

99746

T.C
ANADOLU ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDE
HAEMOPHILUS INFLUENZAE İZOLASYONU

UZMANLIK TEZİ

DR. GÜL DURMAZ

ANADOLU ÜNİVERSİTESİ
MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ESKİŞEHİR-1990

I Ç İ N D E K İ L E R

	<u>SAYFA</u>
I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	2-39
2.1. Giriş ve Tarihçe.....	2-4
2.2. Sınıflandırma.....	2-4
2.3. Mikrobiyolojik Özellikler.....	4-11
2.4. Genetik	11-12
2.5. Antijenik Yapı.....	12-13
2.6. Patogenez.....	13-16
2.7. Yaptığı Hastalıklar.....	16-21
2.8. Diğer Haemophiluslar.....	21-23
2.9. Tanı Yöntemleri.....	24-29
2.10. Epidemiyoloji.....	29-31
2.11. Antimikrobiyal Duyarlılık ve Tedavi.....	31-34
2.12. Immunité ve Korunma.....	34-39
III. GEREÇ VE YÖNTEM.....	40-44
IV. BULGULAR.....	45-51
V. TARTIŞMA.....	52-59
VI. SONUÇLAR.....	60-61
VII. ÖZET.....	62-63
VIII. KAYNAKLAR.....	64-70

1. G I R I Ş

H.influenzae, *Haemophilus* genusundan, küçük, pleomorfik, sporsuz, hareketsiz ve Gram olumsuz bir kokobasil olup, üremesi için kanda bulunan X ve V faktörlerine gereksinimi vardır. İlk kez 1892'de Pfeiffer tarafından izole edilip tanımlanmıştır. Özellikle bebek ve çocuklarda, ciddi pek çok invaziv enfeksiyona ve erişkinlerde de konak savunmasının azaldığı durumlarda çeşitli enfeksiyonlara yol açmaktadır(9,33,38,46).

H.influenzae ile oluşan enfeksiyonlar, dünyanın her yerinde görülmektedir. Son yıllarda gelişen laboratuvar teknikleri sayesinde de, gerçek insidansın,daha önce bildirilenlerden 4 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Özellikle 2 ay-6 yaş arası çocuklarda başta akut bakteriyel menenjit olmak üzere, epiglottit, otitis media, sinüzit, septik artrit, bakteriyemi, sellülit, pnömoni gibi enfeksiyonlara neden olmaktadır. Menenjit ve epiglottit enfeksiyonları erken tanı konulup tedavi edilmezse ölümlerle sonuçlanabilmektedir. Ayrıca menenjit vakalarında uygun tedaviye rağmen hastaların yaklaşık yarısında kalıcı santral sinir sistemi sekelleri oluşmaktadır(33,35,46).

Bu çalışmada gerek küçük çocuklarda sık ve ciddi enfeksiyonlara neden olan ve gerekse izolasyonu özel bir ilgi ve dikkat isteyen bu bakterinin uygun transport ve kültür besiyerleri kullanmak suretiyle izolasyon oranını ve antibiyotik duyarlılığını araştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Giriş ve Tarihçe

2.1.1. Giriş

Haemophilus genusu üyeleri; küçük, pleomorfik, sporsuz, Gram olumsuz kokobasillerdir. İnsan ağız ve üst solunum yolu florasında yer alırlar. Genusun pekçok üyesi saprofit veya fırsatçıdır. Haemophilus influenzae, Haemophilus aegyptius ve Haemophilus ducreyi patojendir.

Haemophilus, Yunancada kan seven anlamındadır (haemo:kan, philus:sevmek). Üremeleri için kanda bulunan X ve/veya V faktörlerine gereksinimleri vardır. Bu faktörlere olan gereksinim genus tanımı ve türlerin identifikasyonunda kullanılmaktadır.

Ağız florasında; H.parainfluenzae, H.parahaemolyticus, H.paraphrophilus, H.aphrophilus ve H.segnis yer almaktadır. Kapsülsüz H.influenzae suşları, sağlıklı çocukların %75'inde, erişkinlerde ise daha az oranda, H.haemolyticus da sağlıklı popülasyonun az bir bölümünde nasofarenkste bulunmaktadır.

H.ducreyi, sağlıklı erişkinlerden izole edilemez. Yumuşak şankırın etiyolojik ajanıdır. H.aegyptius da sağlıklı kişilerden izole edilmemektedir. Akut ve bulaşıcı konjonktivit ve Brezilya purpurik ateşi etkenidir. 1976'da H.influenzae'nın biyotipi olarak sınıflandırılmıştır (Biyotip III) (2,16,26,33,34,38,46,58).

H.influenzae, özellikle bebek ve çocuklarda, ciddi pek çok invaziv, erişkinlerde de konak savunma mekanizmasının bozulduğu durumlarda çeşitli enfeksiyonlara yol açması nedeniyle bu genusun önemli patojen üyelerinden biridir. H.influenzae ile oluşan enfeksiyonlar dünyanın her yerinde görülmektedir.

Ayrıca son yıllarda gelişen laboratuvar teknikleri sayesinde *H.influenzae* enfeksiyonlarının gerçek insidansının, daha önce bildirilenlerden 4 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. 2 ay-6 yaş arası çocuklarda başta akut bakteriyel menenjit olmak üzere epiglottit, otitis media, sinüzit, septik artrit, bakteriyemi, sellülit, pnömoni gibi enfeksiyonlara yol açmaktadır. Özellikle menenjit ve epiglottit enfeksiyonları tedavi edilmezse ölümlerle sonuçlanabilmektedir. Menenjit vakalarında uygun tedaviye rağmen, hastaların çoğunda kalıcı S.S.S(santral sinir sistemi) sekelleri oluşmaktadır(33,35,46).

2.1.2. Tarihçe

Alman bakteriyolog Robert Koch, *Haemophilus genusundan* bakterileri ilk gören kişidir. Bu gözlemini Mısır'da konjonktival eksudaları incelerken yapmıştır(1883). Bununla birlikte Koch'un çağdaşı Pfeiffer'in başka bir *Haemophilus türünü* izole edip, tanımlaması daha anlamlıdır(1892). Pfeiffer'in basilli, 1889-1892 yıllarındaki grip pandemisinde, hastaların postmortem akciğer kültürleri ve balgamlarından izole edilmiş ve Amerikan Bakteriyolog Birliği'ne bağlı bir komite tarafından *H.influenzae* olarak isimlendirilmiştir(34).

1897'de Grassberger satellit fenomenini tariflemiştir(57). Davis, Thjotta ve Avery, *H.influenzae'nin* üreyebilmesi için X ve V faktörlerine gereksinimi olduğunu bulmuşlar ve V faktörü Lwoof ve Lwoof tarafından fırıncı mayasından elde edilmiştir(8).

H.influenzae menenjiti ilk olarak, 1899'da Slawk tarafından tarif edilmiştir(2).

1890-1918 yıllarındaki pandemide, *H.influenzae'nin* rolü halen açıklık kazanmamıştır.

Bazı araştırıcılar, bu pandeminin virus ve basilin ortak etkisi ile oluştugunu söylemişlerdir. Bu tez daha sonra Shope'nin (1931) dogal veya deneysel domuz gribi oluşması için, H.suis ve domuz gribi virusunun sinerjistik etkisinin gerekli olduğunu göstermesi ile güçlenmiştir. 1933'de epidemik gribin, gerçek etiyo- lojik ajanı olan virus bulunduktan sonra H.influen- zae'ya olan ilgi uzun süre kaybolmuştur(34,37).

Pittman, H.influenzae'nin kapsüllü ve kapsülsüz suşlarının olduğunu, kapsüllü suşların 6 farklı serolojik tipe ayrıldığını, özellikle de tip b'nin pürülan menenjit ve laringoepiglottit'de primer pa- tojen olduğunu göstermiştir(15,46).

Killian 1976'da H.influenzae'nin 6 biyotipini tanımlamış ve çeşitli biyotiplerin kapsül antijeninin varlığı ve yokluğu ile ilişkili olduğunu bildirmiştir(63).

2.2. Sınıflandırma

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Hae- mophilus genusunu, fakültatif anaerop, Gram olumsuz basiller olarak tanımlamıştır. Haemophilus genusu, Pasteurellaceae familyasındaki üç genustan biridir. Bu familyada Haemophilus genusundan başka Pasteurella ve Actinobacillus genusları da yer almaktadır. 16 Haemophilus türü vardır. 10'u insanlarla ilişkilidir. Bunlar; H.influenzae, H.aegyptius, H.ducreyi, H.pa- rainfluenzae, H.parahaemolyticus, H.paraphrohaemoly- ticus, H.aphrophilus, H.segnis, H.haemolyticus ve H.paraphrophilus'tur(33).

2.3. Mikrobiyolojik Özellikler

2.3.1. Görünüm ve Boyanma

Tablo I: Haemophilus türlerinin ayırt ettirici özellikleri(30,56).

TDR	Faktör gereksinimi		Fermentasyon					
	X	V	Hemoliz	Glukoz	Sükroz	Laktöz	Katalaz	CO ₂ 'in üreneyi arttırması
H.influenzae (H.aegyptius)	+	+	-	+	-	-	+	-
H.haemolyticus	+	+	+	+	-	-	+	-
H.ducreyi	+	-	- ^a	- ^b	-	-	-	-
H.parainfluenzae	-	+	-	+(bazen gaz)	+	-	D	-
H.parahaemolyticus ^c	-	+	+	+	+	-	D	D
H.segnis	-	+	-	W	W	-	D	-
H.paraphrophilus	-	+	-	+(gaz)	+	+	-	+
H.aephrophilus	-	-	-	+(gaz)	+	+	-	+

- a. Bazı suşları gecikmiş beta hemoliz yaparlar.
b. Uygun üreme koşullarında bazı suşlar Glukozu geç fermente ederler.
+, Suşların X90 veya daha fazlası pozitif
-, Suşların X90 veya daha fazlası negatif
D, Suşların X11-X89'a pozitif
W, Zayıf fermentasyon
c. H.parahaemolyticus ve H.paraphrohaemolyticus sadece CO₂ gereksinimleri ile ayırt edilebilirler. H.paraphrohaemolyticus CO₂ e gereksinim göstermektedir.

H. influenzae; 0.3-0.5x0.5-2.0 um boyutlarında, uçları yuvarlak, hareketsiz, sporsuz, kapsül oluşturabilen, Gram olumsuz, genusun diğer üyeleri gibi pleomorfizm gösteren kokobasillerdir. Bazen kısa zincirler de oluşturabilirler(9,33,34,38,46).

Akut enfeksiyon örneklerinde ve 6-8 saatlik zengin besiyeri kültürlerinde, 0.2-0.3 um en ve 0.5-0.8 um boyunda, kısa kokobasiller şeklindedirler. Kültür eskidikçe basiller lizise uğrar ve pleomorfik şekiller görülür. 6-18 saatlik genç kültürlerde, zengin besiyerinde belirgin bir kapsül oluşmaktadır. En iyi kapsül oluşumu 8 saatlik inkubasyon sonunda olmaktadır(5,35).

2.3.2. Üreme Özellikleri

Haemophilus influenzae, koyun kanlı agarda bazı modifikasyonlar yapılmadıkça iyi üremez. Eritrositlerden besiyerine X faktörü yayılmasına rağmen, V faktörü genellikle hücrelerin içinde kalır. Koyun kanı, V faktörünü inaktive eden NADaz enzimi salgılar. İzolasyonda koyun kanı kullanırken bu inhibitör etkiyi ortadan kaldırmak için besiyerine fazla miktarda V faktörü konmalıdır. Bu *S. aureus* gibi bir organizma ile de sağlanabilir. *S. aureus* üremesi sırasında çok fazla miktarda V faktörü üretip, bunları besiyerine salgılar. *Haemophilus influenzae* ekilmiş besiyerine, bir öze ile boydan boya *S. aureus* ekilir. Yeterli inkubasyondan sonra, *S. aureus* yakınında küçük çig tanesi gibi koloniler oluştuğu gözlenir(*Staphylococcus streak testi*:Satellit fenomeni). Çukolata agar tercih edilmesine rağmen, eğer diğer organizmalarla çok fazla kontamine değilse ilk izolasyon için bu test tercih edilebilir(9,33). Karışık kültürlerde *Neisseria*, *Pseudomonas*, Pnömonokok gibi V faktörü salgılayan organizmalar etrafında da

üreyebildikleri bildirilmiştir(33).

Tavşan ve at kanları, NADaz içermediğinden besiyerlerinde kullanılmaktadır. Bu organizmaların üremeleri için en iyi besiyeri, lizise uğramış eritrositleri içeren besiyeridir. Böylece fazla miktardaki V faktörü de açığa çıkmış olur. Çukulata ve Levinthal agar özellikle önerilmektedir. Çukulata besiyeri, agara kan ilave edilip 80 °C de 15 dakika ısıtma ile elde edilmektedir. Isıtma ile besiyerinin rengi kahverengi olur ve ortamdaki NADaz tahrip edilir.

Levinthal agar, az miktarda ısıtılıp filtreden geçirilmiş at eritrositleri içerir. Besiyeri renksiz ve saydamdır. Özellikle kapsüllü ve kapsülsüz *H.influenzae* suşlarını ayırt etmede faydalıdır. Oblik ışıktta incelendiğinde kapsüllü suşlar ışığı kırıcı ve gökkuşuğu görünümünde, kapsülsüz suşlar ise ışığı kırmayan ve mavimsi renktedir (2,33,34,58).

Fildes besiyeri, koyun kanının peptik özeti dir. Triptik soy agar veya brain heart infüzyon agara ilave edilerek, *Haemophilus* cinsi bakterilerin üreme şansları arttırılabilir. Peptik özet işlemi, NADaz'ı tahrip eder ve V faktörünün açığa çıkmasını sağlar(33,34).

Tavşan kanlı agarda ve içerisine oleat katılmış tavşan kanlı agarda (Averin besiyeri) çok küçük, yuvarlak, dağınık, saydam ve toplu iğne başı büyüklüğünde koloniler oluştururlar(2,9).

Normal florada bulduklarından üst ve alt solunum yollarından alınan örneklerde patojen olarak yorumlanmaları zordur. Ciddi bir solunum yolu hastalığında etken olarak düşünülüyorsa seçici olmayan besiyeri ile birlikte seçici besiyeri de kullanılmalıdır. Seçici besiyeri olarak yalnız basitrasin veya basitrasin+vankomisin+klindamisin eklenmiş çukulata agar kullanılır. İkinci besiyeri

özellikle daha seçicidir(12,33).

Kültürden yapılan Gram boyamada Gram olumsuz kokobasiliden flamantöz formlara kadar değişen morfolojide görülebilirler. Kanlı brain heart infüzyon agarda 24 saatte 0.5 mm çapında yuvarlak, küçük, ışığı kuvvetle kıran koloniler oluşturur. Çukulata agarda koloniler 1 mm çapa ulaşırlar. Koloniler S tipi yarı opak, sümüksü ve konvekstir(9,34).

H.influenzae'nın üreyebilmesi için hem X hem de V faktörüne gereksinimi vardır. Diğer türlerin çoğu sadece bir faktörle üreyebilirler. Hücrelerin üremeleri ve metabolizmalarında her iki faktör de hayati öneme sahiptir. X faktörü protoporfirin IX veya hemindir. Isıya dirençli olan bu faktör, demir içeren solunum enzimlerinin sentezi için gereklidir(Sitokrom, sitokrom oksidaz,katalaz, peroksidaz). H.influenzae suşlarınının delta aminlevinik asitten (ALA) hemin sentezlemek için gerekli enzimleri yoktur. X faktörüne gereksinimi olmayan suşlar ise ALA - porfobilinojen - porfirin - hemin değişimine neden olan enzimlere sahiptirler. H.aphrophilus, diğer X faktörüne gereksinimi olmayan organizmalardan farklı olarak ilk izolasyonda hemin içeren besiyerine ihtiyaç göstermekte ve bunun nedeni bilinmemektedir(5,24,30).

V faktörü (nikotinamidadenindinükleotit), oksido-redüksiyon reaksiyonlarında gerekli bir koenzim olup ısıya duyarlıdır. 120 °C da birkaç dakika içinde inaktive olmaktadır. İki kohidrogenazdan biri ile yer değiştirebilir (8,16,33,37).

Optimal üreme 37 °C de (35-37 °C), pH; 7,4-7,8 ve aerobik koşullar altında olmaktadır(2,8,24,30,31,34). Bazı kaynaklarda da H.influenzae'nın ilk izolasyonun-

da %5-10 CO₂ li ortamın gerekli olduğu bildirilmektedir(2,42). Kùltùrler 18-24 saat bekletilir. Bu süre *H.aegyptius* için 2-3 gündür(33).

2.3.3. Diğer özellikler

H.influenzae suşları katalaz ve oksidaz pozitifdir. Hemoliz yapmazlar. Birçok suşu fare kokusu yayar. Jelatinde üremez, nitratları nitrite çevirirler. Yaklaşık %50'si triptofandan indol oluşturur. Indol üreten suşlarda fare kokusu yoktur. Ancak keskin bir indol kokusu vardır(2,5,26,33,38).

%1-2 sodyum deoksikolat'da erirler. Glukozu fermente ederek asit oluştururlar. Laktoz ve sü krozu fermente etmezler. Indol, üreaz ve ornitin dekarboksilaz aktivitelerindeki farklılıklara göre 8 biyotipe ayrılırlar(26,29,33,35,50,51,58). Killian ve Biberstein, belli biyotiplerin bazı enfeksiyonlarla ilişkili olduğunu göstermişlerdir(26). *H.influenzae* biyotip I özellikle kan ve BOS'tan izole edilmektedir ve invaziv hastalıklarla ilişkilidir. Sıklıkla kistik fibrozisli ve akut otitis mediası olan çocuklardan izole edilmektedir(26,33,38). Biyotip II ve III balgam ve göz kùltürlerinden, oldukça sık olarak da üst solunum yolundan izole edilmektedir(33,38).

H.influenzae suşları, çevre şartlarına dayanıksızdır. Kuruluğa, ısıya ve dezanfektanlara duyarlıdırlar. Kuru balgamda 48 saatten fazla dayanmazlar. 55 °C da 30 dakikada ölürler(2). Suşlar soğuğa da duyarlı olduğundan, örnekler ve kùltürler 0-4 °C de saklanmamalıdır(15,33).

Otoliz nedeniyle *H.influenzae*'nin laboratuvarında izolasyonu zordur. Çukolata agardan diğer zenginleştirilmiş ortama hızlı bir şekilde transfer edilmesi gerekir. Süt içinde liyofilizasyon ile

Tablo II: H.influenzae Biyotipleri(24,27,30,47).

BiYOTiP	ENFEKSİYON YERİ	INDOL	UREAZ	ORNİTİN DEKARBOKSİLİZ
Biyotip I	Sepsis,menenjit	+	+	+
Biyotip II	Göz(ABD),bakteriyemi, kulak,alt solunum yolu	+	+	-
Biyotip III	Göz(Avrupa),solunum yolu	-	+	-
Biyotip IV	Kulak(nadiren),solunum yolu	-	+	+
Biyotip V	Kulak,alt solunum yolu	+	-	+
Biyotip VI	Üst solunum yolu (nadiren)	+	-	-
Biyotip VII	Üst solunum yolu	-	-	+
Biyotip VIII	Üst solunum yolu	-	-	-
H.aegyptius	Göz	-	+	-

başarılı bir şekilde saklanabilir. Diğer bir metod da 24 saatlik sıvı kültürlerinin dondurulması veya -60, -70 °C da %10 gliserol içinde saklanmasıdır.(38).

2.4. Genetik

H.influenzae'da, koloni tipi, antijenik yapı ve organizmanın virulansı arasında çarpıcı bir ilişki mevcuttur. Koloni morfolojisinde mukoid kolonilerin R koloniye dönüşmeleri, mutasyonla spesifik kapsüller polisakkaritin kaybını gösterir. Spontan mutasyon oranı oldukça yüksektir. Bu durum suboptimal kültür şartları ve tipe özgül antiserum varlığıyla arttırılabilir.

H.influenzae'nın tipe özgül polisakkarit kapsülü, bir organizmadan diğerine DNA transferi ile yapılan genetik çalışmalarda kullanışlı bir markırdır. *H.influenzae*'da suşa özgül restriksiyon endonükleazları, diğer suşlardaki DNA'yı yabancı kabul eder. Restriksiyona karşı korunma metilaz modifikasyonu ile olmaktadır. *H.influenzae*'nın her bir serolojik tipi, farklı restriksiyon ve modifikasyon sistemi taşımaktadır. Bu sistemler; spesifik genom fragmanlarının fonksiyonunu ve yapısını analiz etmede moloküler biyolojistler için kuvvetli silahlardır.

H.influenzae'da antibiyotik direncinde plasmid transferi rol oynamaktadır. 1974'de aniden oluşan ampisilin direnci, dirençli suşlarda plazmid DNA'larının araştırılmasına yol açmıştır. Dirençli suşlarda iki çeşit DNA plazmidi mevcuttur. Biri 30 Mdal(megadalton) ağırlığında büyük bir konjugatif, diğeri de 3 Mdal ağırlığında küçük bir nonkonjugatif plazmidir. Her ikisi de beta laktamaz kodlayan transpozon içerirler(TnA). Bu *Enterobacteriaceae*'de orjinal olarak bulunan Tn3 transpozon benzeri elemente benzemektedir. Dünyanın çeşitli bölgelerinden

izole edilen konjugatif H.influenzae R plazmidlerinin kodları, benzer taban sıralaması göstermektedir. Tetrasiklin ve kloramfenikol'e direnc de plazmide bağılı olarak gelişmektedir. Bu antibiyotiklere direnci kodlayan R plazmidlerinin, ampisilin plazmidleri ile pek çok taban dizisi ortaktır(35).

2.5. Antijenik Yapı

H.influenzae, 3 ana yüzey antijenine sahiptir: Kapsüler polisakkarit, lipopolisakkarit ve dış zar proteinleri.

a. Kapsüler antijenler: Kapsüler polisakkarit, kapsüllü H.influenzae suşlarının ana antijenik determinantıdır. Bu polisakkarit, organizmanın tip özelliğine bağlıdır. Buna göre kapsüllü H.influenzae suşları 6 farklı serotipe ayrılmaktadır (a dan f ye kadar). Invaziv hastalığa yol açan tiplerin hepsi tip b dir(30,31,32,48). a,b,c ve f tipleri tarafından üretilen kapsüler antijenler teikoik asit tipinde, d ve e de ise polisakkarit yapısındadır. Diğer tiplerde bulunan heksos ve heksosaminler yerine riboz ve ribitol fosfat içermesi ile tip b kapsülü farklıdır. Tipe spesifik antiserum kullanılarak ve quellung reaksiyonu ile tipler belirlenebilir. Aglutinasyon ve floresan antikor teknikleri de uygulanabilir(33,35).

Kapsüler antijen presipitasyon testinin modifikasyonu, tarama testi olarak ve tip b polisakkariti ile çapraz reaksiyon veren bakterilerin identifikasyonunda yararlıdır. Bu teknik, antiserum içeren agar yüzeyindeki kolonilerin etrafında immuno-presipitin halkalarının oluşması esasına dayanmaktadır. Bu yöntem kullanılarak H.influenzae tip b polisakkariti ile çapraz reaksiyon veren Pnökokok, Streptokok, E.coli, Stafilokok, Laktobasilus ve Basillus türlerini içeren Gram olumlu ve Gram

olumsuz çeşitli organizmaların bulunduğu ortaya çıkarılmıştır. E.coli ve H.influenzae arasındaki çapraz reaksiyon, asidik polisakkarit veya K antijenlerinin ortak özelliklerine bağlanmıştır. Gram olumlu organizmalarda ise, çapraz reaksiyon veren antijenler, hücre duvarındaki poliribitol fosfat teikoik asitlerdir(35).

b. Somatik antijenler: H.influenzae'nın hücre duvarı, protein ve lipopolisakkarit antijenlerini içeren dış ve iç membrandan ibarettir(32). Somatik antijen iki proteinden oluşur. P maddesi daha çok bakterinin kendi antijeni, M maddesi ise labil yüzey antijenidir(34). Lipopolisakkaritin ana antijenik bileşimi, nontoksik polisakkarit fraksiyonudur. Somatik polisakkarite karşı oluşan antikorlar yaşa bağımsız, tersine kapsüller polisakkarite karşı oluşan cevap yaşa bağımlıdır(35).

2.6. Patogenez

Enfeksiyon; klinik olarak aktif vakalardan, konvelesan dönemdeki hastalardan ve taşıyıcılardan enfeksiyöz damlacıkların inhalasyonu ile oluşmaktadır. İnsandan başka rezervuar bilinmemektedir. Organizma ekzotoksin üretmez(34,35,46). Asemptomatik enfeksiyonlar, seyrek olarak sinüslere, orta kulaga ve bronşlara yayılarak semptomatik hastalığa dönüşebilir. Organizmalar, muhtemelen normal silya fonksiyonlarının kaybı ve virüs sinerjisi ile solunum yolunda enfeksiyon oluşturmaktadır. Kronik solunum yolu enfeksiyonlarındaki suşlar kapsülsüzdür ve dokulara yayılmazlar. Balgam veya kulak aspiratlarında H.influenzae tip b (Hib) nin varlığı doku invazyonunu gösterebilir. Fare, maymun ve şinşillalarda yapılan deneysel enfeksiyonlar, H.influenzae enfeksiyonlarının anlaşılmasına katkıda bulunmuştur.

Fare ve maymunlara intranasal inokulasyonu takiben Hib, nazofarenks mukozasına penetre olmakta ve birkaç dakika içinde kana geçmektedir. Santral sinir sistemine (SSS) direkt penetrasyon ile menenjit oluşması nadirdir. Nazofarengeal mukozaya nasıl penetre olduğu, kana nasıl geçtiği ve sonra S.S.S'ne nasıl ulaştığı iyice anlaşılamamıştır. Deneysel olarak influenzae virusu ile nazofarenks enfeksiyonunun, otitis media ve bakteriyemiye zemin oluşturduğu gösterilmiştir. Menenjit oluşması bakteriyeminin şiddeti ve süresi ile paraleldir(46).

Intravasküler klerensin etkisini azaltıcı deneysel çalışmalar menenjit oluşumunu arttırmış, tersine özgül antikolarla önceden tedavi uygulanması veya E.coli'ye karşı çapraz reaksiyonla önceden oluşmuş immun cevap bakteriyemi şiddetini ve menenjit insidansını azaltmıştır(46).

Bağışık olmayanlarda ve genetik olarak hassas kişilerde bulaşıcı hastalık vakalarının artmış olması, H.influenzae enfeksiyonlarında, konak faktörünün kritik rol oynadığını vurgulamaktadır. Viral sinerji de konak parazit etkileşiminde rol oynayabilir(35).

Dokularda H.influenzae invazyonunu takiben, fibrinden zengin nonspesifik akut nötrofilik eksudasyon oluşur. Bu eksudanın ağır plastik yapısı, organizmanın konak savunmasına karşı korunmasında önemli olabilir(35).

PATOJENİTEDE ROL OYNAYAN FAKTÖRLER

a. Kapsül: Hib'in PRPP(fosforibozilribitolfosfat) kapsülü, bu organizmanın neden olduğu invaziv hastalıkların patogeneğinde önemli bir rol oynar. Sistemik enfeksiyonlar daima kapsüllü suşlar tarafından olmaktadır(35).

b. Dış zar komponentleri: Tip b kapsüler polisakkariti, virulansın ana determinantı olmasına rağmen, diğer faktörler de değişik zamanlarda virulansa eşlik etmektedirler. Dış zar proteinleri ve lipopolisakkaritler bu komponentler arasındadır. Yüzey moleküllerinin herbiri tutunma, invazyon ve fagositoza dirençten sorumlu olabilir. H.influenzae patogeneğinde nonkapsüler somatik antijenlerin önemi, insan ve hayvanlarda yapılan deneysel çalışmalarda bu antijenlere karşı bağışıklıkta rol oynayabilen antikörlerin oluştuğunun gösterilmesiyle vurgulanmıştır.

Kapsülsüz, H.influenzae'nın somatik yüzey antijenleri, astım bronşiale gibi nonspesifik akciğer hastalıklarının patogeneğine iştirak etmektedir. LPS, silyalı solunum epitelinde paralitik etki gösterir ve bronşlarda organizmanın proliferasyonuna neden olur(35).

H.influenzae LPS'inin lipid A'sı, enterik bakterilerin lipid A'sına benzemektedir. Fakat serbest lipid A, diğer lipid A'ların klasik biyolojik aktivitesini göstermemektedir(35).

c. Tutunma: H.influenzae ile oluşan enfeksiyonun patogeneğinde, epitelyal yüzeylere tutunmasının rolü tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte tiplendirilemeyen suşların %90 dan fazlası insan yanak epitel hücrelerine tutunmakta, tip b suşlarında ise %5 tutunma olmaktadır. Bu durum tiplendirilemeyen suşların lokal enfeksiyona yol açma eğilimini açıklayabilir(35).

d. IgA proteaz: H.influenzae, IgA proteaz üreten 5 bakteri türünden biridir. Bu enzim, IgA ağır zincirini hidroliz etmektedir. Nötral bir endopeptidazdır. H.influenzae önce mukozal yüzeyleri enfekte ettiğinden, sekretuar IgA'nın parçalanması,

organizmanın virulansını arttırmaktadır. H.influenzae, IgA ağır zincirinde değişik peptid bağlarını parçalayan 3 farklı IgA proteaz üretmektedir. Proteazın tipi, izolatin serotipi ile ilişkilidir(35).

e. A.B.D.'de Sarah Long ve arkadaşları, virülansın biyotiplerle de ilişkisi olduğunu göstermişlerdir(39).

2.7. Yaptığı Hastalıklar

2.7.1. Menenjit

H.influenzae'nın sebep olduğu en önemli hastalık, akut bakteriyel menenjittir. Vakaların hemen hepsi tip b ile oluşmaktadır. Bunların da %93 ü biyotip I dir(38).

Hib menenjiti vakalarının büyük kısmı 2 ay-3 yaş arasındaki çocuklarda görülmektedir. Vakaların %95'i, 5 yaşından önce oluşmaktadır. Bu yaşa bağlı insidans, 2 ay-3 yaş arasındaki çocuklarda, antikörlerin az miktarlarda olması nedeniyledir. Yetişkinlerde nadiren görülmektedir. Tiplendirilemeyen H.influenzae ile oluşan rekürren bir menenjit vakası bildirilmiştir(32,33,46).

Sıklıkla son zamanlarda veya geçmişte geçirilmiş kafa travması, beyin operasyonu, paranazal sinüzit, otit veya BOS sızıntısı mevcuttur. Yenidoganda da nadirdir. Bu vakalar GBS (grup B streptokok) enfeksiyonlarının başlangıcına benzeyebilir. Önce ÜSYE(üst solunum yolu enfeksiyonu) semptomları görülür. Daha önceden geçirilmiş veya birlikte otitis media da çok sıktır(46).

En sık görülen semptom ateştir. Değişmiş S.S.S fonksiyonları da sıktır. Ense sertliği genellikle yoktur. Koma ve konvülsiyon hastalık ilerleyince

görülmektedir. Hastalık başlangıçta fulminant olabilir. Genellikle 1 yaş altı çocuklarda, birkaç saat içinde ölüm olur. Hafif geçirilen enfeksiyonda ÜSYE 'unu takiben birkaç gün içinde hastalık kötüye gider. Birkaç hafta süren ~~sinsi gelişme (tüberküloz menenjitine benzeyen)~~ özellikle yeterli antibiyotik tedavisi görmeyen bebeklerde tanımlanmıştır(46).

Uygun tedavi ile H.influenzae menenjitinde ölüm oranı %5'den azdır. Fakat yaşayanların çoğunda kalıcı sekeller oluşmaktadır. H.influenzae menenjitli 46 çocuğun gözleminde, bunların %35'inde işitme kaybı veya konuşmanın gecikmesi, %11'inde mental retardasyon, %7'sinde serebral palsi, %5'inde ise sürekli konvülsiyon olduğu saptanmıştır. Hastaların %50'sinde ise S.S.S fonksiyonları normal bulunmuştur(46).

Çocuğun yaşının küçüklüğüne bağlı olarak subdural effüzyon gelişmesi sıklıkla rastlanan bir komplikasyondur(43). Sickle cell anemili olup duyarlılığı artmış olanlar hariç, kadın, erkek ve ırka göre hastalığın dağılımı farklılık göstermemektedir(35).

2.7.2. Epiglottit

Bu dramatik ve potansiyel olarak öldürücü olan hastalık 2-4 yaşları arasında çok sık görülmektedir. Beyaz ırkta hastalığa yakalanma oranı fazladır. Hastaların çoğu erkek çocuklardır. Erişkinlerde görülmemektedir. Genellikle Hib'e bağlıdır. Başlangıç semptomları; boğaz ağrısı, havlama tarzında öksürük ve ateştir. Hızla solunum zorluğu, dispne ve takatsizlik oluşur. Çocuk, huzursuz ve korkuludur. Oturma pozisyonundadır. Ense ve çene öne uzatılmıştır. Fizik muayenede parlak kırmızı çilek dili mevcuttur. Epiglottis, normalden 5-10 kez büyük olup hava pasajını bloke edebilir. Nazotrakeal intübasyon ve trakeostomi ile hava yolunun açık tutulması, hastanın hayatını kurtarmak için gereklidir(33,35,46).

2.7.3. Pnömoni

Bebek ve çocuklarda, H.influenzae pnömonisinin gerçek insidansı, bakteriyolojik tanıdaki güçlükler nedeni ile bilinmemektedir. 4 yaş altındaki çocuklarda, balgam sıklıkla alınamamaktadır. Pnömoni, genellikle otitis media, menenjit, bakteriyemi gibi diğer enfeksiyonlarla birlikte olmaktadır (Hastaların %43'ünden fazlasında)(33,46).

Cocuklarda Hib'e bağlı primer akciğer enfeksiyonlarının gerçek sıklığı, bütün çocukluk çağı pnömonilerinin %2'sinden azıdır. En çok ilkbahar ve kış aylarında görülmektedir. Sıklıkla plevral yayılım da mevcuttur. Şiddetli dispne, taşikardi, kardiyovasküler yetmezlik bulguları perikarditi akla getirir. Bu sık olmayan fakat önemli bir komplikasyondur(33,46).

Erişkinlerde H.influenzae pnömonisi, primer akciğer hastalığı veya alkolizm ile birlikte son yıllarda artış göstermiştir. Pnömoni yaşa bağımlı olmadan, segmenter, lobar bronkopnömoni veya interstisiyel olabilir. Kavitasyon nadirdir. Plevral effüzyon vakaların %50'sinde görülür. Sıvı sterildir(33,46).

2.7.4. Sellülit

Daha çok 2 yaş altı çocuklarda görülmektedir. Küçük çocuklardaki sellülit vakalarının %5-14'ünden sorumludur. Sıklıkla nonspesifik Ü.S.Y.E'den önce gelişmekte, en fazla yanak ve periorbital bölgede görülmektedir. Üst ekstremitelerde de oluşabilir. O bölgede belirgin bir mavi-mor renk gözlenir. Birkaç saat

içinde yumuşak doku yayılımı olur.Çocukların bazılarında menenjit gibi septik odaklar mevcuttur veya gelişebilir(33,35,46).

2.7.5. Bakteriyemi

Özellikle 6-36 aylık çocuklarda, lokal bir hastalık olmadan bakteriyemi gelişebilir.S.pnömoniae'dan sonra en sık görülen etiyolojik ajandır. Ateş anoreksi ve letarji vardır. Fizik muayene tanı koydurmaz.Ateş,38.9 °C üzerinde ve yüksek periferel nötrofili mevcuttur. Sickle cell anemili ve splenektomili çocuklar özellikle daha duyarlıdır. Hızlı septik şok veya lokalize pürülan fokus gelişebileceğinden erken tanı ve tedavi önemlidir(46).

2.7.6 Septik Artrit

H.influenzae, 2 yaş altındaki çocuklarda çok sık olarak septik artrite neden olmaktadır. Tipik olarak büyük, ağırlık taşıyan eklemlerde, azalmış hareket, ağrı ve şişme görülür. Sistemik antibiyotik tedavisine cevap iyidir. Ancak çocukların büyük kısmında kalıcı eklem disfonksiyonları oluşmaktadır(33,46).

2.7.7. Çocuklarda ve Erişkinlerde Yaptığı Diğer Enfeksiyonlar

Kapsülsüz H.influenzae, çocuklarda menenjit ve septisemi olmadan oluşan otitis mediadan da sorumludur. Bu organizmalar üst solunum yolu florasında normalde bulduklarından enfeksiyonun primer veya sekonder olduğu açıklık kazanmamıştır. Pnömokoklardan sonra(%33)

en sık görülen patojendir(%20)(26).

Çocukluk çağı akut sinüzit vakalarının %23'ünde, pnömokoklardan sonra en sık görülen etiyolojik ajandır(26,46).

Çocuklardaki konjonktivitlerden de en fazla H.influenzae, S.pneumoniae ve S.aureus sorumludur. H.influenzae ve S.pneumoniae epidemik konjonktivite neden olmaktadır(26).

Hib, çocuklardaki perikardit vakalarının %15'inden sorumludur. Çocukların çoğu 2-4 yaş arasındadır. Seyrek olarak da osteomyelite neden olmaktadır(33).

Kapsülsüz H.influenzae suşları, erişkinlerde sıklıkla nazofarengeal bölgede kolonize olup, akut sinüzit ve bronşite neden olmaktadır. H.influenzae erişkinlerdeki akut sinüzitlerin %21'inden sorumludur(33,46).

H.influenzae, erişkinlerde konağın savunma mekanizmasının çeşitli nedenlerle azalması sonucu sekonder istilacı olarak hareket etmektedir. May ve arkadaşlarının 1967 de yaptıkları çalışmalarda kronik bronşitli hastalarda akut ataklarda ve bronşektazili hastalarda önemli bir sekonder enfeksiyon ajanı olduğu gösterilmiştir(15).

Erişkinlerdeki invaziv pek çok enfeksiyon vakası, altta yatan hastalıkla ilişkilidir. Alkolik, diabetli, splenektomili veya hipogammaglobülinemili hastalar da oldukça sık görülmektedir. Çocuklardan farklı olarak lokal enfeksiyonlardan bulaşma ile menenjit gelişmektedir(33,46).

H.influenzae, erişkinlerde; perikardit, septik artrit, üriner ve safra yolu enfeksiyonları, endokardit, obstetrik ve jinekolojik enfeksiyonlar ve sellülite de nadiren sebep olmaktadır(33). Chicago Üniversitesinde

1983-1984 yılları arasında nongonokokal üretritlerinin %2,4'ünde H.influenzae izolasyonu yapılmıştır(53). 1988'de Connecticut'da bir hastanenin geriatri ünitesinde, H.influenzae tip b salgını rapor edilmiştir(47).

Ülkemizde de H.influenzae tip b, biyotip V ile oluşmuş bir daktriyosistit ve bir kolesistit vakası rapor edilmiştir(42,63).

Ayrıca tiplendirilemeyen H.influenzae ile oluşan maternal bakteriyemi, yenidoğanda ciddi hastalıklara yol açabilmektedir(26,33).

2.7.8. Haemophilus Aegyptius (Koch-Weeks Basili)

Killian tarafından ayrı bir tür olduğu savunulmasına rağmen 1976'da H.influenzae'nin biyotipi olarak kabul edilmiştir.

Bu organizma özellikle sıcak iklimlerde akut ve bulaşıcı konjonktivitten sorumludur. H.influenzae'dan farklı olarak predispozan faktörler olmadan gözlerde kolonize olmaktadır. H.aegyptius, çocuklarda ciddi bir sistemik enfeksiyona da neden olmaktadır. Brezilya purpurik ateşi olarak adlandırılan bu hastalık ilk kez 1984'de Brezilya'da tanımlanmıştır. Hastalarda başlangıçta pürülan konjonktivit mevcuttur. Bunu peteşiyal ve purpurik deri lezyonları ve şok takip etmektedir(33,46).

2.8. Diğer Haemophiluslar

a. H.ducreyi

Yumuşak şankr etkenidir. İzolasyonu için sıgır hemoglobini, vankomisin İsovitale X ilave edilmiş gonokokal agar base gibi birçok seçici besiyeri

geliştirilmiş olmasına rağmen çukolata agarla da başarılı bir şekilde izolasyonu yapılabilir. Kültür 33-35 °C'de 4 gün bekletilmelidir.

Şankroid, sıklıkla sıcak tropikal iklimlerde örn.Güney Doğu Asya, Afrika, Batı Hindistan'da görülmektedir. ABD'lerinde nadiren görülmektedir. Son yıllarda Kaliforniya'da bir salgın olmuştur. Hastalık sıklıkla sünnetsiz erkekler ve hastalığın en önemli rezervuarı olan fahişelerde görülmektedir.

Tipik lezyon, 4-7 günlük bir inkübasyondan sonra eritemli bir zonla çevrili, küçük, agrılı bir papüldür. Hızla püstülleşir, erozyona ugrar ve ülser oluşur. Ülser keskin sınırlı ve düzensiz kenarlıdır. Etrafında endurasyon yoktur. Tabanı yeşil veya sarı eksuda ile kaplıdır. Her iki cinste de otoinokülasyonla çoğul ülserler oluşmaktadır(yaklaşık hastaların %50'sinde). Erkeklerdeki lezyonların çoğu frenulum, sulkus veya prepişiyumun internal veya eksternal tarafında, kadınlarda vaginanın girişindedir. Inguinal LAP gelişebilir.Sistemik enfeksiyon oluşmaz(33).

b. H.parainfluenzae

Bu organizma ile endokardit vakaları çok sık rapor edilmiştir(tüm endokarditlerin %5'i). Çocuklardaki menenjit vakalarının birkaçında da etken olarak bildirilmiştir. Killian, bu raporlardan bazılarının yanlış identifikasyona bağlı olduğunu düşünmektedir. Ülkemizde de 1969-1979 yılları arasında bir, 1984'de de bir menenjit olgusu bildirilmiştir. H.parainfluenzae ile diğer enfeksiyonların oluşması çok nadirdir. Enfektif üretritlere de neden olabilmektedir(21,23,38).

c. *H.aphrophilus*

Çok müşkül pesent, mikroaerofil bir organizmadır. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*'a çok benzer. Özellikle beyin absesi ve endokardite neden olmakla birlikte sinüzit, menenjit pnömoni, bakteriyemi ve ampiyemden de izole edilmiştir. Enfeksiyonlar çoğunlukla travma sonucu veya orofarengeal enfeksiyon fokusundan gelişmektedir. Beyin abseli hastaların büyük bir kısmında, konjenital kalp hastalığı veya orofarenksi de içine alan bir enfeksiyon mevcuttur. Endokardit vakalarının çoğu kalp ve diş hastalıkları ile ilişkidir. Ayrıca *H.aphrophilus* izolasyonu ile malignensi ve kanser kemoterapisi arasında ilişki mevcuttur(2,26,33,34).

d. *H.haemolyticus*

Normal nazofarenks florasında bulunur. Çocukluk çağında nadiren az şiddetli Ü.S.Y.E'una neden olabilir(34).

e. *H.haemoglobinophilus*

Köpeklerde bulunur. İnsanlarda hastalık yapmaz. Ancak *H.haemoglobinophilus* ile oluşan bir otitis media vakası bildirilmiştir(33,38).

f. *H.paraphrophilus*

Endokardite neden olmaktadır(33).

g. *H.suis*

Bakteriyolojik olarak *H.influenzae*'ye benzer. Domuz influenza virusu ile sinerjik etki göstererek domuzlarda hastalık oluşturur(33,34,37).

2.9. Tanı Yöntemleri

2.9.1 Örneklerin Alınması

Hastalığa bağlı olarak üst ve alt solunum yolu, kulak, konjonktival sürüntü, BOS, kan, snoviyal ve plevral sıvılar gibi vücut sıvılarından örnek alınır. Alt solunum yolundan alınacak örneklerde flora kontaminasyonunu önlemek için bronşial yıkama suyu, transtrakeal aspirasyon gibi işlemlerin uygulanması önerilmektedir(33,38).

Pamuk, kalsiyum alginat veya dacron içeren eküvyonlar buyyonda ıslatılarak örnekler alınmalı ve transport besiyerinde laboratuvara ulaştırılmalıdır. Transport besiyeri olarak Modifiye Stuart Medium veya Amie's Charcoal Transport Medium tavsiye edilmektedir. Örnekler alındıktan sonra oda ısısında tutulmalı ve mümkün olduğu kadar çabuk ekimi yapılmalıdır. Bu organizmalar kuruluk ve soğuğa duyarlıdırlar. Konjonktiva örnekleri, mümkünse alındığı zaman direkt olarak izolasyon ortamına inoküle edilmelidir(15,26,33,38,63).

2.9.2. Direkt Mikroskopi

Hızlı tanı için, klinik örneklerin Gram boyası ile boyanmış preperatları yapılmalıdır. BOS, artrosentez, torasentez sıvıları, orta kulak aspiratları ve balgam örneklerinden Gram boyalı preparat hazırlanabilir. Özellikle menenjitte, beyin hasarı, mental retardasyon ve ölüm oluşması nedeni ile erken tanı konulması çok önemlidir. Santrifüjlü veya santrifüjsüz olarak yapılabilir. Santrifüjsüz veya filtrasyon ile konsantre edilen BOS lama yayılarak havada kurutulur. Absolü

metanolle 10 dakika tespit edildikten sonra Gram boyası ile boyanır. Preparat 10-30 dakika incelenmelidir. Preparatta Gram olumsuz, kısa, ince basiller aranır. Ayrıca lam üzerine 1 damla BOS veya balgam, 1 damla antiserum konularak kapsül şişme deneyi de uygulanabilir(33,35,38,58).

Kronik bronşit ataklarında ve bronşektazili hastalardan alınan balgam örnekleri, pankreatin gibi mukolitik bir enzimle muamele edilerek veya 15-30 dakika cam boncuk içeren steril suda çalkalanarak homojenize edildikten sonra Gram boyası ile boyanarak incelenmelidir(15,16,58).

Klinik örneklerden tip b identifikasyonunda, florescein işaretli antitip b serumu kullanılarak floresan antikor tekniği(F.A.T.)de uygulanabilir(5,33).

2.9.3. Kültür

Kültür için çukulata, Levintal agar ve Fildes besiyeri tavsiye edilmektedir. Haemophilus influenzae'nin ilk izolasyonunda süt anne deneyi de kullanılabilir.

Süt anne deneyinin yapılışı: Paralel çizgiler halinde H.influenzae ekilmiş besiyerine yüzey kuruyunca bu çizgilere dik ve orta yerde bir çizgi boyunca S.aureus ekilir. Yeterli inkübasyondan sonra, S.aureus'un etrafında küçük çig tanesi gibi kolonilerin oluştuğu gözlenir. Çukulata agar tercih edilmesine rağmen, eğer örnek diğer mikroorganizmalarla çok fazla kontamine değil ise bu test tercih edilebilir(9,33). Levinthal agar, özellikle kapsüllü ve kapsülsüz H.influenzae suşlarının ayırımında faydalıdır. Kapsüllü suşlar ışığı kırıcı, kapsülsüz olanlar ise saydam,

ışığı kırmayan ve mavimsi renktedir. Çukolata agarda oluşan koloniler 1 mm çapında, S tipi, yarı opak, sümüksü ve konvekstir. Fare kokusu yayarlar.

Üst ve alt solunum yollarından alınan örneklerde izolasyon şansı, basitrasın ilave edilmiş çukolata agar veya çukolata agar+basitrasın+ vankomisin+klindamisin içeren seçici besiyerleri kullanılarak arttırılabilir(2,9,12,26,33,34,58).

Kültürler 35-37 °C'de 18-24 saat aerob ortamda inkübe edilmelidir. H.aegyptius için bu süre 2-3 gün olup tavsiye edilen besiyeri, %1 isoVitalex ilave edilmiş çukolata agardır(9,33,38,58).

Kültürlerden yapılan Gram boyamada, Gram olumsuz kokobasilden, flamantöz formlara kadar değişen morfolojilerde görülebilirler(33,34,35).

X ve V Faktör Gereksiniminin Tespiti: X ve V faktör gereksinimlerinin tespitinde ticari olarak hazırlanmış X ve V faktör diskleri veya stripleri kullanılmaktadır. Kültürlerdeki 24 saatlik koloni, 5 ml'lik triptik soy brotha alınır. Bu süspansiyonun yapılması, ilk izolasyonun yapıldığı besiyerinden herhangi bir X faktörü taşındığında bunun dilue edilmesi açısından faydalıdır. Bu süspansiyon, triptik soy agar veya brain heart infüzyon agara yayılır. Faktör diskleri 20mm aralıklarla agar yüzeyine yerleştirilip %3-10 CO₂'li ortamda 35 °C'de inkübe edilir. H.Influenzae, sadece XV faktör diski etrafında ürer(5,33).

Ticari disk veya striplerle X faktör gereksinimi tespitinde problem çıkmaktadır. Çünkü hiçbir basit besiyeri tamamen X faktöründen yoksun değildir ve inokulumla da X faktörünü taşımaktan tamamen kaçınmak zordur. Bu yüzden %18 Haemophilus susu yanlış identifiye edilebilmektedir(21,27,33). Bu nedenle de porfirin

testi önerilmiştir. Bu testle, delta aminolevulinik asitten (ALA), hemin sentezlemek için gerekli enzimi olmayan suşlar tesbit edilebilmektedir. H.influenzae'da bu test negatiftir. X'e gereksinimi olmayan suşlar besiyerine porfobilinojen ve porfirin yayarlar(21,27,33).

2.9.4.Biyotiplendirme ve Biyokimyasal Reaksiyonlar

Türlerin identifikasyonunda sükroz, laktoz ve glukoz fermentasyonu önemlidir. Bu testler fenol red broth base'e, otoklavdan çıktıktan sonra X ve V faktör(10 mg) ve %1 karbonhidrat ilavesiyle yapılan besiyerinde yapılmaktadır. H.influenzae sadece glikozu fermente etmekte sükroz ve laktoza etki etmemektedir(21,33,61).

Ayrıca indol, ureaz ve ornitin dekarboksilaz testleri, H.influenzae ve H.parainfluenzae'nın biyotiplerinin saptanmasında kullanılmaktadır. Şimdiye kadar H.influenzae'nın 8 biyotipi saptanmıştır. Bu testler Killian tarafından önerilen ticari testlerle yapılmaktadır. Biyotiplendirme, epidemiyoloji açısından önemlidir. H.influenzae'nın belirli biyotipleri, izolasyon kaynağı, antimikrobiyol duyarlılık ve invaziv hastalıklarla ilişkilidir(15,21,26,29,33,44,51).

2.9.5.Serotiplendirme

H.influenzae, kapsüller polisakkaritlerdeki farklılıklara göre a'dan f'ye kadar 6 serolojik tipe ayrılmaktadır. Serolojik tiplendirme daha çok virulan olan Hib'in saptanmasında önemlidir. İzolatlardan; lam aglutinasyonu, quellung reaksiyon, counterimmunelektroforez(CIE), latex aglutinasyonu(LA), antiserum agar

metod immüofloresan(F.A.T.) ve koaglutinasyonla tiplendirme yapılabilir. Ingram, ilk 5 metodu, nazofarıngeal H.influenzae izolatlarının serotiplendirilmesinde değerlendirmiş ve CIE ve LA' u biraz daha duyarlı bulmuştur. Bununla birlikte LA ile çapraz reaksiyonlar gözlenmektedir. Ayrıca CIE ve antiserum agar metodu da lam aglutinasyonundan daha az pratiktir. Lam aglutinasyon metoduyla da pek çok problem bildirilmiştir. En sık görülen problem, tiplendirilemeyen izolatların, tip b olarak identifiye edilmeleridir. Himmelreich, Barenkamp ve Storch, lam aglutinasyonu ve koaglutinasyonu kesinlik, kolaylık ve hızlılığı nedeni ile tavsiye etmişlerdir. Lam aglutinasyonu, Hib taşıyıcılarının taramasında ucuz, kolay ve hızlı bir testir(31,33).

Lam aglutinasyonunda, otoaglutinasyonu tesbiti için kontrol olarak tuzlu su kullanılmalı temiz zeminde oluşan kuvvetli aglutinasyon pozitif olarak kabul edilmelidir. Reaksiyonlar 30-60 saniye sonra değerlendirilmelidir(33).

Lam aglutinasyonunun yapılışı: 6-18 saatlik kültürden alınan izolatın,%5 formalin içeren serum fizyolojik içinde süspansiyonu hazırlanır. Lam üzerine 1'er damla bu süspansiyondan ve anti serum damlatılarak karıştırılır. 1 dakika içinde aglutinasyon değerlendirilir(33,38).

Detaylı epidemiyolojik çalışmalarda H.influenzae suşların ayırımında sero ve biyotiplendirme yeterli değildir. Bu gibi durumlarda dış membran proteinlerine veya lipopolisakkaritlerine göre subtiplendirme yapılmalıdır(21,33).

2.9.6. Vücut Sıvılarında Antijen Aranması

Koaglütinasyon (CoA), Latex aglütinasyon (LA), counterimmünelektroforez (CIE), ELISA ve RIA ile Hib solubl kapsüller polisakkariti tesbit edilebilir. Antijen aranması, hastalar antibiyotik tedavisi almadan önce yapılmalıdır. En duyarlı yöntemler ELISA ve RIA'dır. Birkaç çalışmada, BOS'daki Hib polisakkarit konsantrasyonu ile hastalığın şiddeti ve prognozu arasında paralellik olduğu rapor edilmiştir. Vücut sıvılarında özellikle BOS'da Hib polisakkaritinin aranmasında, LA ve CoA'un CIE'dan daha duyarlı olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Ancak BOS hariç serum ve idrar gibi vücut sıvılarında nonspesifik aglütinasyonlar (veya yalancı pozitif reaksiyonlar) rapor edilmiştir. Marcon, Hamoudi ve Connon vücut sıvılarında antijen aranmasında latex aglütinasyonun, koaglütinasyon ve CIE'den daha üstün olduğunu göstermişlerdir (13,33,38,40,55).

H.influenzae'nin 6 kapsüller polisakkariti ile benzer antijenlere sahip bazı bakteriler olmakla birlikte, laboratuvar tanısında bu durum gerçek problem yaratmamaktadır (38).

H.influenzae tip b kapsüller materyali ile çapraz reaksiyon veren bakteriler: B.alvei, B.pumilus, E.coli K100, L.plantarum, S.aureus, S.epidermidis, S.faecalis ve S.pneumoniae tip 6,15a,29,35a dır (9,21,37,38,50).

2.10. Epidemiyoloji

H.influenzae'nin insandan başka doğal konakçısı bilinmemektedir. Kapsülsüz H.influenzae suşları normalde

nazofarenks florasında yer almaktadır. Enfeksiyon kişiden kişiye damlacık yolu veya enfekte vücut sekresyonları ile direkt temas sonucu bulaşmaktadır(9,33,34,35,46).

Kapsülsüz *H.influenzae* suşlarının nazofarenkste taşınma oranı, sağlıklı çocuklarda %60-90, yetişkinlerde %35'dir. Çocuklardaki izolatların %5'i kapsüllü bunların yarısı *H.influenzae* tip b dir. Bu oran gündüz bakım evleri ve diğer kapalı popülasyonlarda %50'ye kadar yükselmektedir. Erişkinlerde ise %0,4'ü b tipindedir(35,46).

Invaziv enfeksiyon sıklığı yaşa bağlıdır. Büyük çocuklar ve erişkinlerde oran düşüktür. Hayatın ilk 2 ayında da nadiren enfeksiyon görülmektedir. (Maternal antikörlerin transplasental geçişinden dolayı) *H.influenzae*, tüm dünyada 5 yaş altındaki çocuklarda oluşan bakteriyel menenjit vakalarında en sık görülen etiyolojik ajandır. Tip b septisemisi, menenjit, sellülit ve septik artrit de daha çok 2 yaş altında görülür. 7-14'üncü aylarda görülme sıklığı artmaktadır. Epiglottit ise en sık 3-5 yaşları arasında görülmektedir(2,35,46).

ABD'lerinde yılda yaklaşık 8000(1.24/100,000) Hib menenjiti vakası görülmektedir. Epiglottit insidansı ise 0.7/100,000'dir. İlk aşı denemesinin yapıldığı Finlandiya'da ise 1974'de tüm popülasyonda *H.influenzae* enfeksiyonu insidansı 3.3/100,000 olarak saptanmış olup vakaların %84'ü 5 yaş altı çocuklardır. 5 yaş altı çocuklarda insidans 41/100,000'dir(46,48).

Yetişkinlerde önceleri pek alışılmadık olan *H.influenzae* enfeksiyonları, son zamanlarda sık sık dikkati çekmektedir. Yetişkinlerde özellikle kronik bronşitteki akut hecmelerden ve bronşektazili hastalarda sekonder

enfeksiyonlardan sorumlu olduğu gösterilmiştir(17,38).

Son yıllarda gelişen laboratuvar teknikleri sayesinde invaziv H.influenzae enfeksiyonların gerçek insidansının daha önce bildirilenlerden 4 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. H.influenzae ile oluşan enfeksiyonlar tüm dünyada görülmektedir. Ancak Alaska Eskimoları,Navajo ve Apachi kıızılderililerinde bu enfeksiyonlar belirgin olarak çok sık görülmektedir. Sekonder vakalardaki artan insidans, gündüz bakım evleri ve aile içinde oluşmaktadır. Normal popülasyonla karşılaştırıldığında, aile üyeleri arasında enfeksiyon bulaşmasının 500 kat daha fazla olduğu gösterilmiştir. En büyük risk grubu 2 yaş altındaki çocuklardır.

Hib enfeksiyonları; kadınlarda, siyahlarda, fakir ailelerde ve kış aylarında daha sık görülmektedir. Ig yetmezlikleri, sickle cell anemi,splenektomi ve kronik pulmoner enfeksiyon gibi konak faktörleri de bu durumu etkilemektedir. Yetişkinlerde, primer akciğer hastalığı ve alkolizm,H.influenzae pönomonisi riskini artırmaktadır(35,46).

2.11. Antimikrobiyal Duyarlılık Ve Tedavi

ANTİMİKROBIYAL DUYARLILIK

Çogu Haemophilus suşu; penisilin, penisilin türevleri, kloramfenikol, sülfonamidler ve tetrasiklinlere duyarlıdır. 1970'lere kadar H.influenzae'nın bütün suşları ampisiline duyarlıydı. Bu yüzden de antibiyotik duyarlılık testi gereksiz bulunuyordu. Son zamanlarda, H.influenzae izolatlarının %25'den fazlasının ampisiline direnç gösterdiği gözlenmiştir. Diğer biyotiplerle karşılaştırıldığında Biyotip I suşları arasında %9

ampisilin direnci saptanmıştır(26,33,38,39,46,58).

Ampisilin direnci, beta laktamaz plazmidleri ile taşınmaktadır. Kromozomal ampisilin dirençliliği de rapor edilmiştir. Bütün klinik olarak önemli, H.influenzae izolatlarına beta laktamaz ve antibiyotik duyarlılık testleri yapılmalıdır. Beta laktamaz aktivitesi;idiyometrik,asidometrik ve kromojenik sefalosporin testleriyle araştırılabilir. Besiyerinde farklı morfoloji gösteren kolonilere, ayrı ayrı beta laktamaz testi uygulanmalıdır. Çünkü muhtemel kromozomal ampisilin direncinde beta laktamaz aktivitesi yoktur. Antibiyotik duyarlılık testi,bütün beta laktamaz yapan suşlara uygulanmalıdır. Antibiyotik duyarlılığı için Müeller Hinton besiyerine 15 mg/ml hematin, 15 mg/ml NAD ve 5 mg maya ekstratı eklenmesi tavsiye edilmektedir(5,33,36).

Çok nadir olmasına rağmen kloramfenikole ve ampisiline dirençli izolatlar rapor edilmiştir(ABD ve Avrupa'da). Kloramfenikole direnç,sıklıkla kloramfenikol asetil transferaz enzimi ile oluşmaktadır. Ticari olarak mevcut disklerle bu aktivite tespit edilebilir(C.A.T.)(26,45,46).

TEDAVİ

Ampisiline dirençli suşların bulunması nedeni ile,ciddi enfeksiyonların tedavisinde kloramfenikol kullanılmaktadır. 1986'da Amerikan Pediatri Akademisi, H.influenzae menenjitinin başlangıç tedavisinde kloramfenikol ve ampisilini önermiştir. Antibiyotik duyarlılık testi yapıldıktan sonra, uygun antimikrobiyal ajanla tedaviye devam edilmelidir. Kloramfenikol,BOS ve kemikler dahil, enfekte dokuların

çogunda seruma oranla oldukça yüksek konsantrasyonlara ulaşmaktadır. Kloramfenikol, H.influenzae için bakterisidaldir, çok iyi klinik sonuçlar elde edilmektedir. Doza bağlı ve reversibl kemik iligi toksisitesi sıktır.Ancak klinik problem olarak seyrekdir. Yenidoğan ve karaciger hastalığı olan kişilerde ciddi toksisite gelişebilmektedir.Kloramfenikole bağlı irreversibl kemik iligi aplazisi çok nadirdir(1,26,46).

Sistemik enfeksiyonlarda kullanılan kloramfenikolün başlangıç dozu 75-100 mg/kg/gün'dür. 6 saatlik aralarla iV olarak uygulanmaktadır. Kemoterapi süresi hastalığın durumuna bağlıdır. Ancak kültürler negatifleşinceye, ateş düşüncüye ve aktif enfeksiyonun laboratuvar ve klinik bulguları kaybolana kadar tedaviye devam edilmedir. Ampisiline duyarlı suşlarla menenjit oluşan bazı hastalarda,ampisilin tedavisi ile enfeksiyon temizlenmeyebilir. Veya tedavinin kesilmesinden kısa bir süre sonra yeni semptom ve bulgular oluşabilir.Bu durumda kloramfenikol ile ilave bir terapi endikedir. Perikardit, endokardit veya osteomyelitli hastalarda 3-6 hafta gibi uzun bir süre tedavi uygulanmalıdır(46).

Sistemik H.influenzae enfeksiyonlarının akut fazında kusma ve ileus oldukça sık görüldüğünden oral tedavi tavsiye edilmez. Ancak akut hastalık yatıştıgında oral kloramfenikol, septik artrit ve menenjit tedavisinin tamamlanmasında etkili olabilmektedir. Son zamanlarda 3.jenerasyon sefalosporinler ve beta laktam antibiyotiklerin de etkinlikleri araştırılmıştır. Ancak bu ilaçlar çok pahalıdır ve tavsiye edilen antibiyotiklerden fazla bir üstünlükleri de yoktur(46).

Pnömonili hastalarda sefalosporinler sıklıkla tercih edilmektedir. Cefuroxim 0,75-1,5 g 8 saat arayla,

cefotaksim 1,5-2,0 g 8 saat arayla veya ceftriaxone 1,0-2,0 g 24 saatte bir uygulanmaktadır.

Otitis mediada ampisilin 50-75 mg/kg/gün 10 gün süre ile verilmelidir. Sinüzit, 3 hafta veya daha fazla antibiyotik tedavisi gerektirebilir.

Ayakta tedavi gören hastalarda ampisilin direnci varsa trimetoprim-sülfometoksazol (trimetoprim 8 mg/kg/gün, sülfometoksazol 40 mg/kg/gün)günde 2 kez veya cefaclor 60 mg/kg/gün 4 dozda verilebilir(46).

2.12. Immünite ve Korunma

2.12.1. Immünite

1933'de Fethergill ve Wrigth, pek çok yeni doğan, büyük çocuklar ve yetişkinlerin kanlarında H.influenzae tip b'ye karşı bakterisidal aktivite olmasına rağmen, 3 ay - 3 yaş arası çocuklarda bu aktivitenin olmadığını gösterdiler. Bu bakterisidal aktivitenin spesifik antikorlarla oluştuğu düşünüldü. Alexander, H.influenzae menenjitinde, tip b kapsülüne karşı yüksek titrede antikorlarla tedavi uygulandığında, BOS'daki organizmaların fagositozunda dramatik bir artış olduğunu gözledi. Bu durum tip b kapsülünün antifagositik olabileceğini ve tipe özgül antikorlarla opsonizasyonun bağışıklıkta ana rolü oynadığını düşündürdü. Son 20 yılda yapılan çalışmalarda anti PRP antikorlarının koruyucu immünitede rol aldığı ispatlandı. Çocuklarda tip b kolonizasyonu olmadan antikorların bulunması, bu antikorların yiyecekler ve normal flora bakterilerinde bulunan çapraz reaksiyon veren epitoplarla oluştuğunu düşündürdü. Özgül bakterisidal opsonik aktiviteye sahip antikorların artmasından, kapsüller polisakkarit ile

immünojenik benzerliği olan E.coli O75 :

K100:H5 antijeninin sorumlu olduğu gösterildi(34,35,37,46,52,58).

18-24 aylığa kadar olan çocuklarda, enfeksiyon sırasında serumda anti PRP antikoru düşük veya yoktur. Konvelesan dönemde de düşüktür. Bu durum immün toleransa bağlı değildir. Fakat insanlarda pek çok polisakkaritlere ve diğer T.cell independent antijenlere cevabın doğal olarak gecikmesi tipiktir. Th'lar, etkin olarak aktive olmamaktadır. H.influenzae enfeksiyonuna karşı koruyucu anti PRP antikor seviyeleri 0,04-1,00 mikrogram/ml'dir(37,46).

Çocuğ erişkinde serumda anti PRP antikoru, tesbit edilebilir düzeyde olmamasına rağmen tib b'ye karşı bakterisidal ve opsonizan aktivite mevcuttur. Bu yüzden hem kapsüller hemde somatik antijenlere karşı oluşan antikoruyla koruyucu immünitenin sağlandığı aşıkardır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarla, lipopolisakkarit ve dış membran proteinlerine karşı oluşan antikor cevabıyla sonuçlanan doğal Hib enfeksiyonu ve bu antikoruların koruyucu potansiyelleri deneysel enfeksiyonlarla gösterilmiştir(35,37,46).

H.influenzae'ye karşı lokal/mukozal immünitenin rolü çok az bilinmektedir. Muhtemelen sekretuar antikoru, H.influenzae'nın solunum yolu mukozasına yapışmasını engellemektedir. Fakat IgA'nın mukozal seviyede veya kan akımına diğer antikoruların aktivitesini bloke ederek enfeksiyona duyarlılığı arttırabileceğine dair bazı bulgular mevcuttur(46).

Fethergil ve Wright, 56 °C'da ısıtılmakla, insan serumunun H.influenzae'ye karşı bakterisidal aktivitesinin kaybolduğunu bularak H.influenzae enfeksiyonlarında konak cevabında, kompleman

komponentlerinin önemli rolü olduğunu vurgulamışlardır. Invitro, kapsüllü ve kapsülsüz suşlar, hem klasik hem de alternatif yoldan komplemanı aktive etmektedir. Deneysel enfeksiyon sonuçları ve özgül konjenital kompleman yetersizliği olan hastalarda piyojenik enfeksiyonlara duyarlılığın artmasıyla da bu desteklenmiştir. C3,C2 eksikliği ve C3b inaktivatör eksikliği olan kişilerde, H.influenzae enfeksiyonlarına karşı duyarlılığın arttığı gözlenmiştir(46).

Hücre sel emilim veya bakterisidal etkiyle öldürme antikor, kompleman PNL(Polimorf nüveli lökositler) ve mononükleer fagositik sistem hücrelerinin ortak etkisi ile oluşmaktadır. Dalacı alınmış veya dalak fonksiyonları azalmış kişilerde H.influenzae sepsisi ve menenjitine duyarlılık artmaktadır(46).

Hib'e karşı duyarlılığın genetik olarak araştırılması ile de ilginç sonuçlar elde edilmiştir. Epiglottitisli ve menenjitli hastalar karşılaştırıldığında, eritrositlerdeki MNS fenotipi ve HLA antijenlerinde belirgin farklılıklar mevcuttur. Ayrıca menenjit sonucu oluşan serum anti PRP antikor cevapları, epiglottitisli çocuklardan daha düşüktür. Düşük cevap direkt olarak G2m(n) allotipinin yokluğu ile koreledir. IgG2 antikorlarının ağır zincir markırı olan G2m(n) fenotipi siyahlar ve Hispanic'lerde, düşük insidans göstermektedir(46).

Güney Carolina'da yapılan bir çalışmada Km(1) immünglobülin allotipine sahip siyahlarda, aşıya karşı gelişen antikor cevabının, bu allotipi olmayan siyahlardan 3 kat fazla olduğu ve bu allotipe sahip siyahlarda, serumda IgG2 konsantrasyonlarının yüksek

Finlandiya'da yapılmış ve 3ay-5yaş arası 49,000 cocuğa PRP aşısı uygulanmıştır.24 aylık ve daha büyük çocuklarda koruyucu etki oluşmuş, nazofarengeal taşıyıcılığa etkisiz olduğu gösterilmiştir. Bu aşı 1985 yılında Kuzey Amerika'da lisans almış ve 2 yaş ve üstündeki çocukların rutin aşılamaı tavsiye edilmiştir. Ancak bu aşının 18 aylıktan küçük çocuklarda,yani bütün vakaların yaklaşık %70-80'inde etkisi olmadığından, PRP'nin immünitesi, protein-oligosakkarit kompleksi veya protein-oligosakkarit kovalan bağlanmasıyla arttırılarak 2.jenerasyon bir aşı geliştirilmiştir(33,34,46,52).

Difteri toksoidi ile ve mutant nontoksik difteri toksini(CRM) ile hazırlanmış 2 konjuge aşı mevcuttur. Bu aşılarda 1987 Eylül'ünde ABD'lerinde lisansı alınmıştır. 18 aylık ve daha büyük çocuklarda tek doz olarak rutin uygulanması tavsiye edilmektedir. DBT, MMR ve oral polio aşısı ile birlikte uygulanabilir. %10 oranında enjeksiyon yerinde lokal reaksiyonlar ve yüksek ateş bildirilmiştir. PRP aşısı ile karşılaştırıldığında belirgin olarak yüksek antikor cevabının oluştuğu ve bu antikorların komplemana bağlı bakterisidal ve opsonik aktivitesinin olduğu gösterilmiştir. Aşının etkinliği %87(güvenlik sınırı %50-96)olarak saptanmıştır(46).

Kemoproflaksi

Ev halkı içindeki küçük çocuklarda belirgin olarak yüksek, sekonder invaziv enfeksiyon riski mevcuttur. ABD'lerinde, tahminen ev halkı temaslarında %2-4,gündüz bakım evlerinde ise %13 sekonder atak riski mevcuttur. Şüpheli temasta bulunan hassas yaş grubuna rifampin uygulanması bu riski

bulunduğu bildirilmiştir. Beyazlarda ise Km(1) veya G2m(23)allotipine bağlı olarak total veya IgG2 antikoru cevaplarında belirgin bir farklılık saptanmamıştır(28).

2.12.2. Korunma

Pasif Bağışıklık: Çeşitli patojenlere ve özellikle de H.influenzae enfeksiyonlarına duyarlılığı artmış hipogammaglobulinemili kişilere im. gamaglobulin enjeksiyonu ana tedavi yöntemlerinden biridir. Ticari immunglobulin preparatlarından 10 kez daha fazla immunglobulin içeren BPIG,(bakteriyel polisakkarit immunglobulin)PRP aşısı ile immunize edilmiş donörlerden hazırlanmış, farmakolojik ve koruyucu etkisi Apachi kızılderililerinde araştırılmıştır. Bunlarda 6 aylıktan önce %40'ında enfeksiyon oluşmakta ve aktif bağışıklık da önerilmemektedir. BPIG,4 aylık intervallerle verildiğinde belirgin bir bağışıklık sağlandığı gösterilmiştir(46).

Ocak 1986'da New-York'da yapılan bir çalışmada da, yüksek risk altındaki çocuklara ticari immunglobulin ve BPIG uygulanmış, enjeksiyonda 4-7 gün sonra BPIG verilenlerde,ticari immunglobulin verilenlerden 9 kat fazla antikor titresinde artma ve antikor titresindeki yksekliliğin 3 ay devam ettiği saptanmıştır. Tek doz 0,5 ml/kg BPIG'im.uygulanması ile çocuklarda 4 ay süren koruyucu etkisini sağlandığı sonucuna varılmıştır(3).

Aktif Bağışıklık: Yüksek mortalite ve morbiditesi ayrıca da dirençli suşların ortaya çıkması ile özgül antibiyotik tedavisinin karmaşık bir duruma gelmesi nedeni ile son 30 yıldır Hib'e karşı aktif bağışıklık çalışmaları yapılmaktadır. ilk aşı denemesi 1974'de

Finlandiya'da yapılmış ve 3ay-5yaş arası 49,000 cocuga PRP aşısı uygulanmıştır.24 aylık ve daha büyük çocuklarda koruyucu etki oluşmuş, nazofarengial taşıyıcılığa etkisiz olduğu gösterilmiştir. Bu aşı 1985 yılında Kuzey Amerika'da lisans almış ve 2 yaş ve üstündeki çocukların rutin aşılamaı tavsiye edilmiştir. Ancak bu aşının 18 aylıktan küçük çocuklarda,yani bütün vakaların yaklaşık %70-80'inde etkisi olmadığından, PRP'nin immünitesi, protein-oligosakkarit kompleksi veya protein-oligosakkarit kovalan bağlanmasıyla arttırılarak 2.jenerasyon bir aşı geliştirilmiştir(33,34,46,52).

Difteri toksoidi ile ve mutant nontoksik difteri toksini(CRM) ile hazırlanmış 2 konjuge aşı mevcuttur. Bu aşılarda 1987 Eylül'ünde ABD'lerinde lisansı alınmıştır. 18 aylık ve daha büyük çocuklarda tek doz olarak rutin uygulanması tavsiye edilmektedir. DBT, MMR ve oral polio aşısı ile birlikte uygulanabilir. %10 oranında enjeksiyon yerinde lokal reaksiyonlar ve yüksek ateş bildirilmiştir. PRP aşısı ile karşılaştırıldığında belirgin olarak yüksek antikör cevabının oluştuğu ve bu antikörlerin komplemana bağlı bakterisidal ve opsonik aktivitesinin olduğu gösterilmiştir. Aşının etkinliği %87(güvenlik sınırı %50-96)olarak saptanmıştır(46).

Kemoproflaksi

Ev halkı içindeki küçük çocuklarda belirgin olarak yüksek, sekonder invaziv enfeksiyon riski mevcuttur. ABD'lerinde, tahminen ev halkı temaslarında %2-4,gündüz bakım evlerinde ise %13 sekonder atak riski mevcuttur. Şüpheli temasta bulunan hassas yaş grubuna rifampin uygulanması bu riski

azaltmaktadır(26,34,46,52).

Rifampin'in 20 mg/kg/gün, (maximum doz 600mg /gün) oral olarak 4 gün verilmesi nazofarengeal taşıyıcılığın eradikasyonunda etkili olmaktadır.Amerikan Pediatri Akademisi tarafından,4 yaş altındaki çocukların bulunduğu ev halkı temaslarında bu tedavi önerilmiştir. Ancak rifampine dirençli izolatların oluşturduğu vakalar dahil, birkaç kez rifampinle başarısız sonuçlar alınmıştır. 4 yaş ve altındaki H.influenzae menenjitisi olan hastaya, evine döndüğünde 20 mg/kg/gün, 4 gün boyunca rifampin tedavisi verilmesi, taşıyıcılığı eradike etmek ve sekonder vakaları önlemek için tavsiye edilmektedir(46).

3. G E R E Ç V E Y Ö N T E M

Mayıs 89 ve Ocak 90 tarihleri arasında özellikle duyarlı yaş grubunda H.influenzae prevalansını saptamak amacıyla, hastalardan alınan; burun, kulak, konjonktiva ve BOS örnekleri üzerinde etiyoolojiye yönelik mikrobiyolojik çalışma uygulandı.

HASTA GRUBU

1. Klinik olarak menenjit, akut sinüzit, konjonktivit ve otitis media tanısı almış 495 (çeşitli yaş grubunda) hastadan alınan kulak, burun, BOS ve konjonktiva örneklerinin kültürü yapıldı.

2. Anadolu Üniversitesi yuvaları ve Sağlık Bakanlığına bağlı yuva ve kreşlerden 0-6 yaş grubu çocuklardan elde edilen 26 kulak, burun ve konjonktiva sürüntüsünün kültürü yapıldı.

MİKROBIYOLOJİK İNCELEMELER

1. Örneklerin toplanması

Konjonktiva, burun ve kulak kültürleri steril eküvyonla alındı. Burun kültürleri, spekulum yardımıyla sinüs ağızlarından elde edildi.

BOS kültürleri, steril şartlarda LP(lumbal ponksiyon) la elde edildi.

Alınan örnekler, eküvyonlu tüplerdeki transport besiyelerine daldırıldı. Transport besiyeri olarak örneklerin 135'inde buyyon, 360'ında Stuart Transport Medium kullanıldı. Anadolu Üniversitesi yuvaları ve Sağlık bakanlığına bağlı yuva ve kreşlerden elde edilen 26 örnekte transport besiyeri olarak Modifiye Stuart Medium kullanıldı(26,50).

2. Örneklerin incelenmesi

Örnekler en geç 1 saat içinde laboratuvara ulaştırılarak, rutin besiyelerine ve ayrıca 246

tanesi çukulata, Fildes ve GC Medium Base+Hb+Supplement BVX içeren besiyerlerine, 275 tanesi de sadece çukulata besiyerine ekildi. Kültürler 37 °C de 18-24 saat aerobik ortamda inkübe edildi(2,33,34,35).

HAEMOPHILUS INFLUENZAE İDENTİFİKASYONU

Örneklerin 37 °C de 18-24 saat inkübasyonu sonunda; kanlı besiyerinde S.aureus ve pnömokok kolonileri etrafındaki ince üremelerden ve çukulata besiyerindeki küçük, şebnem tanesine benzeyen 0,5-1,5 mm çapındaki saydam kolonilerden Gram boyalı preparat hazırlandı. x100 objektifte immersiyon yağı kullanılarak mikroskopta incelendi. Küçük, ince, Gram olumsuz bazen pleomorfizm gösteren kokobasiller görüldüğünde H.influenzae açısından değerlendirildi(33,34,35,37,46).

Şüpheli kolonilerden süttanne fenomenini saptamak için kanlı besiyerine pasaj yapılarak, aynı besiyerine S.aureus çizgi şeklinde ekildi. Ayrıca bu koloniler Tryptic Soy Broth'da 1/100 dilue edilerek Tryptic Soy Agarın tüm yüzeyine yayıldı. 30-35 mm aralarla besiyerinin yüzeyine BX, BV ve BVX faktör diskleri (Difco Differentiation discs BX, BV, BVX kod 1623-33) yerleştirilerek 37 °C de %5-10 CO₂ li ortamda 18-24 saat inkübe edildi(9,33,57,58).

Ertesi gün sadece BVX diski etrafında ve S.aureus kolonileri etrafında üreyen kolonilere serolojik tiplendirme yapıldı.

Serolojik tiplendirmede Difco Haemophilus influenzae Antiserum Poly(types a,b,c,d,e,f) (2237-50 kod no) ve tip b (2236-50) antiserum kullanıldı. Temiz bir lam üzerine 2 ayrı yere birer damla %0.9 NaCl solüsyonu ve antiserum damlatıldı. Her 2 damla üzerine 1 öze dolusu saf koloni konularak, karıştırıldı. 1 dakika sonra aglütinasyon oluşup

oluşmadığı gözlemlendi. Aglutinasyon görülünce aynı işlem tip b spesifik antiserumu ile uygulandı(33,38).

H.influenzae antiserum poly ve tip b antiserumu ile aglutinasyon veren koloniler; kültür özellikleri, mikroskoptaki tipik görünüm, süt anne fenomeni ve BVX faktör diski etrafında üremeleri ile birlikte değerlendirilerek H.influenzae tip b(Hib) olarak tanımlanmışlardır(33).

Polivalan antiserumla aglutinasyon verip, tip b antiserumu ile aglutinasyon vermeyen ancak kültür ve mikroskopik özellikleri tipik olan ve BVX diski etrafında üreyen, süt anne fenomeni pozitif suşlar tanımlanamayan, polivalan antiserumla aglutinasyon vermeyenler ise kapsülsüz H.influenzae olarak değerlendirildi.

KULLANILAN ÖZEL BESİYERLERİ

MODİFİYE STUART MEDIUM (CM111)

1 lt distile suda 16 g. toz besiyeri kaynatılarak eritildi. 1'er cc. tüplere konularak 121 °C de 15 dakika otoklavda sterilize edildi(22,33,50).

İÇERİĞİ: 1000 cc 'de

Sodium glycerophosphate	10.0 g.
Sodium thioglycollate	0.5 g.
Cyteine-HC	0.5 g.
Calcium chloride	0.1 g.
Methylene blue	0.001 g.
Agar No 1(Oxoid LII)	5.0 g.

ÇUKULATA BESİYERİ

800 cc distile suya Bacto Peptone(0118,01-8) 9 g. Oxoid Lab Lemco Powder (L29) 5 g., Bacto agar(0140-01) 10 g., Merck Natrium Chlorid krist.(3025823) 4 g. konulup kaynatıldı. 121 °C de 15 dakika sterilize

edilip 70 °C ye kadar sogutuldu. İcine %5 Hemoglobin solüsyonu(0136-02-5) konularak besiyerinin rengi kah-verengi oluncaya dek 80 °C de 15 dakika karıştırılarak ısıtıldı(22,33).

GC MEDIUM BASE Difco(0289-0,5-7)

100 cc distile suda 7,2 g. besiyeri kaynatılarak eritildi. 15 dakika 121 °C de otoklavda sterilize edilerek 45-50 °C ye kadar sogutulup içine aseptik şartlarda %2 Bacto Hemoglobin solusyonundan (0136-02-5) 100 ml ve her 100 ml bazal mediauma 2 ml Supplement BVX(3354-72) konularak hazırlandı(22).

İCERİĞİ: Proteose Peptone No3 Difco 15 g.
Corn Starch 1 g.
Potassium Phosphate dibasic 4 g.
Potassium Phosphate Monobasic 1 g.
Sodium Chloride 5 g.
Bacto Agar 10 g.

TRYPTIC SOY BROTH (0370-01-1)

1000 ml distile suda 30 g agar eritilip 121 °C de 15' otoklavda sterilize edildi(22,33).

İCERİĞİ: Bacto-Tryptone 17 g.
Bacto-Soytone 3 g.
Bacto-Dextrose 2,5 g.
Sodium Chloride 5 g.
Dipotassium Phosphate 2,5 g.

TRYPTIC SOY AGAR (0369-01-4)

1 lt distile suda 40 g. toz agar 5 dakika çalkalanarak eritildi. 1-2 dakika tamamen çözünme sağlanana kadar kaynatılıp 121 °C de 15 dakika otoklavda sterilize edildi(22,33).

İÇERİĞİ: Bacto Tryptone	15 g.
Pancreatic Digest of Casein	5 g.
Bacto Soytone	5 g.
Sodium Chloride	5 g.
Bacto Agar	15 g.

BRAIN HEART İNFÜZYON AGAR (Code CM375)

1 lt distile suda 47 g. agar kaynatılarak eritildi. 121 °C de 15 dakika otoklavda sterilize edildi(22).

İÇERİĞİ: Calf Brain

Infusion Solids	12.5 g.
Beef Heart	
Infusion Solids	5.0 g.
Proteose Peptone	
(Oxoid L46)	10.0 g.
Sodium Chloride	5.0 g.
Dextrose	2.0 g.
Disodium phosphate	2.5 g.
Agar No 1	10.0 g.
(Oxoid LII)	

FİLDES ENRİCHMENT BESİYERİ

Brain Heart infüzyon agar hazırlanıp 50-55 °C ye kadar soğutularak %10 oranında Bacto Fildes Enricment (0349-72-3) aseptik şartlarda ilave edilerek hazırlandı(22).

H.influenzae olarak tanımlanan izolatların, Kirby-Bauer disk diffüzyon yöntemi ile çukulata besiyerinde antibiyogramları yapıldı. Kloramfenikol, ampisilin, amoksisilin + klavulonik asit, cefotaksim, trimetoprim-sülfametaksazol, antibiyotik diskleri (Oxoid) kullanıldı. 37 °C de bir gece inkübe edilerek değerlendirildi(10).

4. B U L G U L A R

Bu çalışmada 169'u (%32.4) 0-6 yaş grubu, 352'si (%67.6) 6 yaş üzeri hastalardan alınan 521 örnekte etiyolojik ajan olarak H.influenzae prevalansı araştırıldı.

Tablo I: Örneklerin Yaşa Göre Dağılımı.

YAŞ GRUBU	SAYI	%
0-6 Yaş	169	32.4
6 yaş üzeri	352	67.6

TOPLAM	521	100

0-6 yaş grubundan toplanan 169 örneğin 143'ü Anadolu Üniversitesi Tıp Fakültesinin çeşitli polikliniklerine başvuran hastalardan, 26 tanesi de Anadolu Üniversitesi yuvalarından, Sağlık Bakanlığına bağlı yuva ve kreşlerden elde edildi.

Tablo II: 0-6 Yaş grubunda üretilen H.influenzae'nin örneklere dağılımı.

ÖRNEK	İZOLAT SAYISI	ÖRNEK SAYISI	%
Burun	1	54	1.85
Konjonktiva	4	51	7.8
Kulak	2	30	6.66
BOS	-	25	-

0-6 Yaş grubunda; 54 burun örneğinde 1, 51 konjonktiva örneğinde 4, 30 kulak örneğinde 2 H.influenzae izole edildi.

Tablo III : Örneklerin Dağılımı.

ÖRNEK	SAYI	%
Konjonktiva	210	42.43
Burun	194	39.19
Kulak	66	13.33
BOS	25	5.05

TOPLAM	495	100

Anadolu Üniversitesi Tıp Fakültesinde alınan 495 örneğin 210'u (%42.43) konjonktiva, 194'ü (%39.19) burun, 66'sı (%13.33) kulak, 25'i (%5.05) BOS örneğinden oluşuyordu.

Tablo IV: Konjonktiva kültürlerinin etkenlere göre dağılımı.

ETKEN	SAYI	%
Pnömonokok	14	6.66
Koagülaz negatif stafilokok	10	4.75
S.aureus	5	2.38
H.influenzae	4	1.90
Pseudomonas	4	1.90
A grubu beta hemolitik streptokok (GAS)	1	0.47
Kontaminasyon	8	3.80
Üreme yok	164	78.09

TOPLAM	210	100

Toplam 210 konjonktiva örneğinin 1'inden H.influenzae tip b (Hib), 2'sinden tiplendirilemeyen, 1'inden ise kapsülsüz H.influenzae izolasyonu yapıldı.

Tablo V: Burun Kültürlerinin Etkenlere Göre Dağılımı.

ETKEN	SAYI	%
<i>S.aureus</i>	20	10.31
Pnömonokok	12	6.18
<i>Proteus</i>	6	3.09
Koliform	3	1.55
<i>H.influenzae</i>	3	1.55
Beta hemolitik streptokok	1	0.52
Kontaminasyon	8	4.12
Normal burun florası	141	72.68

TOPLAM	194	100

194 Burun kültürünün 2'sinde *H.influenzae* tip b (Hib), 1'inde tiplendirilemeyen *H.influenzae* izolasyonu yapıldı.

Tablo VI: BOS Kültürlerinin Etkenlere Göre dağılımı.

ETKEN	SAYI	%
<i>N.meningitidis</i>	1	4
<i>S.aureus</i>	1	4
Üreme yok	23	92

TOPLAM	25	100

Toplam 25 BOS kültüründe, örneklerin hiçbirinden *H.influenzae* izole edilmedi.

Tablo VII: Kulak Akıntısı Kültürlerinin Etkenlere Göre Dağılımı.

ETKEN	SAYI	%
<i>Pseudomonas</i>	8	12.12
<i>Koliform</i>	4	6.06
<i>E.coli</i>	3	4.54
<i>Proteus</i>	2	3.03
<i>S.aureus</i>	2	3.03
<i>Fnömokok</i>	2	3.03
<i>H.influenzae</i>	2	3.03
<i>A grubu beta hemolitik streptokok</i>	1	1.52
Üreme yok	4	6.06
Normal dış kulak yolu florası	36	54.55
Kontaminasyon	2	3.03

TOPLAM	66	100

Toplam 66 kulak kültüründe, 2 örnekten *H.influenzae* tip b izole edildi.

B. Anadolu Üniversitesi yuvaları, Sağlık Bakanlığına bağlı yuva ve kreşlerden elde edilen 26 kültürün 21'i burun, 2'si konjonktiva, 3'ü de kulak akıntısı örneklerinden oluşuyordu.

Tablo VIII: Burun Kültürlerinin Etkenlere dağılımı.

ETKEN	SAYI	%
<i>H.influenzae</i> tip b	1	4.77
Normal burun florası	20	95.23

TOPLAM	21	100

Toplam 21 burun örneğinin 1'inden H.influenzae tip b (Hib) izolasyonu yapıldı.

Konjonktiva ve kulak akıntısı örneklerinden patojen bakteri izole edilmedi.

Tüm örneklerden 7'si 0-6 yaş grubundan olmak üzere toplam 10 tane H.influenzae izole edildi. Bu izolatların 6'sı H.influenzae tip b(Hib), 3'ü tiplendirilemeyen, 1'i kapsülsüz H.influenzae suşu olarak değerlendirildi. 6 Hib izolatınının 4'ü 0-6 yaş grubundan, 2'si ise 6 yaş üzeri hasta grubundan elde edildi.

0-6 yaş grubundan izole edilen 4 Hib suşundan biri burun diğeri kulak örneğinden elde edilmiş olup, burundan elde edilen suş, kanlı besiyerindeki S.aureus kolonilerinin etrafında ve çukulata besiyerinde, kulak örneğindeki ise kanlı besiyerinde pnömokok kolonileri etrafında ve çukulata besiyerinde yoğun olarak üredi.

4 Konjonktiva örneğinden izole edilen H.influenzae suşları sadece çukulata besiyerinde saf olarak, diğer suşlar ise çukulata besiyerinde flora bakterilerinin yanısıra yoğun şekilde ürediler.

Tablo IX: H.influenzae Suşlarının Örneklerle Dağılımı.

ÖRNEK	SAYI	İZOLAT SAYISI	%
Burun	215	4	1.86
Konjonktiva	212	4	1.88
Kulak	69	2	2.89
BDS	25	-	-

TOPLAM	521	10	

Toplam 521 örnekten 6'sı Hib, 1'i kapsülsüz, 3'ü tiplendirilemeyen H.influenzae olmak üzere toplam 10 H.influenzae suşu izole edildi.

Tablo X: H.influenzae izolatlarının Yaş Gruplarına Dağılımı.

YAŞ GRUBU	SAYI	%
0-6	7	70
6 yaş üzeri	3	30

Tablo XI: H.influenzae izolatlarının Cinsiyet, Yaş ve Örneklerle Göre Dağılımı.

NO	ÖRNEK	İZOLAT	CINSİYET	YAŞ
1	Burun	Hib	Erkek	4
2	Burun	Hib	Erkek	7
3	Konjonktiva	H.influenzae	Erkek	4
4	Burun	H.influenzae	Erkek	18
5	Konjonktiva	H.influenzae	Erkek	3
6	Kulak	Hib	Erkek	7/12
7	Konjonktiva	Hib	Kadın	50/365
8	Konjonktiva	H.influenzae	Kadın	2
9	Kulak	Hib	Erkek	1.5
10	Burun	Hib	Kadın	12

Tablo XII: İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları.

NO	İZOLAT	C	AMP	AMC	CTX	SXT
1	Hib	D	D	D	D	D
2	Hib	D	R	D	D	R
3	H.influenzae	D	R	D	R	R
4	H.influenzae	D	D	D	R	D
5	H.influenzae	D	R	R	R	R
6	Hib	D	D	R	D	R
7	Hib	D	D	D	D	D
8	H.influenzae	D	D	D	D	D
9	Hib	D	D	D	D	D
10	Hib	D	D	D	R	D

Not: C : Kloramfenikol

AMP: Ampisilin

AMC: Amoksisilin+Klavulanik asit

CTX: Sefotaksim

SXT: Sülfametoksazol-Trimetoprim

D : Duyarlı

R : Dirençli

10 izolatin hepsinin kloramfenikol'a duyarlı olduğu saptandı. Ampisilin'e 3'ü dirençli, 7'si duyarlı, sefotaksim'e 4'ü dirençli, 6'sı duyarlı, amoksisilin+klavulonik asit'e 2'si dirençli, 8'i duyarlı, sülfametoksazol-trimetoprim'e 4'ü dirençli, 6'sı duyarlı bulundu. Ampisilin'e dirençli 3 suştan 1'i Hib, 2'si ise tiplendirilemeyen H.influenzae suşu idi.

5. T A R T I Ş M A

1933 yılında epidemik gripin, gerçek etiyolojik ajanı olan virusun bulunmasıyla uzun süre üzerindeki ilgi azalan ve özellikle 2 ay-5 yaş arası küçük çocuklarda, başta akut bakteriyel menenjit olmak üzere pek çok ciddi çocukluk çağı enfeksiyonundan sorumlu olan H.influenzae, son 20 yılda gelişen laboratuvar teknikleri sayesinde tekrar eski güncelliğini kazanmıştır. Gelişen laboratuvar teknikleriyle, H.influenzae enfeksiyonlarının gerçek insidansının daha önce bildirilenlerden 4 kat fazla olduğu ve erişkinlerdeki birtakım enfeksiyonlarda da etken olduğu ortaya çıkarılmıştır(9,33,34).

Invaziv enfeksiyonlara yol açanlar kapsüllü H.influenzae suşları olup, 6 tip arasında en fazla görülen tip b dir. R tipi koloniler yapan kapsülsüz tipleri ise genellikle erişkinlerde, kronik solunum yolu hastalıklarında etken olarak izole edilmektedir. H.influenzae ile oluşan invaziv enfeksiyonlar; menenjit, septik artrit, akut sinüzit, pnömoni, sellülit, akut epiglottit, otitis media, perikardit ve bakteriyemidir. H.influenzae biyotip III(H.aegyptius:Koch Weeks basili) akut ve bulaşıcı tipte konjonktivitten sorumludur.(2,9,26,33,34).

Bu enfeksiyonlar içinde menenjit ve epiglottit erken tanı ve tedavi edilmezse çoğunlukla ölümlü sonuçlanmaktadır. Tedavi gören menenjit vakalarında mortalite hızı %5'den az olmakla beraber, hastaların yaklaşık yarısında çeşitli S.S.S. sekelleri oluşmaktadır. 2-4 yaşları arasında görülme sıklığı en fazla olan epiglottit ise, epiglotun normalden 5-10 kat büyümesi sonucu hava pasajını kapaması nedeniyle

dramatik ve potansiyel olarak öldürücü bir hastalıktır(33,46).

Bu çalışmada klinik olarak otitis media, akut sinüzit, menenjit ve konjonktivit tanısı alan 0-6 yaş grubundan 169, 6 yaş üzeri 352 hastadan alınan BOS, kulak akıntısı, burun ve konjonktiva sürüntülerinde *H.influenzae* etiyolojisine yönelik bakteriyolojik inceleme yapılmıştır. Sonuçta toplam 521 örnekten 10 tanesinde *H.influenzae* izolasyonu yapılmıştır(%1.92). Bu 10 izolatın 6 tanesi Hib olarak tespit edilmiştir. İzolatların 7 tanesi 0-6 yaş grubundan(%4.14), 3 tanesi 6 yaş üzeri(%0.85) hasta grubundan elde edilmiş olup, bu *H.influenzae* enfeksiyonlarının çoğunlukla 2 ay-6 yaş grubunda görüldüğü ve sıklıkla Hib'in izole edildiği klasik bilgileri ile uyumludur(33,34,37,38,46).

Çalışmamızda 215 burun kültürünün 4'ünde(%1.86), 69 kulak akıntısı örneğinin 2'sinde(%2.89), 212 konjonktiva örneğinin 4'ünde(%1.88) *H.influenzae* izolasyonu yapılmıştır. 25 BOS örneğinin hiçbirinden *H.influenzae* izole edilmemiştir.

Akut sinüzit olgularının %50'sinde *S.pneumoniae* ve *H.influenzae* etkindir. Diğer %50'sini ise çeşitli anaeroblar(%10) , *S.aureus*(%4), *S.pyogenes*(%2) ve *B.catarrhalis*(%2) oluşturmaktadır(26). Çalışmamızda 215 burun kültüründe 1'i 0-6 yaş grubu, 3'ü 6 yaş üzeri hastalardan olmak üzere 4 *H.influenzae* izolasyonu yapılmış olup 0-6 yaş grubundan elde edilen izolat Hib, 6 yaş üzeri gruptan izole edilenlerin ise 2'si Hib, 1'i ise tiplendirilemeyen *H.influenzae* olarak tespit edilmiştir. Burun kültürlerinden en fazla izole edilen etkenler sırası

ile; *S.aureus* (%10.31), *S.pneumoniae* (%6.18) ve koliformlar (%4.64) olmuştur.

Çaprak'ın akut ve kronik maksiller sinüzitlerin etiyojisine yönelik tez çalışmasında da burun kültürlerinde *H.influenzae* prevalansı 1.1 oranında bulunmuştur. Axelsson %13, Cengiz %2, Gwaltney %5.3 oranlarında *H.influenzae* üretmişlerdir. Gatlin ise bu bakteriyi bildirmemiştir. Çaprak'ın tez çalışmasında elde edilen oranın literatür bilgilerinden düşük olması; bakterinin nazik oluşu ve normal flora içeren örneklerden izolasyonun güçlüğü ile açıklanmıştır(17).

69 kulak akıntısı örneğinin 2'sinden (%2.89) Hib izole edilmiş olup olguların 1'i 7 aylık diğeri ise 7 yaşındadır. Çocukluk yaş grubunda otitis media en fazla görülen etkenler; *S.pneumoniae*, *H.influenzae* ve GAS'lardır. *H.influenzae* erişkinlerdeki otitis media vakalarında da sıklıkla izole edilmektedir. Çalışmamızda en fazla *pseudomonas* (%12.12) izole edilmiştir. Belen'in yaptığı çalışmada 0-13 yaş grubundaki çocuklarda %8 oranında *H.influenzae* izole edilmiştir. Bu çalışmada kulak akıntısı örneklerine ilave olarak hiperemik ve hipertrofik timpanik zarı olan hastalardan boğaz kültürü de alınarak etken saptanmıştır. Bu suşların 2'si kulak akıntısında 6'sı da boğaz ve nazofarenks sürüntülerinden izole edilmiştir. İzolatlara serotiplendirme yapılmamıştır(6).

212 konjonktiva örneğinden 1'i kapsülsüz 2'si tiplendirilemeyen 1'i Hib olmak üzere 4 *H.influenzae* izole edilmiştir (%1.88). Olguların hepsi 0-6 yaş grubundadır. Elde edilen Hib izolatının biyotiplendirilmesi yapılmadığından *H.aegyptius* olup

olmadığını söylemek mümkün değildir. Çocukluk yaş grubunda akut konjonktivitlerde en sık görülen etkenler; *H.influenzae*, *S.pneumoniae* ve *S.aureus*'tur. Erişkinlerde ise *S.pneumoniae*, *S.aureus* ve *S.epidermidis*dir(46).

Bizim çalışmamızda sırası ile en fazla; *S.pneumoniae*, *S.epidermidis* ve *S.aureus* izole edilmiştir. Gür'ün göz enfeksiyonlarında bakteriyel etkenlere yönelik araştırmasında 111 konjonktivit vakasının hiçbirinden, *H.influenzae* için özel besiyeri kullanıldığı halde *H.influenzae* izole edilmemiştir. Bu durum yurdumuzda bu organizmanın düşük sıklığına bağlanmıştır(30).

0-6 yaş grubunda elde edilen 25 BOS örneğinin hiçbirinden *H.influenzae* izole edilmemiştir. Berkman'ın araştırmasında 14.839 BOS örneğinin 14'ünde(%0.094) *H.influenzae* izolasyonu bildirilmiştir(7). Ulutan'ın çalışmasında ise, 0-3 yaş arasındaki 41 olguda hastabaşı kültür yapılmasına rağmen hiç *H.influenzae* izolasyonu yapılmamıştır. Bu durum bu bakterinin bazı ülkelerde (İskandinav ülkeleri gibi) nadiren menenjit etkeni olması ile açıklanmıştır(56). Nitekim ABD'inde 0-5 yaş grubunda *H.influenzae* menenjit etkeni olarak 1. sırada yer alırken, İngiltere'de *N.meningitidis* 1.sırayı işgal etmektedir(26,56). Şaylı'nın tez çalışmasında akut bakteriyel menenjitli çocuklardan alınan 24 BOS örneğinde *H.influenzae* prevalansı %8.3 olarak saptanmıştır. (Olguların 1'i lateks aglütinasyonu pozitif, 1'i kültür + lateks aglütinasyonu pozitif).

Çalışmamızda 25 olguda 1 *N.meningitidis* ve 1 *S.aureus* izolasyonu yapılmıştır. 25 BOS örneği bir değerlendirme yapmak için az olmakla birlikte

çalışmamızdaki izolasyon azlığı, hastabaşı kültür yapılmamış olması nedeniyle, soguga son derece duyarlı çoğu menenjit etkeninin üremesinin engellenmesiyle açıklanabilir.

Mamal'ın çalışmasında ise çeşitli örneklerden H.influenzae'nin %6.56 oranında izole edildiği bildirilmiştir. Bizim çalışmamızdan farklı olarak boğaz, vajina, balgam, kan, püy, dren sıvısı ve çeşitli vücut sıvılarından (perikard sıvısı, parasentez sıvısı, intraserabral apse) alınan örnekler de çalışmaya dahil edilmiştir. Ayrıca bakteri üretilmeyen vücut sıvılarında Hib antijeni lateks aglütinasyon yöntemi ile araştırılmıştır(41).

H.influenzae'nin izolasyon azlığının çeşitli nedenleri olabilir. Öncelikle bakterinin dış ortam koşullarına son derece duyarlı olması nedeniyle uygun transport besiyerlerine gereksinim duyması önemli bir faktördür. Çalışmamızda örneklerin bir bölümü Stuart transport besiyerinde laboratuvara ulaştırılmış olmakla birlikte önemli bir bölümünde de buyyon kullanılmıştır. Hasta başı kültür ya da örneklerin bekletilmeden ekilmesinin mümkün olmaması izolasyon azlığını açıklayabilir. Özellikle konjonktiva ve BOS kültürlerinin hasta başında yapılması önerilmektedir(30,56). Çalışmamızda hiçbir örnek için hastabaşı kültür uygulanmamıştır.

Bunların yanısıra diğer bir neden de yukarda da kısmen değinilen ülkeler arası prevalans farklılıkları olabilir(26,56). Dış kaynaklarda kapsülsüz H.influenzae'nin nazofarenkste taşınma oranı erişkinlerde %35, çocuklarda ise %60-90 civarındadır. Bebek ve küçük çocuklarda Hib taşıyıcılığı %4.6-6 arasındadır(35,46,59). Ülkemizde

ise Berkman'ın çalışmasında bu oran, bebek ve küçük çocuklarda H.influenzae için %2.96, Hib için %0.96 olarak bulunmuştur. Taşıyanlık oranı dış kaynaklara göre az olduğundan, enfeksiyonlarda izolasyon oranı düşük olması beklenebilecek bir sonuçtur. Nitekim araştırmacı, laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden Haemophilus izolasyonunun azlığına dikkati çekmektedir(8).

Bu etkene karşı koruyucu bağışıklık, tipe özgül kapsül polisakkaridine karşı bakterisid antikorların meydana gelişi ile kazanılır. Plasenta yolu ile anneden geçen antikorlar kaybolduktan sonra, bebek ve çocukların çoğunluğu, serumlarında anti tip b aktivitesi göstermezler. Buna karşılık toplumda 6 yaşına gelindiğinde anti tip b antikorlarının insidansı %95'i geçer. Mikroorganizmanın taşıyanlık sıklığının düşük olmasına karşılık 6 yaşında ulaşılan %95'lik serokonversiyonun sebebinin, normal gastrointestinal kanal elemanları arasında bulunan çapraz bağışıklık veren antijenlere sahip bazı bakteriler olduğu belirtilmiştir(11). Berkman'ın çalışmasında özellikle yenidoğan ve prematüre servislerinden gelen boğaz sürüntüsü örneklerinde %38-40 oranında koliform üremesi nedeniyle erken yaşlarda Hib'e karşı koruyucu antikor oluşumunu açıklamış ve boğaz florasında Hib kapsül polisakkaridi ile çapraz reaksiyon veren E.coli serotiplerinin bulduklarını göstermiştir(59). Schneerson ve Robbins erişkin gönüllülere O75:K100:H5 antijen yapısında E.coli suşlarını oral olarak verdikten sonra, serumlarında Hib kapsülü antijenine karşı antikor düzeyinde artış olduğunu bildirmişlerdir(49).

Çalışmamızda izole edilen 10 H.influenzae 2'si

kanlı besiyerinde 8'i ise çukolata besiyerinde üretilmiştir. Rutin besiyerinde üreyen 2 Hib izolatu 0-6 yaş grubundan elde edilmiş olup biri burun sürüntüsü diğeri de kulak akıntısı örneğidir. Burun sürüntüsünden izole edilen Hib, kanlı besiyerindeki S.aureus kolonileri etrafında kulak akıntısı örneğinden izole edilen Hib ise kanlı besiyerinde S.pneumoniae kolonileri etrafında yoğun olarak üremişlerdir. Diğer izolatların hepsi sadece çukolata besiyerinde saf veya yoğun üremiş olarak saptanmışlardır. Çalışmamızda bazı örneklerin kültüründe çukolata besiyerinin yanısıra Haemophilus'a özel (üremesini arttırıcı, kolaylaştırıcı) besiyerleri de kullandık. Ancak hiçbirinde H.influenzae izole edilmediği için, besiyerleri arasında karşılaştırma olanakı bulamadık.

Çalışmamızda izole edilen 10 H.influenzae suşunun Kirby-Bauer disk diffüzyon yöntemi ile yapılan antibiyogram çalışmasında suşların hepsinin kloramfenikole duyarlı olduğu saptanmıştır. 3'ü ampisiline, 4'ü sefotaksime, 2'si amoksisilin + klavulonik aside, 4'ü ise trimetoprim - sülfametaksazole dirençli bulunmuştur. Mamal'ın çalışmasında elde edilen izolatlarının %90'ının kloramfenikol ve penisiline, %97'sinin trimetoprim - sülfametaksazole, %100'ünün ise gentamisin, amikasin, mezlosilin, azidosiline duyarlı olduğu saptanmıştır (41). Antibiyogram sonuçlarımız, H.influenzae'nın %25'in üzerinde ampisilin direnci göstermesi ve kloramfenikole duyarlı olması klasik bilgileriyle uyum göstermektedir (33, 38, 46).

Bulgularımızın ve literatür bilgilerimizin ışığında, H.influenzae enfeksiyonlarında ampirik

tedavide ilk seçenek kloramfenikol olup olarak bulunduğunda antibiyogram sonuçlarına göre davranmak uygun olacaktır. Bulgularımız en fazla izolasyonun 0-6 yaş grubunda toplandığını göstermektedir. Buna göre hiç olmazsa bu yaş grubunu ilgilendiren ve Haemophilus izolasyon şansı yüksek olan klinik örneklerin rutin besiyerlerinin yanısıra, klasik kitaplarda her zaman önerilen ancak pratikte ihmal ettiğimiz çukulata veya diğer seçici besiyerlerine ekilmesi uygun olacaktır. Ancak en ucuzu çukulata besiyeri olduğu için tercih edilmelidir.

6. SONUÇLAR

1. Klinik olarak menenjit, otitis media, akut sinüzit ve konjonktivit tanısı almış 0-6 yaş grubundan 169, 6 yaş üzeri 352 hastadan alınan ~~521 örnekten~~ 10 H.influenzae izole edilmiştir.

2. Tüm örneklerde, bütün yaş gruplarında en fazla izole edilen bakteriler; konjonktivada pnömokok (%6.66), burunda S.aureus (%10.31), kulakta pseudomonas (%12.12), BOS'da ise N.meningitidis (%4) ve S.aureus (%4) olmuştur.

3. Konjonktiva örneklerinin %1.88'inden, burun örneklerinin %1.86'sından, kulak örneklerinin %2.89'undan H.influenzae izole edilmiş, BOS örneklerinin hiç birinden H.influenzae üretilmemiştir.

4. H.influenzae izolatlarının 7'si 0-6 yaş grubundan, 3'ü ise 6 yaş üzeri hasta grubundan elde edilmiştir.

5. 10 H.influenzae suşundan 1'i kanlı besiyerinde S.aureus kolonileri, 1'i de pnömokok kolonileri etrafında ve çukulata besiyerinde yoğun olarak üretilmiştir. Diğer 8 suş ise sadece çukulata besiyerinde üretilmiş, kanlı besiyerinde üretilmemiştir.

6. Fildes enrichment besiyeri ve GC medium base+BVX supplement+Hb solüsyonu içeren besiyerlerine yapılan kültürlerden H.influenzae üretilmemiştir.

7. 10 H.influenzae izolatının 6'sı Hib (H.influenzae tip b), 1'i kapsülsüz, 3'ü ise tiplendirilemeyen H.influenzae suşu olarak değerlendirilmiştir.

8. 6 Hib izolatının 4'ü 0-6 yaş grubundan, 2'si ise 6 yaş üzeri hasta grubundan elde edilmiştir.

9. Tüm H.influenzae izolatları kloramfenikole duyarlı bulunmuştur. İzolatların 3'ünde ampisiline,

4'ünde sülfametaksazol-trimetoprim ve sefotaksime, 2'sinde amoksisilin + klavulonik asite direnç gözlenmiştir.

10. Ampisiline dirençli 3 suşun 1'i Hib, 2'si ise tiplendirilemeyen H.influenzae suşudur.

11. Literatür bilgilerimiz ve bulgularımız en fazla H.influenzae izolasyonunun 0-6 yaş grubunda toplandığını göstermektedir. Bu yüzden de bu yaş grubunu ilgilendiren ve H.influenzae izolasyon şansı yüksek olan örneklerin, rutin besiyerlerinin yanı sıra çukulata besiyerine de ekilmesi çok uygun bir yaklaşım olacaktır.

12. Ampirik tedavide ilk seçenek kloramfenikol olmalıdır. Ancak olanak bulduğunda antibiyogram sonuçlarına göre tedavi uygulanmalıdır.

7. Ö Z E T

H.influenzae, özellikle 2 ay-5 yaş arası çocuklarda başta akut bakteriyel menenjit olmak üzere, epiglottit, otitis media, akut sinüzit, konjonktivit, septik artrit gibi invaziv enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Bunlardan menenjit ve epiglottit, tedavi edilmezlerse ölümlü sonuçlanabilmektedir. Tedavi edilen menenjit vakalarında ise halen %5-10 ölüm olmakta ve hastaların yarısında da kalıcı santral sinir sistemi sekelleri oluşmaktadır. Kapsülsüz *H.influenzae* suşları da erişkinlerdeki çeşitli enfeksiyonlardan sorumlu tutulmaktadır(15,46).

Bu çalışmada yöremizde özellikle duyarlı yaş grubunda ve tüm yaş gruplarında görülen çeşitli enfeksiyonların etiyolojisinde, *H.influenzae*'nin yeri araştırıldı. Bu amaçla, klinik olarak akut sinüzit, konjonktivit, menenjit, otitis media tanısı almış hastalardan elde edilen burun ve kulak salgısı, BOS ve konjonktiva sürüntülerine *H.influenzae* için özel besiyerleri kullanılarak kültür çalışması uygulandı. Örneklerin 135 tanesi buyyon, 360 tanesi de Stuart transport medium içinde laboratuvara ulaştırıldı. Örneklerin rutin besiyerlerine ve çukulata, Fildes Enrichment, GC Medium Base+Supplement BVX+Hemoglobin solüsyonu içeren besiyerlerine ekimleri yapıp, 18-24 saat aerobik ortamda 37 °C de inkübe edildi. Kültür görünümleri *H.influenzae* için karakteristik olan kolonilere Gram boyama, XV faktör gereksiniminin araştırılması, satellit fenomeni, serotiplendirme ve

antibiyogram uygulandı(2,8,24,30,35,46).

Sonuçta çeşitli yaş gruplarından toplanan 521 örnekte 10 H.influenzae izolasyonu gerçekleştirildi. 0-6 yaş grubundan toplanan 169 örneğin 7'sinde (%4.14), 6 yaş üzeri 352 örneğin ise 3'ünde(%0.85) etken olarak H.influenzae saptandı. Tüm yaş gruplarında prevalans %1.92 olarak bulundu.

Kirby-Bauer disk diffüzyon yöntemi ile antibiyogram uygulanarak bütün izolatların kloramfenikol'e duyarlı, 3'ünün ampisilin'e, 4'ünün sefotaksim'e, 2'sinin amoksisilin+klavulonik asit'e, 4'ünün ise sülfametaksazol-trimetoprim'e dirençli olduğu saptandı.

K A Y N A K L A R

1. Akalın, H.E.: Antibiyotikler. Türk Tabipleri Birliği Yayınları, Ankara, 1989.
2. Akan, E.: Tıbbi Mikrobiyoloji, Oba Kitapevi, Konya, s:218-234, 1986.
3. Ambrosino, M.D., Landesman, S.H. and et al.: Passive Immunization Against Diseases Due to Haemophilus influenzae Typeb: Concentrations of Antibody to capsular Polysaccharide in High-Risk Children, The J.of Inf.Dis., 153:1, pp:1-7, 1986.
4. Ballard, T.L., Spangler, A. and et al.: Clinically Significant Cross-Reactions with Counterimmunoelektroforesis between Pneumococcus Type6 and Haemophilus influenzae Typeb, J.of Clinical Mic., 22:5, pp:754-756, 1985.
5. Bauer, D.J.: Clinical Laboratory Methods, Ninth Edition, The C.V. Mosby Company, London, pp:866-877, 1982.
6. Belen, A., Günalp, A.: Çocukluk Çağı Bakteriyel Kökenli Akut Otitis Media Enfeksiyonlarında Boğaz ve Nasofarinks Kültürlerinin Değeri. Mikrobiyoloji Bülteni, 15, s:131-139, 1981.
7. Berkman, E.: Bakteriyel menenjit etkeni olarak Salmonella cinsi bakterilerin önemi, Mikrobiyoloji Bülteni, 16:239, 1982.
8. Berkman, E.: Boğaz Kültürlerinde Haemophilus influenzae insidansının araştırılması. Mikrobiyoloji Bülteni, 20, s:76-83, 1986.
9. Bilgehan, H.: Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. Bilgehan Basımevi, İzmir, s:140-152, 1986.
10. Bilgehan, H.: Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. Fakülteler Kitapevi, İzmir, 1989.
11. Bradshaw, W. and et al: Bakteriyel Antigens Cross-Reactive with the capsüler Polysaccharide of

Haemophilus influenzae Type b, Lancet i, 1096, 1973.

12. Chapin, C.K. and Doern, V.G.: Selective Media for Recovery of Haemophilus influenzae from Specimens Contaminated with Upper Respiratory Tract Microbial Flora, J.of.Clinical Mic., 17:6, pp:1163-1165, 1983.

13. Collins, K.J., Kelly, T.M.: Comparison of Phadebact Co agglutination, Bactogen Latex Agglutination and Counterimmuno-electrophoresis for Detection of Haemophilus influenzae Type b Antigens in Cerebrospinal Fluid J.of.Cli.Mic., 17:6, pp:1005-1008, 1983.

14. Connor, M.E. and Loeb, R.M.: A Hemadsorption method for Detection of Colonies of Haemophilus influenzae Type b Expressing Fimbriae, The J.of.Inf.Dis., 148:5, PP:855-860, 1983.

15. Cruickshank, R., Duguid, J.P., Marmion, P., Swain, R.H.A.: Medical Microbiology, Twelfth Edition. Volume 1, Microbial Infections, Edinburger and London, pp:272-275, 1973.

16. Cruickshank, R., Duguid, J.P., Marmion, B.P., Swain, R.H.A.: Medical Microbiology. Twelfth Edition, Volume II. New-York, pp:379-380, 1975.

17. Çaprak, S.: Akut ve Kronik Maksiller sinüzitlerde Nazofarenks, Burun ve Sinüs Ponksiyonu Kültür Sonuçlarının Karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 1990.

18. Çetin, E.T.: Pratik Mikrobiyoloji. 2.Baskı, Mentek Matbaası, İstanbul, 1968.

19. Çetin, E.T.: Enfeksiyon Hastalıkları. Cilt 10, İstanbul Tıp Fakültesi Klinik Ders Kitapları, İstanbul, s:104, 105, 109, 1979.

20. Çetin, E.T., Derbentli, Ş.: Akut Bakteriyel Menenjit Etkenleri. Klinik Dergisi, 1:2, s:5-8, 1988.

21. Derbentli, B.Ş., Anđ, Ö.: Haemophilus parainfluenzae'nin etken olduğu menenjit vakası. Türk Mik.Cemiyeti Dergisi, 14:3-4, s:49-55, 1984.

22. Difco Manual, Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology, Tenth Edition. Detroit, Michigan 48232 USA, p:359,1025,1027,426,163.

23. Ergenç,H., Töreci,K., Anđ,Ö., Çetin,E.T.: Pürülân Menenjit Vakalarının Klinik ve Bakteriyolojik İncelenmesi. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 4:51, 1974.

24. Eriquez,L.A. and Hodinka,N.E.: Development of Test System for Rapid Differentiation of Neisseria and Haemophilus spp., 3.of.Cli.Mic., 18:5, pp:1032-1039, 1983.

25. Eskola,J., Peltola,H.: Efficacy of Haemophilus influenzae Type b Polysaccharide Diphtheria Toxoid Conjugate Vaccine in Infancy, The New England J.of Med.317, pp:717-721, 1987.

26. Finegold,M.S. and Beran,J.E.: Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology, Seventh Edition, Mosby Company. pp:444-45-,334,342,341, 1986.

27. Gadberry,L.J. and Amos,M.A.: Comparison of a New Commercially Prepared Porphyrin Test and The Conventional Satellite Test for the idantification of Haemophilus Species That Reguire The X Faktör, J.of.Cli.Mic., 23:3, pp:637-639, 1986.

28. Granoff,M.D., Scackelford,G. and et al: Anti-body Responses to Haemophilus influenzae Type b Polysaccharide Vaccine in Relation to Km(1) and G2 m(23) immunoglobulin Allotypes, J.of. Inf.Cli.Mic.18:4, pp:1015-1016, 1983.

29. Gratten,M.: Haemophilus influenzae Biotype VII.J.of.Cli.Mic.18:4, pp:1015-1016, 1983.

30. Gür,D., Yuluğ,N.: Göz enfeksiyonlarında bakteriyel etkenler, Mikrobiyoloji Bülteni, 20:145-159, 1986.

31. Heikkila,R., Takalo,A. and et al.: Latex Agglutination Test for Screening of Haemophilus influenzae Type b Carries. J.of.Cli.Mic., 25:6,

pp:1131-1133, 1987.

32. Hirshel, J.B., Avckenthaler, R. and et al.: Recurrent Meningitis in an Adult Due to Nontypable *Haemophilus influenzae*. *The J.of.Inf.Dis.*, 149:4, p:656, 1984.

33. Howard, J.B.: *Haemophilus*, In *Clinical and Pathogenic Microbiology*. Howard, Klass II, Rubin, Weissfeld, Tilton (Editors), Mosby company. pp:279-287, 1987.

34. Jawetz, E., Melnick, J.L., Adelberg, E.A., Brooks, G.F., Butel, J.S., Ornston, L.N.: *Review of Medical Microbiology*, Lange Medical Public, California, pp:226-228, 1989.

35. Joklik, K.W., Willett, H.P., Amos, D.B.: *Zinsser microbiology*, Eighteenth Edition, Appleton-Century-Crofts/Norwalk, Connecticut. pp:507-517.

36. Jorgensen, H.J., Redding, S.J. and et al.: Improved Medium for Antimicrobial Susceptibility Testing of *Haemophilus influenzae*, *J.of.Cli.Mic.*, 25:11, pp:2103-2113, 1987.

37. Killian, Mogens.: *Haemophilus*, in *Microbiology*, Braude, A.I., Davis, C.E., Fierer, J., Igaku-Shoin-Sounders International Edition, pp:387-391, 1982.

38. Killian, Mogens.: *Haemophilus*, In *Manuel of Clinical Microbiology*. Lennette, E.H., Balows, A., Hausler, W.J., Shadomy, H.J., Fourth Edition, Washington, pp:387-392, 1985.

39. Long, S., Teter, M.J. and Gilligan, P.M.: Bio-type of *Haemophilus influenzae*: Correlation with Virulence and Ampicillin Resistance, *The J.of Inf.Dis.*, 147:5, p:800, 1983.

40. Macone, A.B., Arakere, G. and et al.: Comparison of a New Rapid Enzyme-Linked Immunosorbent Assay with Latex Particle Agglutination for the Detection of *Haemophilus influenzae* Type b Infections,

J.of.Cli.Mic., 21:5, pp:711-714, 1985.

41. Mamal,M.: İnsandan izole edilen *Haemophilus* cinsi bakteriler üzerinde çalışmalar. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 17:1-2, s:1-9, 1987.

42. Mamal,M., Öz.S.: *Haemophilus influenzae* serotip b. Biyotip V in etken olduğu bir kolesistit olgusu. *İnfeksiyon Dergisi*, 1:4, s:267-272, 1987.

43. Marcon,J.M., Hamaudi,A. and Cannon,J.H.: Comparative Laboratory Evaluation of Three Antigen Detection Methods for Diagnosis of *Haemophilus influenzae* Type b Disease, *J.of.Cli.Mic.*, 19:3, pp:333, 1984.

44. Matthews,J.S., Reynolds,J.A. and et al.: Rapid Species Identification and Biotyping of Respiratory Isolates of *Haemophilus* spp., *J.of.Cli.Mic.*, 18:3, pp:472-475, 1983.

45. Mendelman,P.M., Doroshov,A.C. and et al.: Plazmid Mediated Resistance in Multiply Resistant *Haemophilus influenzae* Type b Causing Meningitis. Molecular Characterization of One Strain and Review of the Literature, *The J.of.Inf.Dis.*, 50:1, p:1061, 1984.

46. Moxon,E.R.: *Haemophilus influenzae*, In Principles and Practice of Infections Diseases, Mandell, Douglas, Bennett(Editor), Third Edition, pp:1722-1729, 1990.

47. Patterson,J.E., Madden,G.M. and et al.: Nasocomial Outbreak of Ampicillin-Resistant *Haemophilus influenzae* Type b in a Geriatrik Unit. *The J.of.Inf.Dis.*, 157:5, p:1002, 1988.

48. Peltola,H., Kayhty,H. and et al.: Prevention of *Haemophilus influenzae* Type b Bacteremic Infections with the Capsular Polysaccharide Vaccine. *The New England J.of.Med.*, 314:24, pp:1561-1565, 1984.

49. Schneerson,R. and et al.: Induction of Serum

Haemophilus influenzae Type b Capsüler Antibodies in Adult Volunteers Fed Cross Reacting E.coli 075:K100:H5, New England Journal of Medicine, 292:1093, 1975.

50. Sonnenwirth, A.C., Jarett, L.: Gradwohl's Clinical Laboratory Method and Diagnosis, Volume Two. Eighth edition, The C.V. Mosby Company, London, pp:1833-1837, 1556-1557, 1980.

51. Sottnek, F.O., and Albritton, W.L.: Haemophilus influenzae. Biotype VIII. J.of.Cli.Mic., 20.4, PP.815-816, 1984.

52. Stites, D.P., Stobo, J.D., Wells, J.V.: Basic and Clinical Immunology, Sixth Edition, Middle East Edition, p:538, 685, 1987.

53. Sturm, A.V.: Haemophilus Influenzae and Haemophilus parainfluenzae in Nongonococcal Ürethritis. The J.of.Inf.Dis., 153:1, pp:165-167, 1986.

54. Şaylı, T.: Akut bakteriyel menenjitin erken tanı ve takibinde serum ve beyin omurilik sıvısı C-reaktif protein, beyin omurilik sıvısı immünglobulin düzeyleri ve latex aglütinasyonu ile etken saptanması, Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 1989.

55. Turhanoglu, M., Atlıhan, F., Arıkan, E.: Bakteri menenjitlerinin tanısında latex aglutinasyon testinin değerlendirilmesi, Enfeksiyon Dergisi, 3:3, s:303-310, 1989.

56. Ulutan, F., Günalp A.: Çocuklarda akut bakteriyel menenjit etkenleri ve hasta başında yapılan kültürün önemi, Mikrobiyoloji Bülteni, 18:29-36, 1984.

57. Unat, E.K.: Temel Mikrobiyoloji. Sermet Matbaası, Kırklareli Vize, s:467-468, 1985.

58. Unat, E.K.: Tıp Bakteriyolojisi ve Virolojisi. Dergah Yayınları, İstanbul, s:645-656, 1982.

59. Uraz, G., Berkmen, E.: Boğaz kültürlerinden izole edilmiş ve Haemophilus influenzae ile çapraz

reaksiyon veren *Escherichia coli* serotipleri. Mikrobiyoloji Bülteni. 20, s:284-289, 1986.

60. Ward, I.J., Lum, M.K.W. and et al.: Invazive *Haemophilus influenzae* Type b Diseases in Alaska: Background epidemiology for a Vaccine Efficacy Trial. *The J.of.Inf.Dis.*, 153:1, pp:17-26, 1986.

61. Ward, I.J., Brenneman, G. and et al.: *Haemophilus influenzae* Type b Anticapsular Antibody Responses to RPR-Pertussis and RPR-D Vaccines in Alaska Native Infants, *J.of.Inf.dis.*, 158:4, p:719, 1988.

62. Willson, G., Miles, A.: *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity*, Edward Arnold (Publishers) Ltd, Fifth Edition, In Volume I, London, pp:957-986,

63. Yücel, A., Mamal, M., Saraç, A.: *Haemophilus influenzae* serovar b biyovar 5 ile oluşan bir daktriyosistit vakası, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 17:3-4, s:227-231, 1987.