M et al;Gomez E et al)

Çalışmada, 242 kız çocuğunun 30(%12.3)'unda, 258 erkek çocuğun 34(13.17)'inde tip b üretilmiştir.Bunun cinsiyete göre dağılımında anlamlı bir fark görülmemiştir.

Araştırmada, erkek ve kız çocukları arasında genel taşıyıcılık ve tip b taşıyıcılığı arasında anlamlı fark görülmemiştir. Bu durum diğer araştırmalarla da uygunluk göstermiştir.

Taşınma oranındaki değişiklikler ile ilgili olarak açıklanan diğer bir ihtimal, kültür tekniklerindeki farklılıklardır. Daha önce Haemophilus cinsi bakterilerin ayırımı başarı ile kullanılan bacitracin+vancomycin+clindamycin ilaveli at kanlı çukulatamsı agar çalışmamızda da H. Influenzae'nin ayırımı başarı ile kullanılmıştır.

Yuvaya devam etme, Hib'de dahil pek çok patojen mikropla karşılaşma riskini arttırmaktadır. Yuvada bebekler ve küçük çocuklar arasında ki bağlantının yakın oluşu da dikkate alınmalıdır.

Literatürde okula veya yuvaya giden olgularda daha sık invaziv H.influenzae enfeksiyonu görüldüğüne dair çalışmalar bulunmaktadır. Okula ya da yuvaya giden asemptomatik taşıyıcı bireyler birbirlerine bu etkeni bulaştırabilirler. (Murphy TV, et al, 1985)

Fleming ve arkadaşları, yuvaya devam etme ile çocukluk çağı üst solunum yolu enfeksiyonları arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. Çalışmalarında, 5 yaşın altındaki çocuklarda üst solunum yolu ve kulak enfeksiyonlarının %9-14'ünün yuvaya devam etmenin bir sonucu olarak geliştiğini göstermişlerdir.

Bizim araştırmamızda sağlıklı yuva çocuklarındaki oran %22.2 olarak bulunmuştur.

Er, Emine çalışmasında, yuva ve okul çocuklarının boğaz salgılarından genel olarak %27 oranında H. influenzae elde edilmiştir. (Er E, 1994)

Bu sonuç bizim bulduğumuza yakın bir sonuçtur.

Hib taşıyıcılığının tarım bölgelerine bakarak endüstri bölgelerinde daha yüksek oranda olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamız ve daha önceki çalışmaların büyük bir bölümü Türkiye'nin en büyük endüstri şehri olan İstanbul'da yapılmıştır. Bu konuda tarım bölgelerine ait çalışma olmadığından sonuçlarımız karşılaştıramamıştır.



H. influenzae'dan ileri gelen enfeksiyon hastalıkları ve bu bakterinin taşıyıcılığı mevsimlere bağlı olarak da değişiklikler göstermektedir. Bu ilişki ilk defa Henderson ve arkadaşları tarafından 1982 yılında ileri sürülmüş ve çalışmalarında Temmuz-Eylül arasındaki dönemde H. influenzae'yi düşük oranda bulmuşlardır.

Taşıyıcılık araştırması yapılan çeşitli çalışmalarda da mevsim olarak sonbahar, kış ve ilkbahar seçilmiştir.

Stephenson ve arkadaşları, 1982 yılı Mart-Nisan aylarında 14 yaşından daha küçük olan yuva çocuklarının pharynx florasını incelemişler ve H. influenzae'nin taşıyıcılık oranını %60.7 olarak bulmuşlardır.(Stephenson WP,et al,1985)

Trottier ve arkadaşları, bir kreşteki sağlıklı çocukların nasopharynx florasını 4 kış ayı boyunca tekrarlayan örneklemelerle incelemiş ve H. influenzae'nin ortalama taşıyıcılık oranını %39 bulmuşlardır.(Trottier S,et al,1989)

Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Yuvasına devam eden değişik yaş gruplarındaki sağlıklı çocuklar arsında 1992 kış döneminde H. influenzae'nin bulunma sıklığı araştırılmıştır. 2-5 arasında değişen 168 çocuğun boğaz salgısı örnekleri alınarak incelenmiş ve bunların %87'sinde (%51.8) H. influenzae tip b ayrılmıştır.

Er,E ve arkadaşları araştırmasında 1993 Mayıs- Haziran dönemine rastlayan aynı yuvadaki 4-5 yaş grubu çocukların boğazında H. influenzae tip b'ye rastlanma oranı %1.7olarak bulunmuştur.

Sonuçların farklı olması ise iki sebebe bağlıdır. Birincisi tip b taşıyan çocuklara antibiyotik tedavisinin uygulanmış olması , çalışmanın kış döneminde yapılmış olmasıdır.

6.SONUÇLAR



Haemophilus influenzae erken çocukluk döneminde üst solunum yolları rahatsızlıkları ve meninjit olmak üzere birçok hastalığa yol açmaktadır.

Bu çalışma 3-6 yaş arasındaki, yuvaya devam eden , sağlıklı çocuklar üzerinde H.influenzae boğaz taşıyıcılığının sıklığını araştırmak amacıyla yapılmıştır. Ayrıca çeşitli risk faktörleri açısından da değerlendirme ye gidilmiştir.

Tüm çocuk yaş grubunda H.influenzae taşıyıcılığı %22.2 olarak bulunmuştur. Yaş gruplarına göre değerlendirme yapıldığında 4 yaş grubunda %38.04'le en yüksek taşıyıcılık gözlenmiştir.Serotipler arasında bir kıyaslamaya gidildiğinde,%57.65 oranıyla en çok tip b'nin taşındığını onu %33.3 oranıyla tiplendirilemeyen suşların izlediğini görmekteyiz.

H.influenzae taşıyıcılığına etki eden risk faktörleri irdelendiğinde şu sonuçlar elde edilmiştir:

Kardeş sayısının H.influenzae taşıyıcılığına etkisi incelenmiş ve şu sonuçlar elde edilmiştir: Çalışmaya katılan 146 çocuğun hiç kardeşi yoktu, bu grupta 28(%19.7) çocukta H.influenzae izole edildi. 354 çocuğun ise en az bir kardeşi vardı. Bu grupta ise 83(%23.44) çocukta H.influenzae izole edildi. Sigara kullanımının H.influenzae taşıyıcılığına etkisi incelenmiş ve şu sonuçlar bulunmuştur: Ailesinde sigara kullanımı bulunan 76 kişinin 12'sinde(%15.7), ailesinde sigara kullanımının bulunmadığı 424 kişinin 99'sında(%23.34) H.influenzae izole edilmiştir.

Hib açısından incelendiğinde 76 kişinin 10'unda(%13.15), 424 çocuğun 54'ünde(%12.73) Hib izole edilmiştir.

Son 30 gün içinde solunum yolu rahatsızlığı geçiren 126 çocuktan 36'sında (%28.57), rahatsızlık geçirmeyen 374 çocuğun 75'sinde(20.05) H.influenzae bulunmuştur.

Hib açısından incelendiğinde, 126 çocuğun 17'sinde(%13.4) 374 çocuğun 47'sinde(%12.56) Hib tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Akan E.: Tıbbi Mikrobiyoloji, Oba Basımevi-Konya, 218-234, 1986
2. Akçakaya N, Mamal Torun M, Söylemez Y ve ark.: İstanbulda yuva çocuklarında *Haemophilus influenzae* sıklığı. Cerrahpaşa Tıp Fak. Der. 1994, 25: 587-590
3. Anonym. MMWR: Mortality and Morbidity Weekly Report 1997; 46(3): 62-65
4. Bakteriler, virüsler ve bunlarla oluşan infeksiyon hastalıkları. I-II, İkinci Baskı, İstanbul Dergah Yayınları S: 645, 1987
5. Barbour ML, Phil D : Conjugate vaccines and *Haemophilus influenzae* type carriage. Emer Infect Dis 1996 ; 2(3) ; 1-8
6. Baron EJ, Finegold SM: Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. Ed. Manning Seight Ed. The C.V. Mosby Company. S415, 1990
7. Baysallar M: *Haemophilus* cinsi bakteriler. *Haemophilus* İnfeksiyonları Simpozyumu. Editörler: Ang Ö, Mamal M. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, No: 24, S: 20, 1995
8. Bergeron MG, Simard P, Provencher P: *Influenzae* of Growth Medium and Supplement on Growth of *H. influenzae* and on Antibacterial Activity of several Antibiotics. J. Clin. Microbiol. 25: 650, 1987
9. Bilgehan H.: Klinik Mikrobiyoloji. Özel Bakteriyoloji ve Bakteri İnfeksiyonları. Barış Yayınları. Fakülteler Kitabevi). Basım. S: 138, 1995
10. Broude AI.: Microbiology, 387-392, 1985
11. Campos J, Garcia TS, Gairi JM et al: Multiply resistant *H. influenzae* tip b causing meningitis: Comparative clinical and laboratory study. J Pediatr 1986 108: 897-902
12. Campos JM: *Haemophilus*. Manuel of Clinical Microbiology. Ed: Murray PR et al. 6th edition. ASM Press. S: 556, 1995
13. Campos JM: *Haemophilus*. Manuel of Clinical Microbiology. Ed: Murray PR et al. 6th edition. ASM Press. S: 556, 1995
14. Christie AB.: Infection diseases, 605-608, New York, 1980
15. Dajani AS, Asmar BI, Thiromoorthi MC: Systemic *H. influenzae* disease: An overview. J Pediatr. 1979; 3; 355-64

16.Duangmani C, Echeverria P. *Haemophilus influenzae* type b resistant to ampicillin and chloramphenicol in an orphanage in Thailand, *Lancet*, 1214-1217,1980

17.Er E, Torun MM : Değişik yaş gruplarındaki sağlıklı çocukların üst solunum yollarında bulunan *Haemophilus influenzae* ve *Moraxella catarrhalis* üzerine bir çalışma. Yüksek lisans tezi

18.Eker D:İki ay- 6 ayş arası çocuklarda *Haemophilus influenzae* tip b boğaz taşıyıcılığının araştırılması,yüksek lisans tezi,2000

19.Yarkın F:Bölgemizde çocukluk çağında görülen üst solunum yolu enfeksiyonlarında ve menenjitlerde *Haemophilus influenzae* insidansı ve antibiyotik duyarlılıkları,uzmanlık tezi,1990

20.Faden H, Duffy L, Wasielewski R etal: The relationship between nasopharyngeal colonization and the development of otitis media in children. *J Infect Dis* 1997; 175(6):1440-5

21.Gerald L. Mandell, R. Gordon Douglas, JR., John E. Bennett: Principles and Practice of Infectious Diseases. Broadway, Newyork, Churchill Livingstone, 1999:1090-27

22.Gomez E,Moore A, Sanchez J et al:The epidemiology of *H.influenzae* type b carriage among infants and young children in Santo Domingo,Dominican Republic.*Pediatr Infect Dis j*,1998;17:782-6

23.Gotoff SP.:On the surface of *H.influenzae*.*J. Infect.Dis.*143:5,747-748,1981

24.Granoff DM, Daum RS : Spread of *Haemophilus influenzae* type b: Recent epidemiologic and therapeutic considerations. *J Pediatr* 1980; 97(5): 854-60

25.Granoff DM, Gilsdorf J, Gessert C: *Haemophilus influenzae* type b diseases in a day care center . Eradication of carrier state by rifampin . *Pediatrics* 1979,63:397-402

26.Granoff DM, Gilsdorf J.:*Haemophilus influenzae* type b in a day care center. *Pediatrics*,65:1,65-67,1980

27.Granoff DM, Cates Kl.: *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide vaccines.*J.Pediatrics*,107:3,330-335,1985

28.Gratten M, Lupiwa T.:Distribution and relationship to serotype of *Haemophilus influenzae* biotypes isolatedfrom upper respiratory tracts of children and adults in Papua New Guinea, *J.Clin.Microbial*.19:4,526-528,1984

29.Hirschmann JV, Everett Ed.: *Haemophilus influenzae* infections in adults. *Medicine*, 58:1,81-92,1979

30.Howard BJ:*Haemophilus*.In *clinical and Pathogenic Microbiology*.Howard BJ,Klass J, Rubin SJ, Weissfeld AS, Tilton RC, .St Louis, Washington DC,Toronto.The CV Mosby Company S:279-287,1987

31.Howard AJ, Dunkin KT, Millar GV:Nasopharyngeal carriage and antibiotics resistance of *Haemophilus influenzae* in healthy children.

32.Howard;B.: *Haemophilus*. *Clinical and Pathogenic microbiology*, Howard, BJ,Klaas J, Rubin S, Weisfeld AS, Tilton RC, Toronto, The CV Mosby Company , 279-87, 1987

33.Ister GR,Corner JS,Broome CV et al:Risk factors for primary invasive *Haemophilus influenzae* disease :Increased risk from day care attendance and school aged household members.*J Pediatr* 1985,106;190-5

34.Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA, Brooks Gf, Butel JS, Ornston LN: *Medical microbiology*;18th edition. Prentice Hall International Inc. 1989;19;226-30

35.Joklik WF, Willet PH; Amos DB.:*Zinsser Microbiology*.507-515,1984

36.Juni BA, Rysavy JM.:Rapid biotyping of *H.influenzae* and *H.parainfluenzae* with pathotecstrips and spot biochemical test.*J.Clin.Microbiol*.15:5,976-978,1982

37.Kaythy H, Eskola J, Peltola H, Stout MS, Samuelson JS, Gordon LK.:Immunogenicity in infants of a vaccine compased of *Haemophilus influenzae* type b capsular polysaccharide mixed with DPT or conjugated to diphteria toxoid, *J Infect Dis* .155:100-106,1987

38.Kılıçturgay K:Meninjitler,İnfeksiyon Hastalıkları.Editörler: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M.Nobel Tıp Kitabevleri,1.basım,S:869,1996

39.Kilbourn JP, Haas H.: *Haemophilus influenzae* biotypes and chronic bronchitis. *American Rev.Respir Dis*.126,1093-1094,1983

40.Killian M.:A taxonomic study of the genus *Haemophilus* with the proposal of a new species, *J Gen Microbiol*.93:9-62, 1976

41.Killian M.:*Haemophilus*.*Microbiology*.Philadelphia, WB Saunders company,1982,387-393

42.Killian M,Sqrensen I,Fredrikson W.:Biochemical Charesterictics of 130 Recent Isolates from *H.influenzae* Menengitis.*J.Clin.Microbiol*.9:409,1979

43. Killian M: *Haemophilus*. Microbiology. 1th Press. Philadelphia, WB Saunders Company, 1982
44. Konemann E, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC: *Haemophilus-In: Color atlas and Text Book of Diagnostic Microbiology*: 4th edition. 279, 1992
45. Kuklinska D., Killian M.: Relative Proportion of *Haemophilus* Species in the throat of healthy children and adults. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 3:249, 1984
46. Lennette EH, Balows A, Hausler WJ.: *Manuel of Clinical Microbiology*, 387-392, 1985
47. Lerman Sj, Kucera JC, Brunken JM: Nasopharyngeal carriage of antibiotics resistant *H. influenzae* in Healthy children. *Pediatrics* 64:287, 1979
48. Levinson EW, Jawetz E: *medical Microbiology and Immunology*. East Norwalk, CT, Appleton & Lange ;20-1
49. Li K, Dashefsky B.: *Haemophilus influenzae* type b colonisation in household contacts of infected and colonized children enrolled in day care. *Pediatrics*. 78:1, 15-19, 1986
50. Mackowiak PA: The microbial flora. *N Engl J Med* 1982; 307:83-93
51. Makintube S, Istre GR, Ward JI: Transmission of invasive *Haemophilus influenzae* type b disease in day care settings. *J Pediatr* 1987; 111: 180-6
52. Mamal M : İnsan dan izole edilen *Haemophilus* cinsi bakteriler üzerine çalışmalar. Doktora tezi, İstanbul, 1986
53. Mamal M, Öz S.: *Haemophilus influenzae* type b biyotip 5'in etken olduğu bir kolesistit olgusu. *İnfeksiyon Dergisi*. 154:267; 1987
54. Mamal Torun M, Akçakaya N, Ergin S, Sevme R, Söylemez Y, Çokuğraş H, Tüysüz B: Cerrahpaşa Tıp fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Polikliniğine başvuran üst solunum yolu infeksiyonu bulunan çocuklarda *H. influenzae* aranması. *Turkish J Infect.* 1992; 6(1):27-30
55. Mamal M.: İnsan dan izole edilen *Haemophilus* bakteriler üzerine çalışmalar. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını* No:24, 1995
56. Mamal Torun M: *Haemophilus influenzae* infeksiyonlarının epidemiyolojisi. *Haemophilus influenzae* infeksiyonları simpozyumu. Editörler: Anđ Ö, Mamal Torun M. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını*, No:24, S33, 1995

57. Mamal Torun M, Yücel A: *Haemophilus influenzae* infeksiyonlarının patogenezi. *Haemophilus influenzae* infeksiyonları simpozyumu. Editörler: Anđ Ö; Mamal Torun M. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını, No:24,S46,1995

58. Mamal Torun M: *Haemophilus influenzae* infeksiyonlarının laboratuvar tanımı . *Haemophilus influenzae* infeksiyonları simpozyumu . Editörler: Anđ Ö; Mamal Torun M. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını,No:24, S76, 1995

59. Manheim W:*Haemophilus* cinsi. Bergey's manual of Systematic Bacteriology, Volume1,(Ed:Noel R.Krieg, Editor-in Chief JohnG. Holt).Baltimore, Williams and Wilkins Company,551-569,1984

60.Mastro T, Nomani N, Ishaq Z, et al.Use of nasopharyngeal isolates *S.pneumoniae* and *H.influenzae* from children in Pakistan for surveillance for antimicrobial resistance.*Pediatr Infect.Dis J* 1993;12:824-30

61.Mehtar S, Afshar SA.: biotyping of *Haemophilus* using API 10s- an epidemiological tool.*J.Clin.Pathol.*36:96-99,1983

62.Milgrom,F.Flanagan,TD.: *Medical Microbiology*,339-343,1982

63. Moxon ER: *Haemophilus influenzae*. Mandell GL; Douglas Rg; Benett JE: *Principles and Practice of infectious disease*. 3th edition. Churchill Livingstone Inc.S1729,1990

64. Möller LVM, Alphen L, Grasseiler M, Dankert J.: N-Acetyl -D-Glucoseamine Medium Improves Recovery of *Haemophilus influenzae* from Sputa of patients with cystic fibrosis. *J.Clin.Microbiol.*31:1952,1993

65:Mpairwe Y: Observation on the nasopharyngeal carriage of *H.influenzae* type b in children in Kampala, Uganda *J Hyg Camp* 68:337,1970

66. Murphy TF: *Haemophilus* in infectious diseases. Eds. Gorbach SL, Barlett JG, Blacklow NL:Philadelphia W Saunders Company S1521,1992

67. Murphy TV, Granoff D, Chrane DF et al: Pharyngeal colonisation with *Haemophilus influenzae* type b in children in a day care center without invasive diseases *J Pediatr* 1985,106:712-6

68.Murphy TV, et al:Pharyngeal colonisation with *H.influenzae* type in children in day care center without invasive disease. *J Pediatr* 106:712,1985

70. Murphy TV, Clements JF, Breedlove JA et al: Risk of subsequent disease among day care contacts of patients with systemic *Haemophilus influenzae* type b disease . *N Engl J med* 1987; 316:5-10

71. Murphy TV, Pastor P, Medly J et al: Decreased Haemophilus colonization in children vaccinated with Haemophilus influenzae type b conjugate vaccine. J Pediatr 1993; 122:517-23

72. Murphy TV, et al: Invasive Haemophilus influenzae Type Disease in children in Dallas country, J. Infect. Dis. 165, 1992

73. Osterholm MT, Pierson LM, White KE et al: the risk of subsequent transmission of Haemophilus influenzae type b disease among children in day care N Engl J Med 1987; 316:1-5

74. Peltola H, Kilpi T, Anttila M: Rapid disappearance of Haemophilus influenzae type b meningitis after routine childhood immunisation with conjugate vaccines. Lancet 1992; 340:592-94

75. Peltola H: Haemophilus influenzae type b disease and vaccination in Europa: lessons learned. Pediatr Infect Dis J, 1998 ; 17:S 126-132

76. Peltola H, Kaythy H: Prevention of Haemophilus influenzae type bacteremic infections with the capsular polysaccharide vaccine. N. Engl. J. Med. 310: 1561-1566, 1984

77. Powell M, Carouzou CK.: Resistance of clinical isolates of H. influenzae in United Kingdom 1986, British. Med. J. 295: 176-178, 1987

78. Prober CG, Ipp MM. Haemophilus influenzae type b in a nursery school: The value of biotyping. Pediatrics. 69: 215-218, 1982

79. Qadri SMH, Talbot D.: Evaluation of the phage coagglutination test for the rapid serotyping of H. influenzae. Med. Microbiol. Immunol. 172: 161-164, 1983

80. Ralph D. Feigin, James D. Cherry: Textbook of Pediatric Infectious Diseases. Philadelphia, Pennsylvania; W.B. Saunders Company, 1998: 1464-82

81. Roberts DE, Higgs E.: Selective medium that distinguishes Haemophilus influenzae from Haemophilus parainfluenzae in clinical specimens: its value in investigating respiratory sepsis. J. Clin. Pathol. 40: 75-76, 1987

82. Samuel L. Katz, Anne A Gershon, Peter J. Hotez: Krugman's Infectious Diseases of children. St. Louis, Missouri; Mosby-Yearbook, Inc, 1998: 140-56

83. Sarah S. Long, Larry K. Pickering Charles K. Prober: Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases. San Francisco, Churchill Livingstone, 1999: 1090-27



84. Scheifele DW, Ward JI. Advantage of latex agglutination counter-current immunoelectrophoresis in the detection of *Haemophilus influenzae* type b antigen in serum. *Pediatrics* 68:888-890, 1981

85. Schwartz RH, Rodriguez WJ: *Haemophilus* species in the Pharynx *Arch Otolaryngol* 110:676, 1984

86. Simon HB, Southwick FS: *H. influenzae* in hospitalized adults: Current perspectives. *American J. Med.* 69:219-225, 1980

87. Slack MPE, *Haemophilus*. Topley & Wilson's Principles Systematic of Bacteriology, Virology and Immunity, 8th Ed. Vol. 2 Perker MT, Duerden BI (eds) London S356, 1990

88. Stephenson WP, et al: Pharyngeal carriage rates of *H. influenzae* type b and non-b, and prevalence of ampicilline-resistant *Haemophilus influenzae* among healthy day-care in central Massachusetts. *Am J Epidemiol* 122:868, 1985

89. Sutter VL: Anaerobes as normal oral flora. *Rev Infect Dis* 1994; 6 suppl 1:S62-6

90. Takal AK, Meurman O, Kleemola M, et al. Preceding respiratory infections predisposing for primary and secondary invasive *Haemophilus influenzae* type b disease. *Pediatr Infect Dis J* 1993; 12:189-95

91. Taştan Y, Alikasıfoğlu M, İlter Ö et al: Natural immunity to *Haemophilus influenzae* type among healthy children in İstanbul, Turkey. *Indian pediatr*; 2000, 37:414-6

92. Tebbut GM. Evaluation of some methods for the laboratory identification of *H. influenzae*. *J. Clin. Microbiol.* 36:991-995, 1983

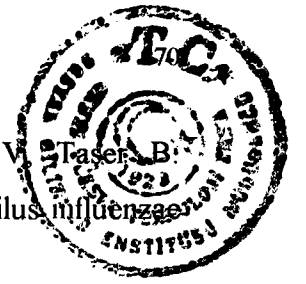
93. Trottier S., Stenberg K, Suanborg-Eden C: Turnover of non-typable *H. influenzae* in the nasopharynx of healthy children. *J. Clin. Microbiol.* 27:2175, 1989

94. Turk DC: Nasopharyngeal carriage of *H. influenzae* type b. *J Hyg Camp* 61:247, 1963

95. Turk DC: The pathogenicity of *H. influenzae*. *The Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 1-12, 1984

96. Turk DC: The Pathogenicity of *Haemophilus influenzae*. *J Med Microbiol* 1984, 18:1

97. Unat EK: Bakteriyolojisi ve virolojisi insanda hastalık yapan Bakteriler ve virüsler ve bunlarla oluşan infeksiyon hastalıkları, 2. baskı, İstanbul Dergah Yayınevi, 75-125, 511-651.



98. Vahaboğlu MH , Mülazimoğlu L, Yıldırım I, Avkan V, Taser B.
Nasopharyngeal carriage rate and antimicrobial resistance of *Haemophilus influenzae* type b in İstanbul-Türkiye. Marmara Med J 1994 ;7(2) :78-80

99. Wallace RJ, Musher DM: *H. influenzae* infections in adults: Characterization of strains by serotypes, biotypes and beta lactamase production. J. Infect. Dis. 144:2, 101-104, 1981

100. Wenger JD: Epidemiology of *Haemophilus influenzae* type b disease and Impact of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines in United States and Canada . Pediatr Infect Dis J ,1998; 17: S132-6

101. Wilson GS, Miles AA, Parker MT. Topley and Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity, 379-390, 8th edition, 1983

102. Wives M, Garcia Me, Saenz P et al: Nasopharyngeal colonisation in Costa Rican children during the first year of life. Pediatr Infect Dis J 1997; 16: 852-

103. Yogev R, Melick C, Kabat K : Nasopharyngeal carriage of *Haemophilus influenzae* type b: Attempted Eradication by cefaclor or rifampin. Pediatrics 1981, 67: 430-3