

156271

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**HAEMOPHILUS INFLUENZAE
VE HAEMOPHILUS PARAINFLUENZAE
BAKTERİLERİNİN İZOLASYONU
β-LAKTAMAZ AKTİVİTESİ VE ANTİBİYOTİK DİRENCİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. NESRİN AGASI

İSTANBUL 2005

Mikrobiyoloji alanındaki eğitimim sırasında yakın ilgisini gördüğüm , değerli katkılarıyla beni yönlendiren hocam sayın Prof. Dr. Emel Bozkaya'ya teşekkür ediyorum.

Daima yardımcı yaklaşımı ile tez çalışmam boyunca destek olan , bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım , tezimin yürütülmesinde emek ve teşviklerini esirgemeyen kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Rahmiye Berkiten'e teşekkürü borç biliyorum.

Her zaman yakınlığı ve değerli katkılarıyla beni yönlendiren değerli hocam sayın prof. Dr.Kurtuluş Töreci'e içten teşekkürlerimi belirtmek istiyorum..

Bilgilerinden yararlandığım,dostluk ve desteğini esirgemeyen sayın Prof. Dr. Çiğdem Bal'a teşekkür ediyorum.

Ayrıca bilgilerinden yararlandığım, değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Ergene Büget , Prof. Dr. Selim Badur , Prof. Dr. Şengül Derbentli , Prof. Dr. Bülent Gürler , Prof. Dr. Nezahat Gürler , Prof. Dr. Yıldız Yeğenoğlu , Prof. Dr. Şadi Yenen , Prof. Dr. Betigül Öngen , Prof. Dr. Mine Anđ Küçüker , Prof. Dr. Ali Ağaçfıdan , Prof. Dr. Ali Öner , Prof. Dr. Derya Aydın , Prof. Dr. Melte.n Uzun , Doç. Dr. Özden Büyükbaba Boral , Doç. Dr. Zayre Erturan , Doç. Dr.Arif Kaygusuza'a teşekkür ediyorum.

Bilgilerinden yararlandığım, destek gördüğüm.Uzm.Dr. Emine Özkan ve Uzm.Dr. Melek Şalcioğlu'na teşekkür ediyorum.

Dr. Nesrin Agasi

2005

İÇİNDEKİLER

SAYFA

I.	KISALTMALAR	
II.	GİRİŞ	1
III.	GENEL BİLGİLER	3
IV.	GEREÇ VE YÖNTEM	15
V.	BULGULAR	25
VI.	TARTIŞMA	35
VII.	ÖZET VE SONUÇLAR	48
VIII.	KAYNAKLAR	51

KISALTMALAR

ABD.....Ana Bilim Dalı

AKÇA.....At kanlı çikolata agar

ASY.....Alt solunum yolu

BA.....Basitrasinli ikolata agar

BHİA.....Brain heart infusion agar

BOS.....Beyin omurilik sıvısı

BVC.....Basitrasin,vankomisin,klindamisin

BVCA.....Basitrasin ,vankomisin ,klindamisin'li çikolata agar

Hib.....Haemophilus influenzae tip b

KKA.....Koyun kanlı agar

KOAH.....Kronik obstrüktif akciğer hastalığı

MHA.....Müller Hinton agar

NGÜ.....Non gonokoksik üretrit

ODC.....Ornitin dekarboksilaz

ÜSY.....Üst solunum yolları

GİRİŞ

Pasteurellaceae ailesinde yer alan Haemophilus cinsi bakteriler insanda çeşitli infeksiyonlara yol açan, kuruluk ve soğuk gibi dış koşullara çok duyarlı bakterilerdir. Pittman (1957) sıcak kanlılarda rastlanan Haemophilus cinsi bakterileri, izole edildikleri vücut bölgelerine ve üreme ihtiyaçlarına göre 14 türe ayırmıştır. Bunlar arasında H.influenzae en önemli tür olmakla beraber diğer türler de infeksiyonlara neden olabilmektedir. Pfeiffer basili de denilen H.influenzae ilk önce 1892 de Pfeiffer tarafından grip etkeni olarak influenzae basili adıyla tarif edilmiş ve 1983 de üretilmiştir.

1931'de Pittman kapsül polisakkaritlerine göre H.influenzae'yı a , b , c , d , e , f harfleri ile gösterilen altı serotipe ayırmıştır. Daha sonra H.influenzae ve H.parainfluenzae türleri bazı biyokimyasal özelliklerine göre biyotiplere ayrılmıştır. H.influenzae çocukluk döneminde yaşamı tehdit edici boyutlarda infeksiyonlara neden olmaktadır. Bu bakteriye bağlı meningeal ve sistematik infeksiyonların % 95 inden Haemophilus influenzae tip b (Hib) sorumlu iken, üç yaşından büyüklerde kanın bakterisit etkisi nedeniyle seyrek olarak menenjit ve septisemiye neden olduğu görülmektedir. Erişkin pnömonilerinden ise tiplendirilemeyen H.influenzae bakterisi sorumlu

tutulmaktadır. Bu mikroorganizmaların normal koşullarda steril olan kan, BOS, plevra ve sinovyal sıvılardan izole edilmesi rahat, tanı koydurucu iken ÜSY florasındaki mikroorganizmaların kolay üremesi nedeni ile Haemophilus cinsi bakterilerin baskılanıp gözden kaçması mümkündür.

Bu çalışmada Haemophilus cinsi bakterilerin izolasyonunda kolaylık sağlayacak uygun selektif besiyerinin seçilmesi, suşların identifikasyonu, beta-laktamaz aktivitelerinin varlığı ve antibiyotik duyarlılıklarının saptanması amaçlanmıştır.



GENEL BİLGİLER

MORFOLOJİ VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Haemophilus cinsi bakteriler zorunlu parazit olup sağlıklı insanların ÜSY flora bakterilerinin yaklaşık %10'unu teşkil eder. Bergey Manuele göre insanlardan on, domuzlardan iki, inek ve süt hayvanlarından iki, köpeklerden bir farklı hemofil türü izole edilmiştir. İnsan için tıbbi önemi olanlar başta H.influenzae olmak üzere H.aegyptius, H.haemolyticus, H.parainfluenzae, H.parahaemolyticus, H.aphrophilus, H.paraphrophilus, H.segnis ve H.ducreyi türleridir (19,56,83,97).

Bu bakteriler kokobasilden filamantoz şekle kadar değişen morfolojiye sahip olup Gram negatif, hareketsiz, sporsuz ve fakültatif anaeroptur. İnvaziv infeksiyonlardan izole edilen suşlar çoğunlukla kapsüllüdür. Bazıları nemli, % 5-10 CO₂'li ortamda ve pH 7.2-7.4 de daha iyi ürer. Optimal üreme ısıları 33-37°C dir (83). Bazı türleri karbonhidratları fermente ederler. Bazıları fermentasyon besiyerlerinde gaz oluşturur. Son taksonomik verilere göre farklı bir cinsden kabul edilen H.ducreyi bilinen bu fermentasyon besiyerlerine etki etmemektedir. Tümü nitratı indirger ve alkalin fosfataz oluşturur. Suşların büyük çoğunda oksidaz ve katalaz pozitifdir (56). Üremeleri için X ve V faktörlerinden birine, ya da her ikisine birden gereksinim duyarlar (19,56,83,97). X faktörü (protoporphyrin IX veya protohem) hemoglobine bağlı ve ısıya dirençli hemindir. V faktörü ise ısıya duyarlı koenzim I veya nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) dir. Hücre metabolizmasında

hidrojen alıcısı olarak kullanılır ve 120°C de bir kaç dakikada etkisiz hale gelir. Patates, domates suyu ve mayalarda bulunmaktadır. Stafilokoklar da bu faktörü yapabilmektedir. Dolayısıyla V faktörüne ihtiyacı olan hemofiller stafilokokların etrafında kolaylıkla ürerler. Bu olaya süt anne deneyi veya satellit etki denmektedir (20,56,88,97)(Şekil 1).

Hemofillerin üretilmesinde tavşan, at ve keçi kanları uygun olmasına karşın, koyun kanı V faktör üzerine inhibitör etki gösterdiğinden kullanılamaz. Çeşitli türlerin bazı özellikleri tablo 1'de gösterilmiştir (19,56,97).

Haemophilus türlerinin belirlenmesinde bakterilerinin X ve V faktörüne olan ihtiyaçlarına göre identifikasyonu, tanı laboratuvarları açısından büyük kolaylık getirmekle birlikte tüm suşlar için güvenilir değildir. Örneğin H.pleuropneumoniae, taksonomisi güç olan türlerden biridir. Bu organizma genellikle V faktörüne ihtiyaç gösterir. Fenotipik olarak domuz nekrotizan pleuropnömonisi yapan Pasteurella haemolytica'ya benzer. İki türün DNA genomları % 91 oranında benzerlik gösterir. DNA analizlerinde Actinobacillus lignieresii ile de %72-75 oranında benzerlik bulunmaktadır(56).

Bunları temel olarak Pohl ve arkadaşları (83) H. pleuropneumoniae'nın Actinobacillus cinsine transferini önermektedirler. X ve V faktörüne göre sınıflamanın yetersiz olduğu diğer örnekler, H.parainfluenzae ve H.ducreyi'dir .

H.parainfluenzae güney Afrika suşları, V faktöründen bağımsızdır. Bu özelliğin 5.25 kb'lık plazmid tarafından aktarıldığı gösterilmiştir. H.ducreyi cins içindeki diğer türlerden önemli farklılığı olmasına rağmen X faktörüne gereksinimi, nitrat redüktaz aktivitesi ve % 38 mollük DNA G+C içeriği, H.ducreyi'nin Haemophilus cinsi içinde yer almasına neden olmuştur. DNA çalışmaları H.ducreyi'nin Haemophilus cinsi içindeki diğer türlere temelde çok benzemediğini ve bu cins içine

alınmasının doğru olmadığını göstermektedir. Pohl, Haemophilus, Pasteurella veya Actinobacillus cinslerine ait 32 türden 70 suşu DNA hibridizasyon tekniği ile incelemiş ve bu alanda bir çok veri ortaya koymuştur. Daha önce iki ayrı tür olarak belirlenen H.influenzae ve H.aegyptius'un DNA hibridizasyonu ile aynı tür olduğu ortaya çıkmıştır (83).

Tablo 1. Haemophilus türlerinin biyokimyasal özellikleri (19,56,97)

ÜRLER	X faktör	V faktörü	Hemoliz	Glikoz	Sukroz	Laktoz	Mannit	Ksiloz	Galaktoz	CO2 ihtiyacı	Katalaz	Oksidaz	Nitrat redüksiyon
<i>H.influenzae(H.aegyptius)</i>	+	+	-	+	-	-	-	(+/-)	+	-	+	+	+
<i>H.haemolyticus</i>	+	+	+	+	-	-	-	(+/-)	+	-	+	+	+
<i>H.ducreyi</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>H.parainfluenzae</i>	-	+	-	+	+	-	+	-	+	(+/-)	(+/-)	+	+
<i>H.paraahaemolyticus</i>	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>H.segnis</i>	-	+	-	(+)w	(+)w	-	-	-	(+/-)	-	(+/-)	-	+
<i>H.paraphrophilus</i>	-	+	-	+	+	+	+	(+/-)	+	+	-	+	+
<i>H.aphrophilus</i>	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
<i>H.parasuis</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+
<i>H.haemoglobinophilus</i>	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
<i>H.avium</i>	+	+		+	+	(+/-)	(+/-)		(+/-)	+			+
<i>H.paragallinarum</i>	-	+	-	+	(+/-)	(+/-)	+	+	(+/-)	+	+	-	+
<i>H.pleuropneumoniae</i>	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	(+/-)	(+/-)	+

w = Zayıf reaksiyon

+ => %90 suşlar pozitif

± = Değişken

- => %90 suşlar negatif

Aynı zamanda *H.aegyptius*, *H.influenzae* biyotip III ile benzer biyokimyasal özelliklere sahiptir. *H.aegyptius*'un invitro olarak daha zayıf üremesi, ince uzun çomak şeklinde görünmesi, eritrositleri aglutine edebilmesi, ksilozu fermente etmemesi ve troleandomycin'e (5µgr) duyarlı olması, NAD ve hemin ilaveli triptik soy agarda ürememesi özellikleri ile *H.influenzae*'dan ayırımı mümkün olmakla birlikte bu özelliklerin hiç biri kesin ayırıcı kriter değildir. Ancak *H.influenzae* biyotip III ve *H.aegyptius*'un farklı diğer membran protein profilleri, bu iki bakterinin ayrımında önemli bir kriter olarak kullanılabilir (21,56). Casin ve arkadaşları (21) *H.aegyptius* ve *H.influenzae* arasındaki biyokimyasal ve genetik benzerliklerden dolayı *H.aegyptius*'un, *H.influenzae* biyotip III'e benzediğinden, daha önce *H.aegyptius* olarak kabul edilen suşları *H.influenzae* biyogrup *aegyptius* olarak adlandırmışlardır.

TIBBİ ÖNEMİ OLAN HAEMOPHILUS TÜRLERİ VE YAPTIĞI HASTALIKLAR

1- H. influenzae biyogrup aegyptius (H.aegyptius)

Görünüm, üreme özellikleri ve serolojik bakımdan *H.influenzae*'ya benzeyen *H.aegyptius* 1883' de ilk olarak Koch tarafından Mısır'da bir çok konjunktivit vakasında görülmüş ve 1887 de Weeks adında New York'lu göz hekimi tarafından üretilmiştir (97). *H.aegyptius* Brezilya purpurik ateşi (BPF) etkenidir ve daha çok tropikal ve subtropikal bölgelerde görülür (19,21,56,83,97) .

2-H.haemolyticus

İnsan ve domuzlardan izole edilmiştir. Patojenitesi sınırlı olan bu bakteri ÜSY normal florasında bulunur. Çocuklarda nadiren infeksiyon yapar. Erişkinlerde subakut bakteriyel endokardite neden olur. Invitro olarak β hemoliz oluşturur (19,95).

3 -H.parainfluenzae

ÜSY ve ağız mukozası normal florasında bulunmaktadır. Faranjit, nadiren bakteriyel endokardit etkeni olmakla birlikte seyrek olarak NGÜ yapabilmektedir. Bazı yazarlar *H.parainfluenzae* ile

meydana gelen genital infeksiyonların orogenital temas sonucu oluştuğunu ileri sürmektedir. 8 biyotipi olan bu bakteriler üremek için yalnız V faktörüne gereksinim duyarlar (19,56,87,96) (Şekil 2).

4- *H.paraaemolyticus*

Hemolitik suşların 1953 de Margaret Pittman tarafından X ve V faktörüne ihtiyaçlarına göre birbirinden ayırt edilene dek *H.haemolyticus* olduğu bildirilmiş daha sonra suşların çoğunlukla *H.paraaemolyticus* oldukları ortaya çıkmıştır. Bunların patojenliği sınırlıdır (56,95). Subakut bakteriyel endokarditli olgulardan elde edilen bu bakteri kanlı agarda beta hemoliz oluşturmakta ve V faktörüne gereksinim duymaktadır (56) .

5-*H.aphrophilus*

İnsanlarda dental plaklarda ve diş eti ceplerinde bulunmaktadır. Diğer oral bakteriler gibi bunlar da seyrek olarak iç organ abseleri ve endokardit yapabilmektedir(19,56).

6-*H.paraaphrophilus*

Ağız mikroplarının bir kısmını teşkil eden bu tür, insanda idrar yolu infeksiyonları, apandisit, subakut endokardit, beyin abseleri ve çene kemiği osteomyelitlerinden soyutlanmıştır (19,56). Kilian 1976 yılında *H.paraaphrophilus* türünü bildirmiştir(56) .

7- *H.segnis*

İnsan dental plaklarında bulunmakta, nadiren endokardit ve iç organ abseleri yapmaktadır (56) .

8- *H.ducreyi*

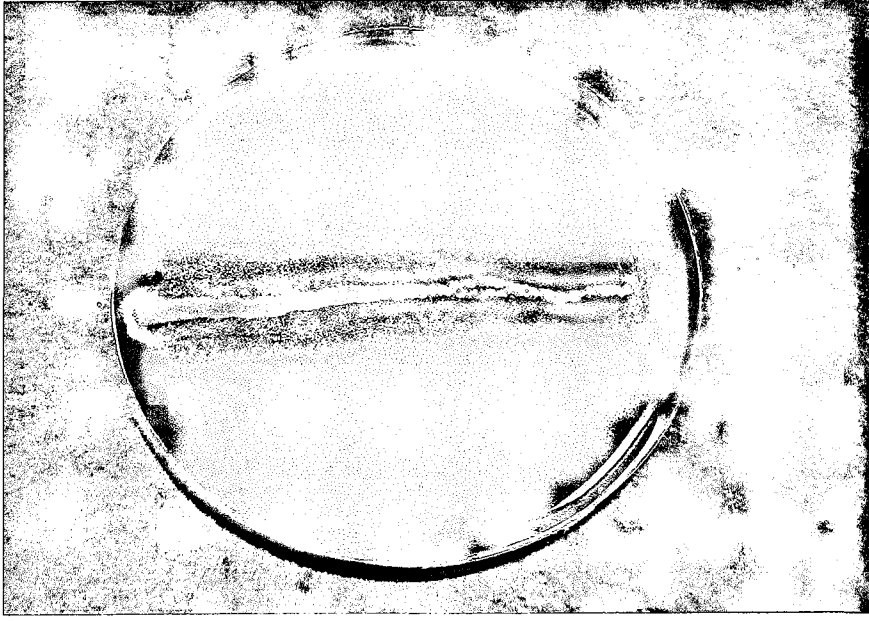
H.ducreyi şankroid etkenidir. Cinsel temas ile bulaşan bu bakteri 1889 senesinde ilk olarak A.ducreyi tarafından yumuşak şankr lezyonlarında bulunmuş, sonradan Besacan, Le Sound ve Grifon tarafından üretilmiştir. Şankroid lezyonlarından alınan, örneklerden hazırlanan Gram preparasyonlarında soluk pembe boyanmış balık sürüsü görünümündedir (31,56,97). Asya, Afrika'da, daha az olarak güney Amerika ve Avrupa'da görülmektedir. Afrika 'da şankroid başta gelen bulaşıcı hastalıklardan biridir ve inguinal lezyon ve lenfadenopati ile karakterize olup HIV infeksiyonuna

yakalanma riskini arttıran faktörlerden biridir (84). H.ducreyi zor üreyen bir bakteridir ve bilinen şankroid vakalarının %50-80'inde üremektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucu H.ducreyi'nin üretilmesinde 200 µgr/ml katalaz, %10 FBS (Fetal bovine serum) ve %1 X ilaveli GC agar besiyeri önerilmektedir (100). Hastalığı geçirenlerde bağışıklık oluşmaz. Tedavide kloramfenikol, tetrasiklin, sulfonamid, streptomisin ve aminoglikozidler etkilidir. H.ducreyi'nin bir çok suşu plazmidle kodlanan bir penisilinaz ürettiğinden tedavide penisilin kullanılmaz. Fimbriyalar, lipopolisakkarit, sitotoksinler ve dış membran proteinleri virulans faktörü olarak rol oynamaktadır (56,100).

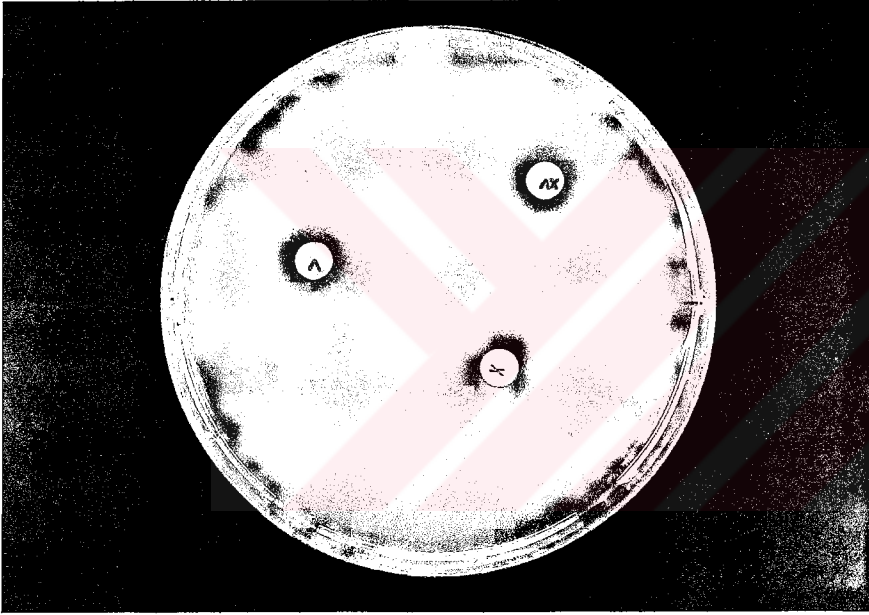
9-H.influenzae

İnfluenza basili olarak tarif edilen bu bakteri grip etkeni olan influenza virusunun bulunması ile influenza etkeni olmadığı ortaya çıkmıştır. H.influenzae küçük, yaklaşık 0.3-0.5 µm en ve 0.5-2 µm boyunda kokobasil görünümünde, uçları yuvarlak, ikişer ikişer ya da kısa zincirler halinde görülürler. Bakteriler hareketsiz, sporsuz olup bazı suşları kapsüllüdür. Kapsül otolitik enzimler tarafından kısa sürede yok olduğundan eski kültürlerde saptanamaz (19,97). Dolayısıyla pasajlarla kaybolur (20). Gram olumsuzdur, X ve V faktörlerinin her ikisine ihtiyaç duyar (Şekil 3).

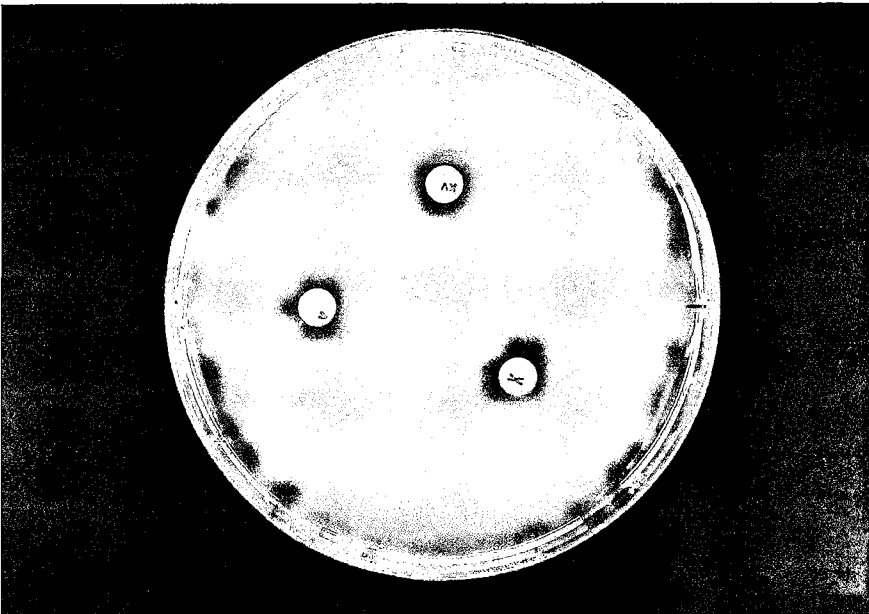
Bakteriler kanlı jelozda üremekle beraber taze besiyerinde üremeyebilir. X ve V faktörlerinin eritrositlerden jeloza yayılmalarını sağlamak amacıyla buzdolabında 2-3 gün bekletilen kanlı jelozda daha iyi üredikleri görülür. Anaerob ortamda X faktörüne gereksinimi yoktur (42). Çikolata jelozu bu bakterilerin üretilmesinde kullanılan uygun besiyeridir. Kolonileri küçük, saydam, şebnem tanesine benzer ve kenarları düzdür. İlk kültürleri kısmen mukoid (M) görünümünde olup ayrıca S ve R değişiklikleri de saptanmıştır. Glikozu gaz yapmadan parçalar, laktoz ve mannitole etki etmez ve hemoliz yapmaz Büyük çoğunluğu oksidaz ve katalaz pozitiftir. DNA 'daki G+C oranı %39 moldur (19). H.influenzae kapsül polisakkaritlerinin farkına göre a , b , c , d , e , f diye adlandırılan 6 serotipe (20,31,97), indol, üreaz ve ornitin dekarboksilaz özelliklerine göre de 8 biyotipe ayrılır



Şekil 1 : SÜT ANNE DENEYİ



Şekil 2 : XV, V DİSKLERİ
ETRAFINDA ÜREME



Şekil 3: XV DİSKİ ETRAFINDA
ÜREME

(Tablo 2)(56,59). b serotipi invaziv özelliktedir; menenjit, bakteriyemi gibi sistemik invaziv hastalıklardan bu serotip sorumludur (20,5673,110).

H.influenzae sağlıklı çocukların çoğunun nazofarinksinde bulunur ve normalde total bakteri florasının %2 sinden azını teşkil eder. Bu %2 lik oranın %5 den azını Hib teşkil etmektedir (102). Yaşın ilerlemesi ile floradaki sıklığı azalmaktadır (10). Hib primer bir patojen olduğu halde sağlıklı erişkinlerin ÜSY dan alınan örneklerden de izole edilebilir. Faringeal Hib kolonizasyon sıklığı hayatın ilk altı ayında %1 den az, diğer çocukluk çağlarında %3-5 civarındadır. Bazı toplumlarda bu oran daha da yüksek olabilir (56). Ülkemizde H.influenzae bakterisinin yaş ve nazofarinks kolonizasyonu ile ilişkisini bildiren pek çok çalışma yapılmıştır (7,8,69105,109). Hib gerek tek başına, gerekse diğer bakteriler ve viruslarla beraber çeşitli infeksiyonlara neden olabilir (19). Çeşitli olgulardan H.influenzae, S.pneumoniae ve M.catarrhalis ile birlikte izole edilmiştir (106). Solunum virusları örneğin influenzae A ve respiratory syncytial viruslarla oluşan viral infeksiyonlar Hib'in alınmasını ve kolonizasyonunu arttırabilir (102).

H.influenzae bakteriyel menenjitin başta gelen üç etkeninden biridir. Hib menenjiti 3 ay-3 yaş arasında en sıktır (89,40). Kapsülsüz suşlarla veya diğer serotiplere ait kapsüllü suşlarla oluşan menenjitlerin patogenezi Hib menenjitinden farklıdır. Bu vakalar sıklıkla sekonder olarak travma sonucu veya savunma mekanizmaları bozuk hastalarda meydana gelir (56). H.influenzae'nin kapsüllü ve kapsülsüz şekilleri solunum yollarında da infeksiyon yapabilmektedir. Kapsüllü şekillerden Hib, var olan fimbriyalar ile ÜSY hücrelerine yapışıp, hücreler arasındaki bağ dokusunu bozarak intrasellüler bir mekanizma ile yayılmakta ve infeksiyona neden olmaktadır. Fimbriya yokluğu Hib'in nazofarinks'de kolonizasyon yapma özelliğini ortadan kaldırmaktadır. Buna karşın invaziv hastalığı olan kişilerin kan ve BOS'undan izole edilen Hib'de fimbria yokluğu, nazofarinks kolonizasyonunda fimbriyaların rol oynadığını, bununla beraber varlığının bakteriyel menenjit infeksiyonuna yol açması

için gerekli olmadığını göstermektedir (102). Primer H.influenzae pnömonisi, çocuklardaki gibi fakat daha az oranda erişkinlerde de meydana gelebilir (56). H.influenzae'nin kapsülsüz şekilleri çocuklarda otitis media'ya, erişkinlerde ise daha sık pnömoni'ye neden olmaktadır (48,74,97,112).

Tablo 2. H.influenzae ve H.parainfluenzae biyotipleri (42,56)

Biyotipler	İndol	Üreaz	ODC	İnfeksiyonlar
H.influenzae Biyotip I	+	+	+	Sepsis-menenjit
Biyotip II	+	+	-	Göz-kulak-ASY
Biyotip III (H.aegyptius)	-	+	-	Göz(Avrupa)-solunum yolu
Biyotip IV	-	+	+	Kulak(nadir)-solunum yolu
Biyotip V	+	-	+	Kulak-ASY
Biyotip VI	-	-	+	ÜSY(nadir)
Biyotip VII	+	-	-	
Biyotip VIII	-	-	-	
H.aegyptius	-	+	-	
H.parainfluenzae				
Biyotip I	-	-	+	
Biyotip II	-	+	+	
Biyotip III	-	+	-	
Biyotip IV	+	+	+	
Biyotip VI	+	-	+	
Biyotip VII	+	+	-	
Biyotip VIII	+	-	-	

+ => 90 % pozitif

- => 90 % negatif

Tiplendirilemeyen *H.influenzae* normal erişkinlerin nazofarinksinden ve kronik bronşitli bazı hastaların trake ve ÜSY mukozalarından izole edilebilir. Dolayısıyla aspirasyon veya inhalasyon yolu ile alınan *H.influenzae* bakterisinin ASY infeksiyonlarında rol oynadığı düşünülmektedir. Doğanay ve ark. (3) *H.influenzae* bakterisinin ventilatörle ilişkili pnömoni (VİP) de %1.2 oranında rol aldığı bildirilmiştir.

KOAH, alkolizm, malnütrisyon, malinite ve diabetes mellitus gibi predispozan faktörlere sahip kişiler *H.influenzae* pnömonisine yatkındırlar (112). Özellikle KOAH akut atakta ve bronşektazisi olan hastalarda etken olarak karşımıza çıkmaktadır (2).

H.influenzae, kistik fibrozlu hastaların kronik ve akut ataklarından izole edilebilir. Şener ve ark. (98)'nin kistik fibrozlu hastalarla ilgili yaptıkları çalışmada, *H.influenzae* bakterisinin izolasyon oranının %8.8 olduğunu bildirmişlerdir. Kistik fibrozlu hastalar genellikle ampririk antibiyotik tedavisi gördüklerinden bakteri izolasyonu güçlükle yapılmaktadır. Beta-laktam antibiyotiklerle tedavi gören kistik fibrozlu hastalarda sferoblastik *H.influenzae* oluştuğundan besiyerinde üreme olmaz. Bu nedenle N-acetyl-D-glucosamine içeren besiyerleri kullanılmalıdır (72). Ayrıca epiglottis iltihabı hemen daima Hib ile meydana gelir. Genellikle iki yaşındaki çocuklarda görülür. Ani başlar. Nefes darlığı, hiperventilasyon, ateş meydana gelir. Bazı vakalarda larinks ödemi gelişebilir ve acil trakeostomi gerektirir (34). Septik artrit özellikle 2-4 yaş arasındaki çocuklarda görülür ve genellikle bu vakalarda *H.influenzae* bakterisinin etken olduğu belirlenmiştir. Ayrıca bu bakterinin juvenil romatoid artrit eklemlerde sekonder infeksiyon etkeni olduğu bilinmektedir (34).

Hib solunum yolu ile yayılarak özellikle küçük çocuklarda nazofarenjit, otitis media gibi infeksiyonlara yol açabilir. Buralardan uygun koşullarda kana geçerek menenjit ve bakteriyemiye yol açar. Nadiren eklemlere yerleşir (19). Kapsülsüz *H.influenzae* genellikle çocuklarda otitis

media'ya neden olur. Bu vakalarda etken olan biyotipin nazofarinksde anlamlı derecede çoğalması ile ilgisi vardır (56). Hib ayrıca primer peritonit, prostatit, kolesistit, perikardit, üriner sistem infeksiyonu, sellülit, apandisit, kronik pürülan rinit ve sinüzit etkeni olabilmektedir (34,70,97,99).

TANI VE TADAVİ

BOS örneğinden hazırlanan Gram boyasında Gram negatif çomakların görülmesi ve bu çomakların jeloz besiyerinde ürememesi Hemofil bakteri lehinedir. Hib menenjitinden kuşkulandığında BOS'da bakteri görülmüyorsa veya inceleme gecikecekse ve altta yatan bir hastalık yoksa hastanın yaşı göz önüne alınarak ampirik antibiyotik tedavisine bir an önce başlamak gerekmektedir (30). Genellikle antibiyotiklerin çoğuna yüksek düzeyde duyarlı bulunan H.influenzae'nin etken olduğu Hib menenjitinde; birinci kuşak sefalosporinler BOS'a geçmemeleri nedeniyle tedavide kullanılmamaktadırlar. Üçüncü kuşak sefalosporinler, ampisilin ve kloramfenikol uygun olan seçeneklerdir (36,92).

1965'den önceki yıllarda Hib menenjitinin tedavisinde sulfonamid+penisilin kombinasyonu kullanılırdı. 1965'de ampisilin tek seçenektir. 1974'de beta-laktamaz üreten Hib suşları izole edilene dek 1970'li yılların ortasına kadar H.influenzae bakterisinin ampisiline duyarlı olduğu düşünülmekteydi (55,89,95,112). Bu nedenle kloramfenikol tedaviye eklenmiş ve 1980'li yılların ortasına kadar ampisilin + kloramfenikol kombinasyonu standard tedavi olarak kullanılmıştır. 1983'de hem ampisilin hem kloramfenikole dirençli Hib suşlarının saptanması ile sefalosporinler tedaviye girmiştir (30,89).

H.influenzae bakterisindeki ampisilin direnci plazmide bağlı TEM-1 ve daha az oranda ROB-1 beta-laktamazları ile veya beta-laktamaz oluşturmadan kromozoma bağlı penisilin bağlayan

proteinlerdeki (PBP) mutasyon sonucu oluşmaktadır. Nadiren bazı suşlar ampisilin direncinin her iki tipini de birlikte bulundurabilir (33,35,56,66,93). Kloramfenikol direnci ise çoğunlukla kloromfenikol asetil transferaz (CAT) üretimine bağlıdır. Daha düşük oranda, bakterinin dış zar proteinlerindeki değişikliğe bağlı olarak, hücre geçirgenliğinin azalması sonucu antibiyotik emiliminin düşük düzeyde olmasına bağlıdır (23,62). Sefalosporinlere direnç düşük düzeydedir ve kromozomal olup penisilin bağlayan proteinlerde mutasyon sonucu gelişir (23,40,67). Üçüncü kuşak sefalosporinlerden sefotaksim ve seftriakson kullanılabilir. Tedavi süresi yedi gündür. Bununla birlikte süre hastaya göre ayarlanmalıdır. Bazen daha uzun tedavi gerekebilir (30,36,85,89,92,95).

Pnömonilerin tanısında fizik bulgu, radyolojik görüntü ve laboratuvar analizi yol göstermektedir. Laboratuvar analizi için kullanılan örnek balgamdır. Fakat balgamdan yalnız *H.influenzae*'nin elde edilmesi bu bakterinin tek başına enfeksiyona neden olduğunun kesin bulgusu değildir. Çünkü genelde sağlıklı kişilerin önemli bir bölümü ve KOAH'na sahip kişilerin çoğu bu mikroorganizmaları taşıyabilir. Bununla beraber uygun bir şekilde alınmış balgamın incelenmesi, tanının güvenilirlik derecesini artırır. Mikrobiyolojik inceleme için küçük büyütme mikroskop alanında 10'dan az yassı epitel hücresi ve 25'den fazla nötrofil içeren solunum yolu sekresyon örnekleri kullanılmalıdır (12). Gram negatif kokobasiller görüldüğünde büyük olasılıkla *H.influenzae* düşünülür (112). Bu bakterinin kısa süre içinde belirlenmesi güç olduğundan pnömonilerde de hemen ampirik tedaviye başlanmalıdır (112). Beta-laktamaz pozitifliği ampisilin ve amoksisilin direncinin varlığı açısından anlamlıdır (66). Beta-laktamaz üreten suşların izolasyonu yaş, mevsim, muayene maddesi, genetik ve coğrafi faktörlere bağlı olarak değişmektedir (33,81,95,112).

Tiplendirilemeyen *H.influenzae* suşlarının erişkindeki sıklığı artmaktadır. Buna karşın erişkindeki direnç insidansı çocuklara nazaran daha az olup %2-4 arasındadır (22).

H.influenzae'dan başka H.parainfluenzae da fazla miktarda beta laktamaz oluşturmaktadır. Beta-laktamaz üreten H.parainfluenzae'lar 3-4 yaşındaki çocuklarda oldukça sık (%88) görülmesine karşın büyük yaşta çocuklarda ve erişkinlerde daha seyrek (%33) bulunmaktadır (91).

PROFİLAKSİ

1980 yılında, Hib kapsül polisakkaritini (poliribozil-ribitol-fosfat=PRP) içeren aşı hazırlanmıştır. İlk kez Nisan 1985 yılında iki yaş ve üstü çocuklarda uygulanmış olup, aynı yıl Amerika Birleşik Devletleri'nde kullanıma girmiştir. Aşılama sonrası menenjit, bakteriyemi veya pnömoni gelişen vakaların çokluğundan, aşının antikor yanıtı zayıf olan küçük çocukları korumaya yeterli olmadığı sonucuna varılmıştır . 1987 yılında konjugat aşılar yapılmıştır ve bu aşılar erken çocukluk döneminde, birden fazla aşı dozu yapıldığında kuvvetli antikor yanıtı sağlamıştır. Hib aşıları, çocuklarda yaygın olan Hib taşıyıcılığını azaltarak Hib menenjitinden korumada önemli rol oynamaktadır. Otitis media, sinüzit, konjunktivit, kronik bronşit, pnömoni ve diğer solunum yolu infeksiyonlarının çoğunda kapsülsüz H.influenzae ve tip b dışındaki kapsüllü tipler önemli rol oynadığından bu aşılar etkili olamamaktadır (73,74,78,104). Aşının sakıncası pahalı olması ve 7 aydan küçük bebeklerde nadir de olsa infeksiyona yol açmasıdır (47,82,104).

GEREÇ VE YÖNTEM

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD'dan gönderilen göz, kulak, burun, boğaz sürüntüsü, balgam, cerahat, trakeal sekresyon ve BOS olmak üzere toplam 361 örnek rutin incelemenin yanında Haemophilus cinsi bakteriler yönünden de incelenmiştir.

BESİYERLERİ , TANI DİSKLERİ , ANTİSERUMLAR, ANTİBİYOTİKLER

1-Basitrasin, Vankomisin, Klindamisin'li Çikolata Agar (BVCCÇA) (10,27,96)

Beyin kalp infüzyon agar (BHİA)(Difco)-----	50	gr
Poliviteks (Liyofilize Biomerieux)-----	10	ml
Vankomisin-----	5	µgr/ml
Klindamisin-----	1	µgr/ml
Distile su-----	1000	ml
At kanı-----	50	ml

BHİ agar distile suda eritilip pH 7.2-7.4'e ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C de 15 dakika bırakılarak otoklavda steril edilmiştir. 85 °C'ye soğutulup içine %5 oranında defibrine at kanı ilave edilerek bu sıcaklıkta 15 dakika bekletilmiştir. Besiyeri soğutulup 50°C'ye geldikten sonra içine poliviteks ve distile suda çözüldürülmüş listede belirtilmiş miktardaki antibiyotikler ilave edilmiştir. Bu maddelerin çalkalayarak homojen dağılımı sağlandıktan sonra petri kutularına 15-20 ml miktarlarda dökülmüştür.

2 -Basitrasin'li ikolata Agar (BA) (27)

BHIA(Difco)-----	50	gr
Basitrasin-----	300	ugr/ml
At kanı-----	50	ml
Distile su-----	1000	ml

BHIA distile suda eritilip pH 7.2-7.4'e ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C de 15 dakika steril edilmiştir, 80°C ye soğuduğunda %5 defibrine at kanı ilave edilerek bu sıcaklıkta 15 dakika bekletilmiştir. 50°C'ye soğutulduktan sonra distile suda çözüldürülmüş basitrasin ilave edilmiş ve çalkalanarak maddelerin homojen dağılımı sağlandıktan sonra petri kutularına dağıtılmıştır.

3 -Koyun Kanlı Agar (KKA)

Triptik Soy Agar (Biolife)-----	40	gr
Distile su-----	1000	ml
Koyun Kanı-----	50	ml

Triptik soy agar, distile suda çözüldükten sonra pH 7.2-7.4'e ayarlanmış ve otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilmiştir. 50°C'ye soğutulduktan sonra %5 defibrine koyun kanı ilave edilmiştir. Kanın homjen dağılımı sağlandıktan sonra besiyeri petri kutularına dökülmüştür.

Kliniklerden gönderilen her örnek yukarıda bildirilen besiyerlerine azaltma yöntemi ile ekilerek incelenmiştir

4 -Müller Hinton Buyyonu (MHB)

MHB (Biolife) -----	36	gr
Poliviteks -----	10	ml
Distile su -----	1000	ml

MHB distile suda eritilip, pH 7.2-7.4'e ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C de 15 dakika steril edilmiştir. 50°C ye soğutulduktan sonra poliviteks eklenerek steril tüplere 2 ml miktarlarda

dağıtılmıştır. Bir gece 37°C de bekletilerek sterilite kontrolü yapılmıştır. Bu besiyeri antibiyotik duyarlık deneyinde bakterinin saf kültürünü sağlamak için kullanılmıştır

5 -Müller Hinton Agar (MHA)

Müller Hinton Agar (Biolife)-----36 gr
Distile su-----1000 ml

MHA distile suda çözündükten sonra pH 7.2-7.4'e ayarlanmış ve otoklavda 121°C de 15 dakika steril edilmiştir. 50 °C'ye soğutulduktan sonra petri kutularına dağıtılmıştır. Bu besiyeri üreyen bakterilerin hemofil olup olmadığını kontrol amacı ile kullanılmıştır.

6 -At Kanlı Agar (AKA)

Brain Heart Infusion Agar (Difco)-----50 gr
Distile su-----1000 ml
At kanı-----50 ml

BHİ agar distile suda çözünüp pH 7.2-7.4'e ayarlandıktan sonra otoklavda 121°C de 15 dakika steril edilmiştir. 50 °C'ye soğutulup at kanı ilave edilerek homojen dağılımı sağlanarak petri kutularına dağıtılmıştır. Bu besiyeri bakterilerin hemolizini saptamak amacı ile kullanılmıştır.

7 -At kanlı Çikolata Agar (AKÇA)

MHA-----36 gr
Distile su-----1000 ml
At kanı-----50 ml

MHA distile suda eritilerek 121°C de 15 dakika steril edilmiş ve 80°C iken %5 defibrine at kanı ilave edilmiştir. 15 dakika bu sıcaklıkta tutularak çikolata rengine geldikten sonra petri kutularına 15-20 ml dağıtılmıştır. Sterilizasyon kontrolü yapıldıktan sonra +4°C de duyarlık deneyi için muhafaza edilmiştir.

8 -Ferguson besiyeri (31)

KH ₂ PO ₄ -----	0.1	gr
K ₂ HPO ₄ -----	0.1	gr
NaCl-----	0.5	gr
L-Triptofan-----	0.3	gr
Üre-----	2	gr
Etilalkol(%95)-----	1	ml
Fenol kırmızısı(0.2 çözeltisi)-----	0.5	ml
Distile su-----	100	ml

KH₂PO₄, KHPO₄ ve NaCl distile suda çözüldürülüp 100°C de bir saat kaynatıldıktan sonra çözeltiye triptofan katılarak eritilmiştir. pH 6.9'a ayarlanarak fenol kırmızısı ilave edilip 100°C de 30 dakika steril edilmiştir. Aseptik şartlarda alkol ve seitz filtresinden süzölmüş %20'lik üre çözeltisinden konarak tüplere 1 ml miktarlarda dağıtılmıştır.

Bu besiyerine bakterinin saf kültüründen yoğun bir şekilde ekim yapılmış ve 37°C de inkübasyonu sağlanmışır. Üç, altı ve 24 saat sonra besiyerindeki renk değişimi incelenmiştir. Rengin açık sarıdan pembeye dönüşmesi pozitif kabul edilmiştir. İndol oluşumu kovaks ayracı ile saptanmıştır. Kültür üzerine 0.5 ml konduktan sonra çalkalanarak oluşan kırmızı halka, indol pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Kovaks çözeltisi

Para-dimetil-aminobenzaldehit-----	5	gr
Butil alkol-----	75	ml
HCL(%37)-----	25	ml

Para-dimetil-amino benzaldehit alkolde eridikten sonra üzerine HCL ilave edilmiştir.

9 -Ornitin Dekarboksilaz besiyeri (ODC) (31,42)

Pepton -----	5	gr
Et özeti-----	5	gr
Bromkrezol moru-----	0.01	gr
Krezol kırmızısı-----	0.005	gr
Piridoksal-----	0.005	gr
Glukoz-----	0.5	gr
Distile su-----	1000	ml

Maddeler distile suda çözüldürüldükten sonra pH 6 ya ayarlanmıştır. Besiyeri iki kısma bölünmüş, birinci kısım kontrol besiyeri olduğundan içerisine herhangi bir madde ilave edilmeden tüplere 2 ml olarak dağıtılmıştır. İkinci besiyerine 10gr/1000 ml L-ornitin dihidroklorid (20 gr/1000 bDL formu) ilave edilerek pH 6 ya ayarlanmıştır. Tüplere 2 ml dağıtıldıktan sonra 120°C de 15 dakika steril edilmiştir .

İzole edilen bakterilerin saf kültürlerinden kontrol ve test tüpüne yoğun bir şekilde ekim yapılmış ve üzerleri 2 ml yüksekliğinde parafin ile kapatılarak 35-37 °C de inkübe edilmiştir. 8-24 saati takiben, besiyerinde önce glikozdan asit husule geleceğinden sarı renk, eğer dekarboksilasyon husule geliyorsa, besiyeri alkali olacağından mor renk oluşacak, kontrol tüp ise sarı renkte kalacaktır. İndol, Üreaz ve ODC besiyerlerine ekilerek H.influenzae ve parainfluenzae biyotipleri belirlenmiştir.

10 -Ksiloz besiyeri (31)

Peptonlu suya %0.5 oranında ksiloz ilave edilerek hazırlanmıştır.

Pepton-----1 gr
NaCL-----0.5 gr
Distile-----100 ml

Maddeler sıcak suda eritilip süzgeç kağıdından süzildükten sonra indikatör olarak %1 fenol kırmızısı ve 0.5 gr ksiloz ilave edilmiştir. pH 7.4'e ayarlanarak otoklavda 121°'de 15 dakika steril edilmiştir .

Fenol kırmızısı-----0.2 gr
Alkol-----50 ml
Distile su----- 50 ml

Fenol kırmızısı alkolde eritildikten sonra distile su ilave edilmiş ve besiyerine %1 oranında katılmıştır.

Bu besiyeri H.influenzae ve H.aegyptus'un ayrımı için kullanılmıştır. Bakteriler bu besiyerine yoğun bir şekilde ekilmiştir. H.influenzae ksilozu fermente edip asit husule getirerek besiyerinin rengini sarıya dönüştürür, H.aegyptus bu özelliğe sahip değildir.

11 -X , V , X V diskleri (Oxoid)

X faktör-----DD3
V faktör-----DD4
X+V faktör-----DD5

Ayrıca pak mayadan V faktörü , hematinden X faktörü hazırlanarak kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar Oxoid disklerinin sonuçları ile paralellik göstermiştir.

X faktörü (75): Bovine hematin (Sigma H-33505) 50 mg tartılmış ve 0.01 N NaOH'da çözüldürülüp pH 7.2-7.4'e ayarlandıktan sonra 121°C de steril edilmiştir .

V faktörü (31): 100 gr pakmaya , 100 cc steril distile suda 500 cc lik balon içinde çözüldürülerek 70-80°C de 20 dakika ısıtılmıştır . pH 6.6-6.8'e ayarlanmış soğuduktan sonra süzgeç kağıdından ve daha sonra seitz filtresinden süzümüştür .

X faktörü, V faktörü ve bunların eşit karışımından hazırlanmış solüsyon, süzgeç kağıdından yapılmış ve steril edilmiş 6 mm çapındaki disklerle emdirilerek kullanılmıştır. Besiyerlerinin ve disklerin kontrolunda Hib ATCC 9327(NTCC 08466), S aureus ATCC 5923 suşları kullanılmıştır.

Örneklerin incelenmesi

Haemophilus cinsinin izolasyon ve identifikasyonu amacıyla boğaz, burun, göz ve kulak sürüntüleri BVCCÇA, BÇA ve KKA olmak üzere üç besiyerine azaltma yöntemiyle ekilmiştir. Ayrıca KKA'nın birinci ve ikinci bölgelerine S.aureus suşu çizilmiştir. BOS örnekleri 3000 devirde 15 dakika santrifuj edildikten sonra BVCCÇA ve polyvitex ilaveli MHB'na ekilmiştir. Besiyerleri 24 - 48 saat 37°C'de , %5-7 CO2'li ve ıslak pamuk ile sağlanmış nemli ortamda inkübe edilmiştir. BOS örneklerinin ekildiği ve üremenin tespit edilemediği sıvı besiyerleri yedi gün bekletilerek kontrol edilmiştir.

Ekimlerden 24 saat sonra besiyerleri kontrol edilmiş ve üreme görülmeyen kültürler bir gece daha aynı şartlarda bekletilmiştir. Üreme olan katı besiyerindeki şeffaf, minik, ayrıca yaygın göbekli ve mat kolonilerden preparat hazırlanarak Gram yöntemi ile boyanmıştır. Mikroskopik görünümü Gram negatif ince çomak, kokobasil veya uzun filamanlar şeklinde olan kolonilerden AKÇA , AKA ve MHA'a saf kültür alınıp 24 saat 37°C de %5 CO2'li ve nemli ortamda bekletilmiştir.

MHA'da üremeyen, AKA'da zayıf ve AKÇ besiyerinde iyi üreme gösteren kolonilerin Gram negatif çomak oldukları tekrar belirlendikten sonra Hemofil cinsi olarak incelemeye alınmıştır. Türlerin belirlenmesi için Haemophilus cinsi olduğu kabul edilen bakterilerin X, V, XV'ye ihtiyacı ve hemolizin özelliği incelenmiştir. Hemolizin özelliği AKA'da β hemoliz yapanlar hemolitik hemofil bakteri olarak incelenmeye alınmıştır .

Türlerin belirlenmesi amacı ile Petri kutusundaki MHA üzerine MHB'da süspanse edilmiş bakterilerden yayılarak üzerine birbirinden 2.5-3 cm mesafede olacak şekilde X, V, XV diskleri yerleştirilmiş 37°C'de, %5 CO₂'li ve nemli ortamda bekletilmiştir. 24 saat sonra diskler etrafında görülen üreme zonları kaydedilmiştir.

V, XV diskleri etrafındaki üreme V faktörüne (Şekil 2), X, XV etrafındaki üreme X faktörüne, yalnız XV diski etrafındaki üreme X ve V faktörünün herikisine olan ihtiyacı göstermektedir (Şekil 3) XV faktörünün herikisine birden ihtiyaç gösteren bakteriler H.influenzae, H.haemolyticus veya H.aegyptius olabilir. H.haemolyticus at kanlı jelozda hemoliz yapması ile, H.influenzae ve H.aegyptius'tan ayırt edilir.

İnfluenzae antiserumları

H.influenzae suşunun serotiplerinin saptanması kapsül polisakkaritlerine göre hazırlanmış antiserumlarla lam aglutinasyon yöntemi ile yapılmıştır (29,64,94). Önce Denka seiken antiserum ile her suş ayrı ayrı denenmiş, Hib olarak saptananlar tekrar Difco (1x1) Hib serumu ile kontrol edilmiştir.

Denka seiken antiserum-----2x6 ml (a,b,c,d,e,f)

Temiz bir lamın bir tarafına antiserum diğer tarafına kontrol olarak %0.9'luk tuzlu su konarak bakteri herikisi ile muamele edilmiş ve bir dakika süre ile rotasyon hareketi yapılmıştır. %0,9'luk tuzlu sudaki aglutinasyonun negatif olması durumunda, antiserumdaki aglutinasyon varlığı pozitif olarak değerlendirilmiştir. Tuzlu su ve antiserumun her ikisinde birden aglutinasyon görüldüğünde deney tekrarlanmış, aynı sonuç alındığında suş tiplendirilemeyen olarak kabul edilmiştir. Bazı suşlar birden fazla antiserum ile aglutinasyon vermiş dolayısıyla serotiplendirilememiştir.

Cefinaz diski(BBL)

Beta-laktamaz araştırmasında kromojenik sefolosporin yöntemi Cefinaz (BBL) diski kullanılmıştır . Bu yöntemin temeli nitrosefin içeren disklerin açık sarı olan renginin beta-laktamaz varlığında pembeye dönüşmesine dayanmaktadır (26,71). Cefinaz (BBL) diskinin serum fizyolojik ile nemliliği sağlandıktan sonra üzerine tahta bir çubuk ile 24 saatlik saf kültürden sürülmüştür. Bir süre sonra diskin sarı renginin pembeye dönüşmesi beta-laktamaz pozitif olarak değerlendirilmiştir. Disklerin kontrolunda Hib ATCC 9327(NTCC 08466), S aureus ATCC 5923 suşları kullanılmıştır.

Antibiyotikler

Duyarlılık deneyi Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapılmıştır (76,77). Denenen antimikrobiyal maddeler eritromisin, penisilin G, ampisilin, ampisilin/ sulbaktam, amoksisilin/klavulanik asit, azidosilin, mezlosilin, sefalotin, sefuroksim, seftriakson, sefoperazon, sefotaksim, seftazidim, aztreonam, gentamisin, tobramisin, amikasin, netilmisin, kloramfenikol, tetrasiklin, ofloksasin, siprofloksasin dir.

24 saatlik kültürlerin MHB'da süspansiyonu yapılarak bulanıklığı 0.5 Mc Farland tüpüne göre ayarlanmış ve AKÇA besiyerine yayılmıştır. Nemin absorbe edilebilmesi için 3-5 dakika bekletildikten

sonra antibiyotik diskleri birbirinden 2.5 cm uzaklıkta ve petri kenarından 1.5 cm içerde olacak şekilde yerleştirilmiştir. Besiyerleri %5 CO₂'li ve nemli ortamda 37°C de 24 saat bekletildikten sonra inhibisyon zonları kaydedilmiştir .



BULGULAR

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD'nin çeşitli bölümlerinden gelen 248 boğaz, 53 burun sürüntü, 33 balgam, 12 BOS, altı cerahat, beş dializ sıvısı, iki trakeal aspirat ve iki göz sürüntü örneği olmak üzere toplam 361 muayene maddesi incelenmiştir. 361 kültürden toplam 98 (%27.1) Haemophilus cinsi bakteri izole edilmiş ve bu bakterilerden 37'sinin (%37.7) H.influenzae, 45'inin (%46) H.parainfluenzae, yedisi (%7.1) H.haemolyticus, altısı (%6.1) H.paraahaemolyticus olduğu saptanmış, üçü (%3.1) süşun türü belirlenememiştir (Tablo 3, Grafik 1).

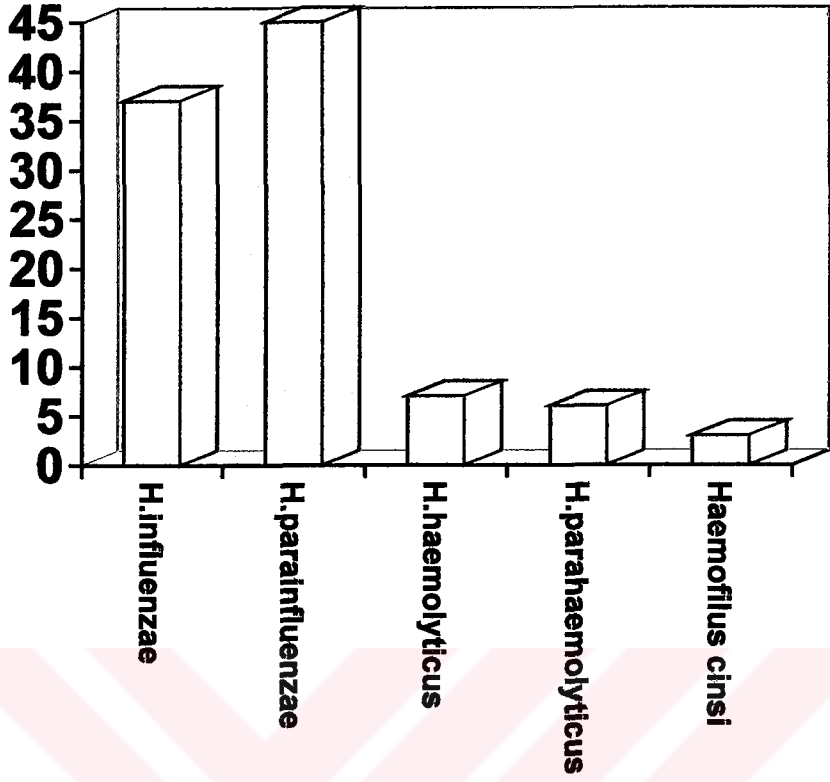
248 boğaz sürüntünün 83'ünde, 53 burun sürüntünün üçünde, 33 balgamın 10'unda, 12 BOS'un birinde Haemophilus cinsi bakteri üremiştir. 248 boğaz sürüntüden izole edilen Haemophilus cinsi bakterilerin 29'u (%11.7) H.influenzae, 40'ı (%16.1) H.parainfluenzae, XV ye gereksinimi olan ve at kanında hemoliz yapan altısı (%2.4) H.haemolyticus, beşi (%2) H.paraahaemolyticus olarak saptanmıştır. Bakterilerden XV ye gereksinin duyan, AKA besiyerinde hemoliz oluşturmeyen, ksilozu etkilemeyen üçünün (%1.2) türü belirlenememiştir.

53 burun sürüntüsünden izole edilen Haemophilus cinsi bakterilerin biri (%1.9) H.influenzae, ikisi (%3.8) H.parainfluenzae olarak belirlenmiştir. 33 balgamdan izole edilen Haemophilus cinsi bakterilerden altısı (%18.2) H.influenzae, üçü (%9) H.parainfluenzae ve biri (%3) H.paraahaemolyticus olarak saptanmıştır. 12 BOS örneğinin birinden H.influenzae, iki göz sürüntüsünün birinden H.haemolyticus izole edilmiştir. Cerahat, dializ sıvısı ve trakeal aspirasyon örneklerinden Haemophilus cinsi bakteri izole edilmemiştir (Tablo 3,Grafik 1).

Tablo 3. Haemophilus cisi bakteri türlerinin elde edildikleri örneklerle göre dağılımı (%)

Örnek	n	H.influenzae	H.parainfluenzae	H.haemolyticus	H.paraahaemolyticus	Haemophilus cinsi
Şaz sürüntüsü	248	29(%11,7)	40(%16,1)	6(%2,4)	5(%2)	3(%1,2)
Burun sürüntüsü	53	1(%1,9)	2(%3,8)	0	0	0
Balgam	33	6(%18,2)	3(%9)	0	1(%3)	0
BOS	12	1(%8,3)	0	0	0	0
Cerahat	6	0	0	0	0	0
Dializ sıvısı	5	0	0	0	0	0
Göz sürüntüsü	2	0	0	1(%50)	0	0
Trakeal aspirat	2	0	0	0	0	0
Toplam	361	37(%10,2)	45(%12,5)	7(%1,9)	6(%1,7)	3(%0,8)

n: örnek sayısı



Grafik 1. Haemophilus türlerinin dağılımı

Haemophilus influenzae serotiplerinin örneklere dağılımı

37 H.influenzae suşunun ikisi (%5,4) serotip a, onyedisi (%46) serotip b, beşi (%13,5) serotip d ve yedisi (%18,9) serotip e olarak saptanmış olup c ve f serotiplerine ait bir suş elde edilmemiş, altı (%16,2) suş ise tiplendirilememiştir. Altı suşun ikisi c ve d antiserumu ile aglutinasyon vermiş, dördü ise hiçbir antiserum ile aglutinasyon vermemiş ve dolayısıyla tiplendirilememiştir (Tablo 4).

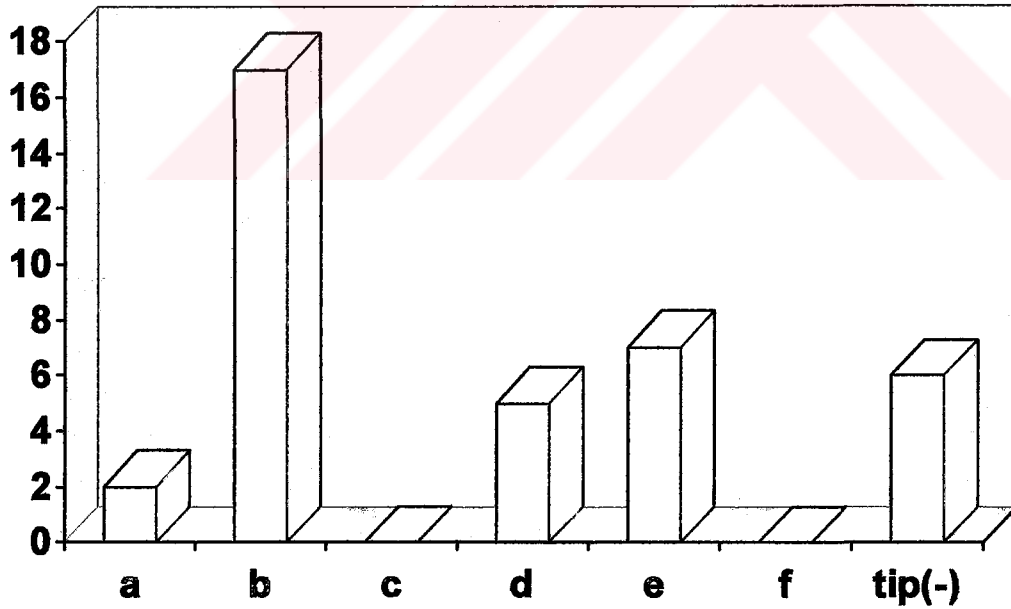
Boğaz sürüntüsünden izole edilen 29 H.influenzae'nın ikisi (%16,9) serotip a, onbeşi (%51,7) serotip b, üçü (%10,4) serotip d, beşi (%17,2) serotip e olarak belirlenmiş, dördü (%13,8) tiplendirilememiştir. Balgam örneğinden izole edilen altı H.influenzae'nin biri (%16,6) serotip b, biri (%16,6) serotip d, ikisi (%33,3) serotip e olarak belirlenmiş, ikisi (%33,3) tiplendirilememiştir.

Burun sürüntüsünden izole edilen bir H.influenzae suşu serotip d, BOS'dan izole edilen bir suş ise serotip b olarak belirlenmiştir (Tablo 4, Grafik 2).

Tablo 4. H.influenzae serotiplerinin örneklerle göre dağılımı

Örnek	n	a	b	c	d	e	f	Tiplendirilemeyen
Boğaz sürüntüsü	29	2	15	0	3	5	0	4
Balgam	6	0	1	0	1	2	0	2
Burun sürüntüsü	1	0	0	0	1	0	0	0
BOS	1	0	1	0	0	0	0	0
Toplam	37	2	17	0	5	7	0	6

(n): Suş sayısı



Grafik 2. H.influenzae serotiplerinin dağılımı

H.influenzae ve H.parainfluenzae suşlarının indol, üreaz ve ornitin dekarboksilaz özelliklerine göre biyotipleri belirlenmiştir .

H.influenzae biyotipleri

37 H.influenzae suşunun sekizinde (%21,6) indol, üreaz ve ODC aktivitesi pozitif bulunduğundan biyotip I, yedisinde (%18,9) indol ve üreaz pozitif, ODC aktivitesi negatif bulunduğundan biyotip II, beşinde (%13,5) üreaz pozitif, indol ve ODC aktivitesi negatif olduğundan biyotip III, yedisinde (%18,9) üreaz ve ODC aktivitesi pozitif, indol negatif olduğundan biyotip IV, üçünde (%8,2) indol ve ODC aktivitesi pozitif, üreaz negatif bulunduğundan biyotip V, yedisinde (%18,9) indol pozitif, üreaz ve ODC aktivitesi negatif olduğundan biyotip VI olarak saptanmıştır. Biyotip VII ve VIII saptanmamıştır (Tablo 5, Grafik 3).

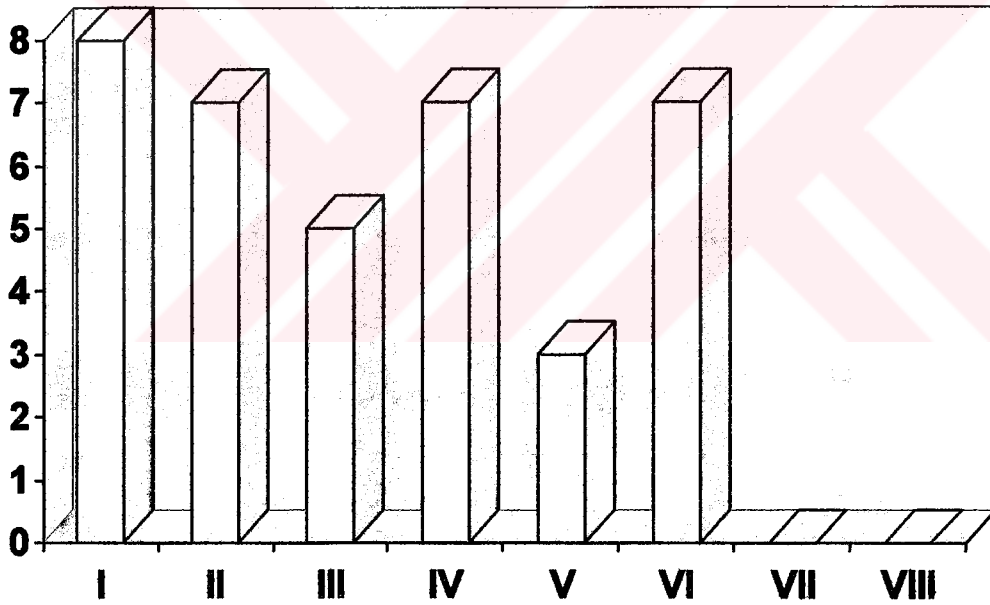
Haemophilus influenzae biyotiplerinin örneklere dağılımı

Boğaz sürüntüsünden izole edilen 29 H.influenzae'nin yedisi (%24,1) biyotip I, ikisi (%6,9) biyotip II, beşi (%17,2) biyotip III, altısı (%20,7) biyotip IV, üçü (%10,4) biyotip V, altısı (%20,7) biyotip VI olarak belirlenmiş, biyotip VII ve VIII saptanmamıştır. Balgam örneklerinden izole edilen 6 H.influenzae'nin beşi (%83,3) biyotip II, biri (%16,7) biyotip VI olarak bulunmuştur. Burun sürüntüsünden izole edilen bir suş biyotip IV, BOS'dan izole edilen bir suş biyotip I olarak tespit edilmiştir(Tablo 5,Grafik3).

Tablo 5. H.influenzae biyotiplerin örneklerle göre dağılımı

Örnek / Biotip	n	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Boğaz sürüntüsü	29	7	2	5	6	3	6	0	0
Balgam	6	0	5	0	0	0	1	0	0
Burun sürüntüsü	1	0	0	0	1	0	0	0	0
BOS	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Toplam	37	8	7	5	7	3	7	0	0

(n) : suş sayısı



Grafik 3. H.influenzae biyotiplerinin dağılımı

H.influenzae serotip ve biyotiplerinin karşılaştırılması

İki serotip a suşunun biri biyotip IV diğeri biotip V, 17 serotip b suşunun beşi biyotip I, ikisi biyotip II, üçü biyotip III, ikisi biyotip IV, biri biyotip V ve dördü biyotip VI, beş serotip d suşunun

biri biyotip I, biri biyotip II, ikisi biyotip IV ve biri biyotip VI, yedi serotip e suşunun biri biyotip I, biri biyotip II, biri biyotip III, biri biyotip IV, biri biyotip V ve biri ise biyotip VI olarak belirlenmiştir. Tipi belirlenmeyen altı suştan biri biyotip I, üçü biyotip II, biri biyotip III ve biri biyotip VI olarak saptanmıştır (Tablo 6).

Tablo 6. H.influenzae serotip ve biyotiplerinin karşılaştırılması

Serotip / Biyotip	n	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
a	2	0	0	0	1	1	0	0	0
b	17	5	2	3	2	1	4	0	0
c	0	0	0	0	0	0	0	0	0
d	5	1	1	0	2	0	1	0	0
e	7	1	1	1	2	1	1	0	0
f	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tiplendirilemeyen	6	1	3	1	0	0	1	0	0

(n): Suş sayısı

H.parainfluenzae biyotipleri

45 H.parainfluenzae suşunun dördü (%8.9) indol, üreaz ve ODC aktiviteleri pozitif olduğundan biyotip I, 14'ü (%31.1) indol, üreaz aktivitesi pozitif ve ODC aktivitesi negatif olduğundan biyotip II, altısı (%13.3) üreaz aktivitesi pozitif indol ve ODC aktivitesi negatif olduğundan biyotip III, 12'si (%26.6) üreaz ve ODC aktivitesi pozitif, indol aktivitesi negatif olduğundan biyotip IV, dördü (%8.9) indol ve ODC aktivitesi pozitif, üreaz aktivitesi negatif olduğundan biyotip V, beşi (%11.2) indol aktivitesi pozitif, üreaz ve ODC aktivitesi negatif olduğundan biyotip VI olarak belirlenmiş, biyotip VII ve VIII saptanmamıştır (Tablo 7, Grafik 4).

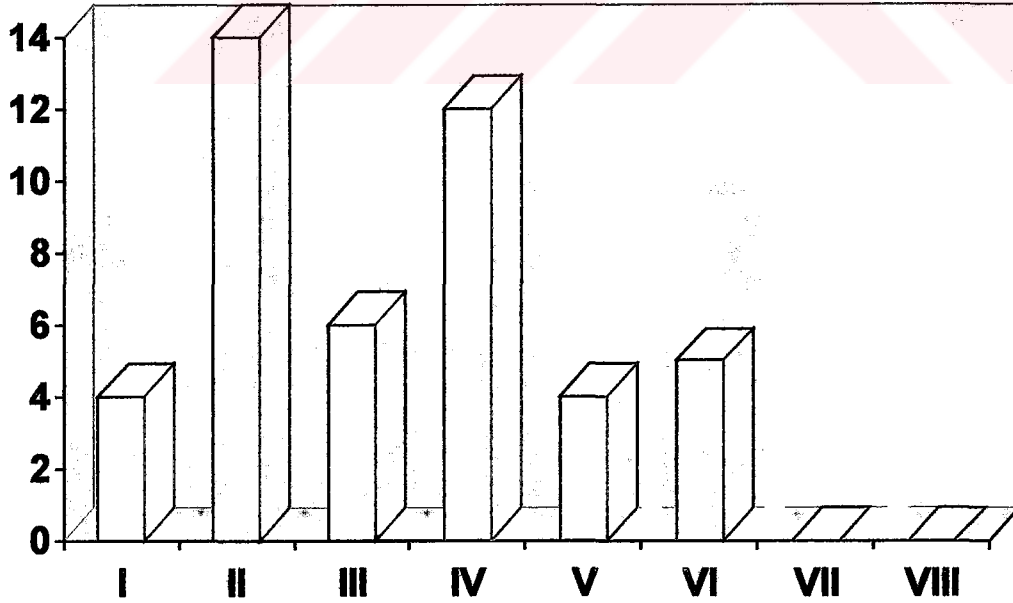
H.parainfluenzae biyotiplerinin örneklere dağılımı

Boğaz sürüntüsünden izole edilen 40 H.parainfluenzae suşunun dördü (%10) biyotip I, onüçü (%32.5) biyotip II, beşi (%12.5) biyotip III, onu (%25) biyotip IV, üçü (%7.5) biyotip V, beşi (%12.5) biyotip VI olarak belirlenmiştir. Balgamdan izole edilen üç H.parainfluenzae suşunun ikisi (%66.7) biyotip IV, biri (%33.3) biyotip V olarak saptanmıştır. Burun sürüntüsünden izole edilen iki suşun biri biyotip II, diğeri ise biyotip III olarak saptanmıştır (Tablo 7, Grafik 4).

Tablo 7. H.parainfluenzae biyotiplerinin örneklere göre dağılımı

Örnek /Biyotip	n	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Boğaz sürüntüsü	40	4	13	5	10	3	5	0	0
Balgam	3	0	0	0	2	1	0	0	0
Burun sürüntüsü	2	0	1	1	0	0	0	0	0
Toplam	45	4	14	6	12	4	5	0	0

(n):suş sayısı



Grafik 4. H.parainfluenzae biyotiplerinin dağılımı

Beta-laktamaz aktivesi

98 Haemophilus cinsi bakteriden ampisiline dirençli dört suş beta-laktamaz pozitif bulunmuştur. Suşların ikisi (%5.4) H.influenzae, ikisi (%4.44) H.parainfluenzae'dir.

Antibiyotiklere duyarlık

İzole edilen Haemophilus cinsi bakterilerin çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları tablo 8'de verilmiştir. H.influenzae sefoperazon, sefotaksim, seftriakson, seftazidim, kloramfenikol/tiamfenikol, aztreonam, ofloksasin ve siprofloksasine %100, sefuroksime %94.6, sefalotin, ampisilin/amoksisilin, ampisilin+sulbaktam, amoksisilin+klavulanik asid, gentamisine %86.5, penisilin G'ye %89.1, azidosiline %48.6, mezlosiline %56.7, tobramisine %75.6, amikasine %75.6, netilmisine %83.8, tetrasikline %81, eritromisine %54 oranında duyarlı bulunmuştur .

H.parainfluenzae sefoperazona, seftriakson ve sefotaksime %100, sefuroksime %97.8, ampisilin/amoksisiline %86.6, kloramfenikol/tiamfenikole %93.3, ampisilin+sulbaktam ve amoksisilin+klavulanik aside %80 oranında duyarlı bulunmuştur (Tablo 8).

Tablo 8. Haemophilus cinsi bakterilerin çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları (suş sayısı / %)

Antibiyotikler	H.influenzae (37)	H.parainfluenzae (45)	H.haemolyticus (7)	H.paraahaemolyticus (6)	Haemophilus cinsi (3)
Eritromisin	20(%54)	31(%68,9)	7	2	1
Penislin G	33(%89,1)	37(%82,2)	6	6	3
Ampisilin/Amoksisilin	32(%86,5)	39(%86,6)	7	5	1
Ampisilin+Sulbaktam	32(%86,5)	36(%80)	6	5	2
Amoksisilin+klavulanik asit	32(%86,5)	36(%80)	7	6	2
Azidosilin	18(%48,6)	27(%60)	7	4	2
Mezlosilin	21(%56,7)	30(%66,6)	7	5	2
Sefalotin	32(%86,5)	38(%84,4)	7	5	1
Sefuroksim	35(%94,6)	44(%97,8)	7	6	3
Seftriakson	37(%100)	45(%100)	7	6	3
Sefoperazon	37(%100)	45(%100)	7	5	3
Sefotaksim	37(%100)	45(%100)	7	6	3
Seftazidim	37(%100)	45(%100)	6	6	3
Aztreonam	37(%100)	45(%100)	6	3	2
Gentamisin	32(%86,5)	40(%88,9)	6	5	2
Tobramisin	28(%75,6)	37(%82,2)	7	5	1
Amikasin	28(%75,6)	38(%84,4)	7	6	1
Netilmisin	31(%83,8)	42(%91,1)	7	6	2
Kloramfenikol/tiamfenikol	37(%100)	42(%93,3)	7	6	3
Tetrasiklin	30(%81)	36(%80)	7	6	3
Ofloksasin	37(%100)	45(%100)	7	5	2
Siprofloksasin	37(%100)	45(%100)	7	4	2

(n): suş sayısı

TARTIŞMA

Haemophilus cinsi bakteriler güç üreyen, dış koşullara çok duyarlı bakterilerdir. Dolayısıyla bu mikroorganizmaların izolasyon ve identifikasyonları oldukça güçtür. Bu nedenle Türkiye’de günümüzde dahi ancak belli laboratuvarlarda üretilebilmektedir (8,17,41,60,105,109) .

H.influenzae izolasyon oranının beklenen düzeyde olmayışının çeşitli nedenleri vardır. Başta gelen nedenler bakterinin kısa sürede canlılığını yitirmesi, örneklerin alındıktan sonra laboratuvara geç ulaşması ve hastanın antibiyotik kullanmış olmasıdır. Çeşitli ülkelerde ve değişik zaman dilimlerinde yapılan çalışmalarda Hib izolasyon sıklığı, serotiplendirme ve biyotiplendirme ile Türkiye’de yapılan çalışmalar arasında uyumsuzluk vardır. Ayrıca Türkiye’deki çalışmaların da birbirleri ile uyumsuzluğu, H.influenzae’nin izolasyon oranının bölgesel farklılığı, yaş, sosyoekonomik durum, mevsim, farklı örnek çeşidi, antibiyotik kullanımı, malinite, malnütrisyon, örneklerin yuva, okul gibi toplu yaşanan yerlerden alınmış olması ve kardeş sayısı gibi faktörlere bağlılığı ile açıklanabilir. Hib taşıyıcılığı da bu faktörlere göre değişmektedir (56,112).

Ülkemizdeki çalışmaların büyük bir kısmı serotipleme ve biotipleme yapılmaksızın, suşların ampisilin direnci ve beta-laktamaz aktivitesini saptayan çalışmalardır.

Mamal (65) bir çalışmasında solunum yolu infeksiyonu olan 138 hastanın 16'sında H.influenzae izole etmiş ve bunların sekizinin serotip b, ikisinin serotip a olduğunu bildirmiştir. Ayrıca burun, boğaz taşıyıcılığını %9.7 olarak tespit etmiş ve bunun %42'sinin tip b olduğunu saptamıştır. Berkiten ve Tolun (17) 652 balgam örneğinin, 32'inde Haemophilus influenzae, 231'inde Haemophilus cinsi bakteri izolasyonu bildirmiş, 32 H.influenzae'nin yedisi serotip b, ikisi serotip d ve ikisi serotip e olarak tiplendirilmiştir. Berkman (18) incelediği 1249 boğaz kültüründen 57'sinde Haemophilus cinsi bakteri izole etmiş ve bunların 37'sini H.influenzae olarak saptamıştır. 37 suştan 12'sini tip b olarak belirleyip diğerlerini tiplendirememiştir. Ayrıca boğaz sürüntüsünde taşıyıcılık oranını H.influenzae'da %2.96, Hib'de %0.96 olarak bulmuştur. Macha ve ark. (63) çeşitli Avrupa ülkelerinde nazofarinks ve sinüslerden alınan 487 ÜSY örneğinden %13 Hib, %85 tip b dışı H.influenzae ve %2 H.parainfluenzae izole ettiklerini bildirilmişlerdir. Ginsburg ve ark. (43) 14 ay süre ile yuvadaki normal 48 çocuğu izlemiş ve yedisinin boğaz sürüntüsünde Hib pozitifliği saptamışlardır. Bu çocuklarda zamanla taşıyıcılık oranının arttığı ve %56'ya yükseldiği saptanmıştır. Oysa yuva dışı ortamdaki çocuk popülasyonunda taşıyıcılık oranı %2-6 olarak belirtilmiştir. Tablo 10'da da belirtildiği gibi, beş yaşından küçük ve yuvaya giden çocuklarda H.influenzae bakterisinin taşıyıcılık oranının yüksek olduğu belirtilmiştir (7,8,69,105,109)(Tablo 10).

Yurdakul ve ark. (108) 1550 konjunktiva örneğinden 11 H.influenzae bakterisi izole etmişlerdir. Aydın ve ark. (6) genital salgı örneklerinden izole ettikleri 16 suşun, %18.7'sini biyotip I, %18.7'sini biyotip II, %6'sını biyotip III, %43.7'sini biyotip IV ve %12.5'ini biyotip VI olarak bildirmiştir. Kayhan ve ark. (54) kronik sinüzit vakalarından alınan 108 burun sürüntü örneğini inceleyerek 20 Haemophilus cinsi bakteri izole etmişlerdir. bunların kloramfenikol ve rifampisine duyarlı, diğer antibiyotiklere çeşitli oranlarda ve ampisiline de %45 oranında dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Küçükaraaslan ve ark. (61) 738 boğaz sürüntüsü, 24 balgam ve 40 BOS örneği olmak üzere toplam 802 muayene maddesinden , 117'si boğaz sürüntüsünden , biri balgamdan toplam 118'i H.influenzae, üçü balgamdan

Tablo 9. Türkiye’de bildirilen Haemophilus türleri

Kaynak / Hemofil türleri	H.influenzae	H.parainfluenzae	H.haemolyticus	H.parahaemolyticus	H.paraprophohaemolyticus	H.pleuropneumoniae	H.aerophilus	H.segnis	H.parasuis	Haemophilus cinsi
Mamal (64)	41	25	4	-	1	1	2	2	1	33
Yarkin (107)	81	18	-	-	-	-	-	-	-	-
Kayhan ve ark. (54)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20
Berkiten ve Tolun (17)	32	-	-	-	-	-	-	-	-	231
Durmaz ve ark. (38)	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Küçükkaaslan ve ark (61)	118	35	12	-	-	-	-	-	-	-
Berkiten ve Gürol (16)	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Saydam ve ark. (90)	54	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Berkiten ve ark. (14)	81	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kaygusuz ve ark. (53)	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gürlü ve ark. (41)	46	18	-	-	-	-	-	-	-	-
Berkiten ve Gürol (15)	314	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Yıldız ve ark. (109)	62	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bu çalışma	37	45	7	6	-	-	-	-	-	3

Tablo 10. Ülkemizde Hib ve Hib dışı nazofarinks kolonizasyonu(%)

Kaynak	Yaş	Kolonizasyon oranı
Yıldız ve ark. (109)	Kreş çocukları	41.6*
Vahaboğlu ve ark. (105)	5 yaş altı ve üstü	77-59
Mamal ve ark. (69)	5-11 yaş	46
Ayyıldız ve ark. (8)	7-12 yaş	Hib 3 / Hib dışı 10
Aydın ve ark. (7)	7-14 yaş	5.9**

* Boğaz sürüntüsü

** Burun sürüntüsü

toplam 35'i H.parainfluenzae, 12'si H.haemolyticus olmak üzere 165 bakteri izole etmiş, BOS örneklerinden Haemophilus cinsi bakteri izole etmemiştir. 118 H.influenzae suşunun altısı serotip a, sekizi serotip b, sekizi serotip d, dördünü serotip f olarak belirlemiş, 92 suşu serotiplendirememiştir. Böylece H.influenzae bulunma oranını %15.8, Hib taşıyıcılığını %1.08 olarak saptamış ve H.influenzae suşlarında kloramfenikole %15.5, ampisiline %52.5, sefuroksime %46.6, ampisilin/sulbaktam %36.5 ve sefalosporinlere %22.9-69.5 oranında direnç saptamıştır. Saydam ve ark. (90) kulak akıntısı ve balgam örneklerinden izole edilen 54 Haemophilus influenzae suşunun, altısının serotip b olduğunu saptamış, 48'ini tiplendirememiştir; ayrıca suşların üçü (%5.5) beta-laktamaz pozitif ve ampisiline dirençli saptanmış, kloramfenikol ve sefuroksime direnç saptanmamıştır. Yarkin (107) 220 ÜSY örneği incelemiş ve 81 (%36.8) H.influenzae izole etmiştir. seksenbir H.influenzae'dan 18'ini (%22.2) tip b olarak saptamış ayrıca 55 BOS örneğinden 9 (%16.3) Hib izole edildiğini bildirmiş, Hib suşlarının ampisiline %9.8, kloramfenikole %1.2, sefuroksime %2.4 dirençli olduğunu saptamıştır. Durmaz ve ark. (38) 0-6 yaş ve 6 yaş üzeri toplam 470 hastadan aldıkları kulak, burun, boğaz ve konjunktiva örneklerinden altısı tip b olmak üzere 10 H.influenzae izole etmişlerdir. İzolatların yedisi (%5.2) altı yaşın altındaki çocuklarda saptanmıştır. 54 burun sürüntüsünden dört ve 51 konjunktiva sürüntüsünden iki Hib izolasyonu bildirmiş, 10 suştan ikisinin beta-laktamaz inhibitörlü bir ilaç olan amoksisilin klavulanik aside, üç suşun ampisiline ve dört suşun sefotaksime dirençli, tümünün kloramfenikole duyarlı olduğunu saptamıştır.

Mamal (64) 1985 yılında boğaz, burun, kulak, göz, vagina sürüntüsü, balgam, cerahat, diren sıvısı, kan ve çeşitli vücut sıvıları olmak üzere toplam 625 muayene maddesinden izole ettiği 112 Haemophilus cinsi bakteriden 41'ini H.influenzae, 25'ini H.parainfluenzae, 2'sini H.segnis ve birini H.parasusis olarak saptamış, 33'ünün türünü saptayamamıştır (Tablo 9). Aynı çalışmada 128 vücut sıvısı örneğinin 43'ünde lateks aglutinasyon testi ile Hib antijeni pozitif olarak bulunmuş bir örnekte

ayrıca üretilmiştir . biyotip V izolasyonunu %56, biyotip VI'yı %22, biyotip III'ü %2.4, biyotip I ve II'yi ise %19.5 oranında bildirmiştir. H.influenzae suşlarının kloramfenikole %10, H.parainfluenzae'nin %16, H.haemolyticus'un %75 oranında direnç gösterdiğini saptamıştır. Ayrıca H.influenzae suşlarında amoksisiline %12.5, H.parainfluenzae suşunda ise %12 direnç saptarken diğer türlerde dirençli suş bulmamıştır. Sefoperazon, sefotaksim, seftriakson, netilmisin, amikasin, mezlosilin ve azidosiline direnç saptamamıştır. Berkiten ve Gürol (16) solunum sistemi örneklerinden izole edilen 100 H. influenzae suşunun 36'sını serotip b, 12'sini serotip a ve 52'sinin ise bu iki serotipten olmadığını, biyotiplemede ise biyotip I'i (%46) en fazla izole edilen olarak saptamıştır. Suşların üçünde (%3) beta-laktamazın pozitif ve bu suşlardan ikisinin (%2) ampisiline, birinin (%1) ampisilin ve kotrimoksazole dirençli olduğu bildirilmiş, diğer bir çalışmada (14) 81 H.influenzae suşunun, üçünün (%3.7) ampisiline dirençli, dördünün orta duyarlı olduğu, kloramfenikol, sefuroksim ve seftriaksona ise direnç saptanmadığı, suşlardan birinde (%1.2) beta-laktamaz aktivitesinin pozitif olduğu bildirilmiştir. Ülkemizde yapılan bir başka çalışmada 81 H.influenzae suşunun, altısında (%7.4) beta-laktamaz aktivitesi pozitif bulunmuştur (39). Çetin ve ark. (32) 1968-1969 yıllarına ait çeşitli örneklerden 21 Haemophilus cinsi bakteri izole edip, bunların oksasiline %100, spiramisine %95.2, oleandomisine %90.5, penisiline %52.4, novobiosine ve kolistine %47.6, streptomisine %38.1, polimiksin B ye %33.3, eritromisine %23.8, neomisine %19, kloramfenikol ve tetrasikline %14.3 dirençli olduğunu saptamışlardır. Candan ve Töreci (25) 1988 yılında yaptıkları çalışmada, Haemophilus cinsi bakterilerin ampisilin direncini %7 saptarken, ampisilin/sulbaktama direnç saptamamışlardır.

Vahaboğlu ve ark. (105) 1994 yılında 106 H.influenzae suşunun mikrodilüsyon yöntemi ile antibiyotiklere duyarlılığını denedikleri çalışmalarında ampisilin direncini %25, beta-laktamaz pozitifliğini ise %21 olarak bulmuşlardır. H.parainfluenzae suşları ise %16 oranında beta-laktamaz oluşturmuşlardır. Aynı çalışmada H.influenzae suşlarında kloramfenikole %5, sefuroksim ve seftriaksona %8 direnç saptanmıştır. Töreci (101) çalışmasında H.haemolyticus suşlarının

kloramfenikole duyarlı, ampisiline %11 oranında dirençli olduğunu bildirmiştir. Berkiten ve Gürol (15), 249 H.influenzae suşunun 21'inde (%8) beta-laktamaz pozitif bulurken, 27'sini (%9) ampisiline, 11'ini (%4) ampisilin+sulbaktam, dokuzunu (%4) sefaklor, sekizini (%3) sefuroksime, yedisini (%2) kloramfenikole, 28'ini (%11) kotrimaksazole dirençli bulmuştur. Kaygusuz ve ark. (53) yaptıkları çalışmada, 50 H.influenzae suşunda beta-laktamaz aktivitesinin tespit edilmediğini, penisilin, sefalosporin, azitromisin ve kloramfenikole direnç saptanmadığını, ko-trimoksazole ise %14 oranında direnç saptadıklarını bildirmişlerdir. Gürler ve ark. (41)'nin yaptıkları çalışmada, 466 örnekten 46 H.influenzae, 18 H.parainfluenzae izole edilmiştir. 46 H.influenzae suşunun beşinde (%10.87) ampisilin direnci, birinde (%2.1) beta-laktamaz pozitifliği bildirmişlerdir. Kloramfenikole %8.7 ve sefuroksime %2.2 direnç saptanmasına karşın, seftriaksona direnç saptanmamıştır.

Avrupa ülkelerinde (Avusturya, Belçika, Fransa, Doğu Almanya, Hollanda, İspanya, İsveç, İsviçre ve İngiltere) yapılan bir çalışmada 749 çeşitli alt solunum yolu örneğinden (balgam, transtrakeal aspirasyon, bronkoskopi materyeli) izole edilen Haemophilus cinsi bakterilerin %9'nun Hib, %88'nin tip b dışı H.influenzae ve %3'ünün H.parainfluenzae olduğunu bildirmişlerdir. Bu dokuz ülkede Şubat-Ekim 1968 tarihinde yapılan çalışmalarda 287 vücut sıvısında (kan, BOS, plevra sıvısı) izole edilen Haemophilus cinsi bakterilerin %70'nin Hib, %29'unun H.influenzae tip b dışı serotipler ve %1'i H.parainfluenzae olarak saptanmıştır. En yüksek ampisilin direnci İspanya'da %31, Belçika'da %27, en düşük direnç ise Almanya'da %2 bulunmuştur. Kloramfenikol direnci yine aynı iki ülkede en yüksek olarak saptanırken (%32 ve %11) bir çok Avrupa ülkesinde, Avustralya ve Amerika'da %1-2 gibi düşük oranlarda bildirilmiştir (63). ABD'de ampisilin ve kloramfenikolün ikisine de dirençli Hib suşlarının %1'in altında olması, o dönemde ampisilin+kloramfenikol kombinasyonunun standard tedaviye dönüşmesini sağlamıştır (44). İspanya'da ise H.influenzae suşlarının kloramfenikol+ampisiline direnç prevalansı %50'nin üzerinde saptanmıştır(24).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda, kloramfenikol'e direncin arttığı saptanmıştır (4,46,68,80). Çeşitli kaynaklarda sefotaksim veya seftriaksonun H.influenzae infeksiyonlarının tedavisinde ampisilin+kloramfenikol kadar etkili olduğu ve üçüncü kuşak sefalosporinlerin seçilebileceği önerilmiştir (35,51,52,66).

Beta-laktamaz pozitif Hib suşları Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan, eş zamanlı olmayan çalışmalarda sırasıyla %20 (51) , %31.1 (37) , %28.9 (52) , Suudi Arabistan'da (1) %13.2 , Japonya'da %15 , Fransa'da %28 , İngiltere'de %18 , Çin ve Almanya'da %6 (79) oranlarında bildirilmiştir . Bu oran çeşitli coğrafi bölgelere göre değişmektedir.

Jongenson ve ark. (49) yaptıkları çalışmada 564 H.influenzae suşunun %16.5'inde beta-laktamaz pozitif olarak saptamışlar ve bakterinin beta-laktamaz üretimi ile hastaların cinsiyeti ve yaşı arasındaki ilişkiyi araştırmışlardır. En düşük beta-laktamaz aktivitesini 80 yaşından büyük hastalar ile 21-35 yaş arasındaki hastalarda, en yüksek aktivitenin ise 6 ay-6 yaş arasındaki hastalarda olduğunu bildirmişlerdir. Beta-laktamaz üretiminin tip b suşlarında daha fazla (%29.3), tip b dışındaki suşlarda ise az (%15) olduğunu ve kadınlardan izole edilen suşlarda %23, erkek hastalardan izole edilen suşlarda ise %16 oranında olduğunu bildirmişlerdir.

Bazı H.influenzae suşları beta-laktamaz oluşturmadan değişik bir mekanizma ile ampisiline direnç geliştirirler. Bu suşlarda PBP'lerde değişiklik olduğu ve bu şekilde ampisilin ve diğer beta-laktamlara afinitenin azaldığı DNA transformasyon çalışmalarıyla gösterilmiştir (28). Bu gibi ampisiline dirençli, beta-laktamaz oluşturmayan suşların oranı, İngiltere'de 1981 de %2.5 dan %6'ya yükselmiştir (86). İspanya'da ise dirençli suşların %5'inde beta-laktamaz dışı bir direnç mekanizmasının etken olduğu belirtilmiştir (63).

Ülkemizdeki beta-laktamaz prevalansı çalışmaların azlığı nedeniyle tam olarak bilinmemekle birlikte bu oranın %0'lardan % 35'lere yükseldiği görülmektedir. (13).

Bu çalışmada 361 çeşitli örnekten 37 H.influenzae, 45 H.parainfluenzae, yedi H.haemolyticus, altı H.parahaemolyticus ve üç Haemophilus cinsi bakteri izole edilmiştir. Haemophilus cinsi olarak belirlenen suşlar tüm biyokimyasal testler yapılamadığı için ayrıca idantifiye edilmemiştir. 37 H.influenzae'nin ikisi serotip a, 17'si serotip b, beşi serotip d, yedisi serotip e olarak saptanmıştır. İncelenen 33 balgam örneğinde altı H.influenzae, üç H.parainfluenzae ve bir H.parahaemolyticus olmak üzere toplam 10 Haemophilus cinsi bakteri izole edilmiştir. Altı H.influenzae'nin biri serotip b, biri serotip d, ikisi serotip e olarak saptanmış, ikisi ise tiplendirilememiştir. Konjunktivitli iki hastanın birinin göz sürüntüsünden H.haemolyticus izole edilmiştir. 248 boğaz ve 53 burun sürüntüsünden 29 H.influenzae, 40 H.parainfluenzae, 6 H.haemolyticus, 5 H.parahaemolyticus ve 3 Haemophilus cinsi bakteri izole edilmiştir. 53 burun sürüntüsünden 1 H.influenzae serotip d ve 2 H.parainfluenzae izole edilmiştir. Boğaz ve burun'da Haemophilus cinsi taşıyıcılık oranı %28.6, H.influenzae taşıyıcılığı %9.9 olarak bulunmuş, bunun %5'ini serotip b oluşturmuştur. ÜSY'larında H.influenzae izolasyonu normal bir bulgu olarak değerlendirilmekte ve taşıyıcılık şeklinde yorumlanmaktadır. Sağlıklı çocukların %6'sı Haemophilus influenzae tip b'yi nazofarinkslerinde taşımaktadır (56,112). Serotip b diğer serotiplere göre daha yüksek oranda saptanmıştır. Mamal (65), Berkman (18), Durmaz ve ark. (38), Küçükkaaslan ve ark. (61), Berkiten ve Gürol (16) ve Aydın ve ark. (7)'in da çalışmalarında serotip b çeşitli klinik örneklerden en çok izole edilen serotip olmuştur (Tablo 11). Avrupa ülkelerini kapsayan başka bir biyotiplendirme çalışmasında Hib biyotip I ve biyotip IV yüksek oranda izole edilmiştir (9). Ayrıca biyotip I, II, IV, VI eşit oranlarda (%19.44) bulunmuş olup biyotip VII ve VIII saptanmamıştır. 12 BOS örneğinden ise bir Hib biyotip I izole edilmiş ayrıca lateks aglutinasyon testi ile bu sonuç doğrulanmıştır. Biyotip I genellikle menenjit etkenidir ve bu sonuç hastanın kliniği ile uyum göstermiştir. H.parainfluenzae izolasyon sıklığı Avrupa ülkelerine(63) oranla daha fazla

Tablo 11. İzole edilen H.influenzae serotiplerinin dağılımı

Kaynak / Serotip	n	a	b	c	d	e	f	Tiplendirilemeyen
Yarkın (107)	90	*	27	*	*	*	*	*
Berkiten ve Tolun (17)	32	0	7	0	2	2	0	21
Küçükkaaşan ve ark. (61)	118	6	8	0	8	0	4	92
Durmaz ve ark. (38)	10	*	6	*	*	*	*	*
Berkiten ve Gürol (16)	100	12	36	*	*	*	*	52
Saydam ve ark. (90)	54	*	6	*	*	*	*	48
Aydın ve ark. (6)	14	*	10	*	*	*	*	*
Bu çalışma	37	2	17	0	5	7	0	6

* : Bakılmamıştır

(n) : Suş sayısı

olmasına karşın, Hib dışı H.influenzae izolasyonu bu çalışma ile uyumlu bulunmuştur. Çalışma sonucunda BVCC agar en uygun besiyeri olarak saptanmıştır. Chapin ve Doren (27) üst solunum yolu florası ile kontamine boğaz sürüntü örneğini ekim yaptıkları çikolata agar, çikolata agar +vankomisin ve çikolata agar + vankomisin + klindamisin + basitrasin besiyerlerinde Haemophilus izolasyon oranlarını sırası ile %6, %28.5, %59.9 olarak belirtmişlerdir. Bu çalışmada beta-laktamaz pozitifliği H.influenzae'da %5.4, H.parainfluenzae'da %4.4 olarak bulunmuştur. H.influenzae suşları; sefoperazon, sefotaksim, seftriakson, seftazidim, kloramfenikol, aztreonam, ofloksasin, siprofloksasin %100 oranında duyarlı, sefuroksime %5.4 oranında dirençli sonuç vermiştir. H.parainfluenzae suşları sefotaksim, sefoperazon, seftriakson, seftazidime %100, kloramfenikole %93.3 oranında duyarlı olarak saptanmıştır. H.haemolyticus ve H.parahaemolyticus kloramfenikole %100 oranında duyarlı bulunmuş, bir H.parahaemolyticus suşunda ise ampisilin direnci saptanmıştır. H.influenzae

bakterisinde ampisilin direnci %13.5 iken beta-laktamaz pozitifliği %5.4, H.parainfluenzae'da ampisilin direnci %13.5 iken beta-laktamaz pozitifliđinin %4.4 bulunmuştur.

Erişkin H.influenzae infeksiyonlarında kinolonlar gittikçe artan oranlarda kullanılmaktadır. Çeşitli çalışmalarda bu gruba düşük düzeyde direnç saptandığı bildirilmiştir (53,57,58,61) . Çalışmamızda da çoğu çalışmalara paralel olarak ofloksasin ve siprofloksasine direnç bulunmamıştır (Tablo 8).

Yapılan çalışmalarda, Tablo 12'de de verildiği gibi H.influenzae suşlarının antibiyotiklere duyarlılığı ve beta-laktamaz aktivitesi farklılık göstermektedir (Tablo 12); Bu farklılıkta farklı antibiyotik duyarlılık testlerinin uygulanması, antibiyogram standardizasyonunun gerçekleştirilememesi, coğrafik bölgeler, yaş ve mevsimsel farklılıklar etkili olmaktadır (36,66,81). Sonuç olarak infeksiyon etkeni olarak laboratuvarımızda izole edilen H.influenzae bakterilerin beta-laktamaz aktivitesi, serotip, biyotip yoğunluğu ve antibiyotiklere duyarlılıkları, ülke genelinde elde edilen sonuçlar ile bazı çalışmalar dışında uyumlu bulunmuştur. Sonuçlar beta-laktamaz aktivitesinin ve ampisiline direncin düşük oranda devam ettiğini göstermektedir, bu ülkemiz açısından önemli bir bulgudur.

Tablo 12.Çeşitli kaynaklara göre H.influenzae suşlarının antibiyotiklere direnci ve beta-laktamaz pozitifliği(%)

KAYNAK	Ampisilin/Amoksisilin	Kloramfenikol	Sefotaksim	Seftriakson	Sefoperazon	Sefuroksim	Beta-laktamaz(+)
Mamal (64)	12.5	10	0	0	0	*	*
Durmaz ve ark. (38)	30	0	-	-	*	*	*
Küçükaraasian ve ark. (61)	52.5	15.5	-	23	*	46.6	*
Yarkın (107)	9.8	1.2	*	*	*	2.4	*
Vahaboğlu ve ark.(105)	25	5	*	8	*	8	21
Saydam ve ark. (90)	5.5	0	*	*	*	0	5.5
Berkiten ve Gürol (15)	9	2	*	0	*	3	8.4
Kaygusuz ve ark. (53)	22	*	*	*	*	*	22
Berkiten ve ark. (14)	3.7	0	*	0	*	0	1.23
Berkiten ve Gürol (16)	13.75	*	*	*	*	*	3.75
Gürler ve ark. (41)	10.8	9.7	*	0	*	2.2	2.1
Yıldız ve ark. (109)	33.8	*	*	*	*	*	*
Kansak ve ark. (50)	0	*	*	*	*	*	0
Mamal ve ark. (68)	13	*	*	*	*	*	16.6
Bu çalışma	13.5	0	0	0	0	5.4	5.4

* : Bakılmamıştır

** : Bazı çalışmalarda bildirilen 3.kuşak sefalosporinlere direnç, günümüzde henüz NCCLS tarafından doğrulanmamıştır.

ÖZET VE SONUÇLAR

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD'nin çeşitli servislerinden gönderilen 361 muayene maddesi (248 şaz, 53 burun sürüntü, 33 balgam, 12 BOS, altı cerahat, beş dializ sıvısı, iki göz sürüntüsü, iki trakeal irasyon sıvısı) incelenmiştir. Haemophilus cinsinin izolasyonu için BCV ve poliviteksli at kanlı olata, basitrasin'li at kanlı çikolata ve koyun kanlı agar olmak üzere üç farklı besiyerine ekim yapılmış, ıca tüm ekimlerde koyun kanlı agarın birinci ve ikinci sahasına ekim sırasında S.aureus suşu ilmiştir. Beyin kalp infüzyon agar ile 300 mg/lt basitrasin, 5 mg/lt vankomisin, 1 mg/lt klindamisin, %5 anı ve 10 ml poliviteks içeren çikolata agar en uygun besiyeri olarak saptanmıştır.

361 muayene maddesinden 98 Haemophilus cinsi bakteri izole edilmiştir. Suşların 37'si (%37.7) nfluenzae, 45'i (%46) H.parainfluenzae, yedisi (7.1) H.haemolyticus, altısı (%6.1) H.parahaemolyticus rak saptanmış, üç (%3.1) suşun türü ise belirlenememiştir.

İki H.influenzae, iki H.parainfluenzae suşu olmak üzere toplam dört suшта beta-laktamaz pozitifliği birlikte ampisilin direnci tespit edilmiştir. Ampisiline dirençli üç suшта beta-laktamaz saptanmamıştır.

37 H.influenzae suşunun serotipi belirlendiğinde ikisi serotip a, onyedisi serotip b, beşi serotip d, dişi serotip e olarak saptanmış, c ve f serotiplerine rastlanmamış, altısı ise tiplendirilememiştir. Serotip diğer serotiplerden daha yüksek oranda izole edilmiştir.

H.influenzae suşlarının biotip tayini yapıldığında sekizi biotip I, yedisi biotip II, beşi biotip III, dişi biotip IV, üçü biotip V, yedisi biotip VI olarak belirlenmiş, biotip VII ve VIII saptanmamıştır.

H.influenzae serotip ve biotip arasındaki ilişkiye bakıldığında iki serotip a suşunun biri biotip IV, dişi biotip V olarak saptanmıştır.

17 serotip b suşunun beşi biotip I, ikisi biotip II, üçü biotip III, ikisi biotip IV, biri biotip V ve dördü biotip VI olarak saptanmıştır.

Beş serotip d suşunun biri biotip I, biri biotip II, ikisi biotip IV, biri biotip VI, yedi serotip e suşunun biri biotip I, biri biotip II, biri biotip III, ikisi biotip IV, biri biotip V ve biri biotip VI olarak belirlenmiştir. Tiplendirilemeyen altı H.influenzae suşunun biri biotip I, üçü biotip II, biri biotip III ve biri biotip VI olarak saptanmıştır.

45 H.parainfluenzae suşunun dördü biotip I, ondördü biotip II, altısı biotip III, onikisi biotip IV, dördü biotip V, beşi biotip VI olarak belirlenmiş, biotip VII ve VIII saptanmamıştır.

Boğaz ve burun'da Haemophilus cinsi taşıyıcılık oranı %28.6, H.influenzae'da ise %9.9 olarak bulunmuş, bunun %5'ini serotip b oluşturmuştur.

98 Haemophilus cinsi bakterinin Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile at kamı ve Müller Hinton agar üzerinde çikolata agarda duyarlık testi yapılmış; H.influenzae sefoperazon, sefotaksim, seftriakson, klavulanat, klavulanat/aztreonam, klavulanat/cefepim, klavulanat/cefepim/aztreonam, klavulanat/cefepim/aztreonam/meropenem, klavulanat/cefepim/aztreonam/meropenem/levofloksasin ve ofloksasine %100, sefuroksime %94.6, sefalotin ve sefalosporinler %86.5, duyarlı bulunurken; H.parainfluenzae sefoperazone, sefotaksime, klavulanat/aztreonam ve seftriaksona %100, sefuroksime %97.8, klavulanat/aztreonama %93.3, ampicilin/amoksisiline %86.6 oranında duyarlı bulunmuştur .

Sonuç olarak incelenen 98 Haemophilus cinsi bakterinin BVCÇA besiyerinde daha iyi ürediği, 37 H.influenzae'dan 17'sinin Hib olduğu, biyotip incelemesinde biyotip I'in daha yaygın bulunduğu, antibiyotik dirençlerinde, suşların %13.5'nin ampicilin dirençli ve %5.4'nün β -laktamaz pozitif olduğu, üçüncü kuşak sefalosporinler, kinolonlar ve aztreonama suşların tamamının duyarlı olduğu saptanmıştır.

KAYNAKLAR

Abdel-Rahman EM , Ismael NA , Dizon RA : A study of antibiotic resistance and B-lactamase of Haemophilus influenzae from respiratory infections in Saudi Arabia , J Antimicrob Chemother 44(Suppl A): 92 (1999).

Alp E , Yıldız O , Aygen B , Şahin S , Doğanay M : Yaşlılarda toplum kaynaklı alt solunum sistemi infeksiyonları: 69 hastanın değerlendirilmesi , FLORA Derg 4 : 195 (2005).

Alp E , Yıldız O , Yücel Ş , Aygen B , Doğanay M : Erciyes Üniversitesi Tıp fakültesi yoğun bakım ünitelerinde takip edilen ventilatörle ilişkili pnömoniler: 109 olgunun değerlendirilmesi , FLORA Derg 2: 81 (2005).

Arseven O , Özlü T , Aydın G : Toraks Derneğinin erişkinlerde toplum kökenli pnömoni tanı ve tedavi rehberi , Torak Derg (EK 3): 1 (2002).

Aydın F , Alpay Ş , Mert T , Tosun İ , Özgümüş B , Canyılmaz D , Katırcıoğlu İ: Çeşitli yaş gruplarında Haemophilus influenzae taşıyıcılığının belirlenmesi(özet), 5.Ulusal İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi, Türk Mikrobiyol Cem Yayın No: 23, s.83 (1995).

Aydın MD , Özalp M , Aktaş G , Güvener Z , Anđ Ö: Genital örneklerden izole edilen hemofil cinsi bakterilerin tiplendirilmesi , Klimik Derg 19: 91 (1996).

Aydın N , Sarı C , Okyay P : Aydın ilinde 7-14 yaş grubu çocuklarda A grubu beta hemolitik streptokok , Streptococcus pneumoniae , Haemophilus influenzae ve Staphylococcus aureus taşıyıcılığı ve beden kitle indeksi ile ilişkisi , İnfeksiyon Derg 12: 427 (2002).

Ayyıldız A , Aktaş AE , Yazgı H: Nasopharyngeal carriage rate of *Haemophilus influenzae* in children aged 7-12 years in Turkey , *IJCP* 57: 686 (2003).

Bajanca-Lavado MP , Casin I , Vaz Pato MV , the Multicentre Study Group: Antimicrobial resistance and epidemiological study of *Haemophilus influenzae* strains isolated in Portugal , *J Antimicrob Chemother* 38: 615 (1996).

Barbe G , Babolat M , Boeufgras J M , Monget D , Frenay J: Evaluation of Api NH , a new 2-hour system for identification of *Neisseria* and *Haemophilus* species and *Moraxella catarrhalis* in a routine clinical laboratory , *J Clin Microbiol* 32: 187 (1994).

Barry A L , Fuchs P C , Pfaller M A: Susceptibilities of beta-lactamase producing and nonproducing ampicillin resistant strains of *Haemophilus influenzae* to ceftibuten , cefaclor , cefuroxime , cefixime , cefotaxime and amoxicillin-clavulanic acid , *Antimicrob Agents Chemother* 37: 14 (1993).

Bartlett J G , Ryan K J , Smith T F , Wilson W R: Laboratory diagnosis of lower respiratory tract infections , *Cumitech* 7A , *Am Soc Microbiol* , Washington (1987).

Berkiten R: Türkiye'de *Haemophilus influenzae*: beta-laktamaz pozitifliği ve antibiyotiklere direnç , *ANKEM Derg* 18: 53 (2004).

Berkiten R , Bal Ç , Gürol SD: Solunum yolundan izole edilen *Haemophilus influenzae* suşlarının çeşitli antibiyotiklere in-vitro duyarlılıkları , *ANKEM Derg* 12: 20 (1998).

Berkiten R , Gürol SD: Solunum yolu örneklerinden izole edilen *Haemophilus influenzae* suşlarında antibiyotiklere direnç , *ANKEM Derg* 12: 492 (1998).

Berkiten R , Gürol SD: Solunum yolu infeksiyonlarından izole edilen *Haemophilus influenzae* suşları ve çeşitli antimikrobiklere direnç , *ANKEM Derg* 15: 718 (2001).

Berkiten R, Tolun V: Alt solunum yolu infeksiyonlarında izole edilen etken mikroorganizmalar , 7.Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi program ve kongre tutanakları , Ürgüp (1994)

Berkman E: Boğaz kültürlerinde Haemophilus influenzae insidasının araştırılması , Mikrobiol Bült 20: 76 (1986).

Bilgehan H : Klinik Mikrobiyoloji , Özel Bakteriyoloji ve Bakteri İnfeksiyonları , Barış yayınları: 140 (1986).

Bilgehan H : Klinik Mikrobiyolojik tanı , Birinci baskı , Barış yayınları: 435 (1992).

Brenner D J , Mayer L W , Carlone G, Harrison H , William F , Bibb , Cunto Brandileone M , Sottnek F O , Irino K , Reeves M W , Swenson J M , Birkness KA , Weyant R S , Berkley S F , Woods T C , Steigerwalt A G , Grimont P AD , Mckinney R M, Fleming D W , Gheesling L L , Cooksey R C , Arko R J , Broome CV and The Brazilian Purpuric Fever Study Group: Biochemical , genetic and epidemiologic characterization of Haemophilus influenzae biogrup agyptus(Haemophilus agytpus) strains associated with Brazilian purpuric fever , J Clin Microbiol 26: 1524 (1988).

Brook I: Direct and indirect pathogenicity of beta-lactamase producing bacteria in mixed infections in children , CRC Crit Rev Microbiol 16 (3): 161 (1989).

Burns JL , Mendelman PM , Levy J , Sull TL , Smith AL: A permeability barrier as a mechanism of chloramfenicol resistance in Haemophilus influenzae , Antimicrob Agents Chemother 27: 46 (1985).

- Campos J , Garcia T S , Gairi J M , Fabregues Í: Multiply , resistant Haemophilus influenzae type b causing meningitis , comparative clinical and laboratory study , j Pediatr 108: 897 (1986).

Candan I , Töreci K: Muayene maddelerinden izole edilen suşların ampisiline ve ampisilin+sulbaktam kombinasyonuna duyarlılıkları , ANKEM Derg 2: 251 (1988).

Catlin B W: Iodometric detection of Haemophilus influenzae beta-laktamase: rapid presumptive test for ampicillin resistance . Antimicrob Agents Chemother 7: 265 (1975).

Chapin K C , Doren G V: Selective media for recovery of Haemophilus influenzae from specimens contaminated with upper respiratory tract microbial flora , J Clin Microbiol 17: 1163 (1983).

Clairoux N , Picard M , Brochu A , Rousseau N , Gourde P , Beachamp D , Parr TR , Bergeron MG , Malouin F: Molecular basis of the non-beta-lactamase mediated resistance to beta-lactam antibiotics in strains of Haemophilus influenzae isolated in Canada , Antimicrob Agents Chemother 36: 1504 (1992).

Colins J K , Kelly M T: Comparison of phadebact coagglutination bactogen latex agglutination and counterimmunoelectrophoresis for detection of Haemophilus influenzae type b antigens in cerebrospinal fluid , J Clin Microbiol 6: 1005 (1983).

Çalangu S , Eraksoy H , Özsüt H: Akut bakteriyel menenjitlerde antibiyotik kullanımı, spesifik tedavi rejimleri , İnfeksiyon Hastalıkları , Yüce yayınları 179 (1992).

Çetin E T: Genel ve Pratik Mikrobiyoloji, Besiyerleri : s794,s773,s768 üçüncü baskı, Sermet matbacılık, İstanbul (1973).

Çetin E T , Anđ Ö , Töreci K: 1968-1969 yıllarında izole ettiğimiz 1333 bakteri suşunun antibiyotiklere hassasiyeti , İst Tıp Fak Mecm 33: 615 (1970).

Daum RS , Murphy-corb M , Shapira E , Dipp S: Epidemiology of ROB B-lactamase among ampicillin-resistant Haemophilus influenzae isolates in the United States , J Infect Dis 157: 450 (1988).

- Dilmener M: Haemophilus influenzae infeksiyonları , İç hastalıkları cilt 1 , K. Büyüköztürk , Yüce yayınları: 1018 (1992).

Doern GV and The Alexander Project Collaborative Group: Antimicrobial resistance among lower respiratory tract isolates of *Haemophilus influenzae*: results of a 1992-93 Western Europe and USA collaborative surveillance study , *J Antimicrob Chemother* 38 (suppl A): 59 (1996).

Doern GV , Brueggemann AB , Pierce G , Preston Holley H , Rauch A: Antibiotic resistance among clinical isolates of *Haemophilus influenzae* in the United States in 1994 and 1995 and detection of B-lactamase-positive strains resistant to amoxicillin-clavulanate: Results of a National Multicenter Surveillance Study , *Antimicrob Agents Chemother* 41: 292 (1997).

Doern GV , Richter SS , Huynh HK , Wingert EM , Rhomberg PR , Brueggemann AB: *Streptococcus pneumoniae* , *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis* antimicrobial resistance rates from a 1997-98 34 centers U.S. Surveillance Study , *J Antimicrob Chemother* 44(Suppl A): 91 (1999).

Durmaz G , Koçođlu T , Akgün Y: Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Haemophilus influenzae* suşları ve antibiyotiklere duyarlılıkları , *Mikrobiol Bült* 25: 305 (1991).

Durmaz R , Durmaz B: *Haemophilus influenzae* tip b portörlüğü ve solunum yolu infeksiyonlarındaki rolü , *Fırat Üniv Derg* 4: 73 (1990).

Eşel D , Karaca N , Sümerkan B: Klinik örneklerden izole edilen *Haemophilus* kökenlerinde antibiyotiklere duyarlılık , *ANKEM Derg* 14: 555 (2000).

Erdoğan H , İnan N , Nazik H , Öngen B , Gürler N: Çocuklarda alt solunum yollarından izole edilen bakterilerde antibiyotik direnci , *ANKEM Derg* 18: 12 (2004).

Finegold S M , Baron E J (eds): *Baily and Scott's Diagnostic Microbiolgy* , 7th ed. The C V Mosby Company , St Louis , Toronto , Princeton: 225 (1990).

Ginsburg C M , Mc Gracken G H , Rac S , Parke J C: *Haemophilus influenzae* type b disease , *Jama* 238: 604 (1977).

Givner L B , Abramson J S , Wasilaukas B: meningitis due to Haemophilus influenzae type b resistant to ampicilin and chloramphenicol , Rev Infect Dis 11: 329 (1989).

Granato PA , Jurek EA , Weiner LB: Biotypes of Haemophilus influenzae: Relationship to clinical source of isolation , serotype and antibiotic susceptibility , Am Clin Pathol 79: 73 (1983).

Güvener Z , Erkan F , Aydın MD , Balkanlı O , Anđ Ö: Kronik obstrüktif akciğer hastalığı olgularında izole edilen Haemophilus influenzae suşları , Türk Microbiol Cem Derg24: 161 (1994).

Hiner E E , Frasch C E: Spectrum of disease due to Haemophilus influenzae type b occurring in vaccinated children , J Infect Dis 158: 343 (1988).

Hosker H , Cooke NJ , Hawkey P: Antibiotics in chronic obstructive pulmonary disease , Br Med J 308: 871 (1994).

Jongenson J H , Doren G V , Maher L A , Howell A W , Redding J S: Antimicrobial resistance among respiratory isolates of Haemophilus influenzae , Moraxella catarrhalis and streptococcus pneumoniae in the united states , Antimicrobial Agents Chemother 34: 2075 (1990).

Kansak N , Öksüz L , Kaygusuz A , Öngen B , Töreci K: Haemophilus influenzae , Moraxella catarrhalis , Streptococcus pneumoniae suşlarında antibiyotik direnç , ANKEM Derg 12: 1 (1998).

Kaplan S L: Recent advance in bacterial meningitis, Adv Pediatr Infect Dis 4: 83 (1989).

Karlowsky AJ , Draghi DC , Thornsberry C , Jones ME , Critchley AL , Sahm FD: Antimicrobial susceptibilities of Streptococcus pneumoniae , Haemophilus influenzae and Moraxella catarrhalis isolated in two successive respiratory seasons in the US , Int J Antimicrob Agents 20: 76 (2002).

Kaygusuz A , Özalp M , Öngen B , Gürler N , Töreci K: İstanbul'da çocuk hastalardan izole edilen H.influenzae ve H.parainfluenzae suşlarında antibiyotiklere direnç , ANKEM Derg 9: 47 (1995).

Kayhan V , Güvener Z , Kösemen H , Anđ Ö: Kronik sinüzit etkenleri ve antibiyotiklere hassasiyet , İst Tıp Fak Mecnm 35: 753 (1972).

Khan W , Ross S , Rodrigues W , Controni G and Saz AK: Haemophilus influenzae type b resistant to ampicilin : a report of two cases . JAMA 229 : 298 (1974) .

Kilian M 1991: Haemophilus , In A Balows , W j Hausler , Jr, L Herrmann , H D Isenberg and H J Shadomy (ed) , Manual of clinical microbiology , 5.baskı: s.463 Am Soc Microbiol , Washington.D.C. (1991).

Kocabeyođlu Ö , Birinci İ , Koşan E: Haemophilus influenzae suşlarında beta-laktamaz aktivitesi ve çeşitli antibiyotiklere duyarlılık , ANKEM Derg 10: 119 (1996).

Kocabeyođlu Ö , Birinci İ , Koşan E , Fidan A , Diler M: Haemophilus cinsi bakterilerin sefalosporin ve kinolon grubu bazı antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması , ANKEM Derg 9: 115 (1995).

Koneman EW , Allen SD. Janda WM , Schreckenberger PC , Win WC: Haemophilus , Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology , p.380 , Lippincott , New York (1997).

Küçükbasmacı Ö , Gönüllü N , Aktaş Z , Gürol D , Berkiten R: In vitro activity of telithromycin compard with macrolides and fluoroquinolones against Streptococcus pneumoniae , Haemophilus influenzae and Moraxella catarrhalis , Int J Antimicrobial Agents 22: 497 (2003).

Küçükbaraaslan A , Kocabeyođlu Ö , Emekdaş G: Klinik örneklerden Haemophilus cinsi bakterilerin izolasyon sıklığı ve antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması , İnfeksiyon Derg 5: 181 (1991).

MacGowan AP , Brown NM , Holt HA , Lovering AM , McCulloch SY , Reeves DS: An eight-year survey of the antimicrobiol susceptibility patterns of 85.971 bacteria isolated from patient in a District General Hospital and The Local Community , J Antimicrob Chemother 31: 543 (1993).

Macha k , Braveny İ , Dabernat H , Dornbush K , Vandyck E , Kayser FH , Van Klingerden B , Mittermeyer H , Perea E , Powell M: Distribution and resistance patterns of Haemophilus influenzae; A European Coeporative Study , Eur J Clin Microbiol Infect Dis vol.7,No.1: s.14 (1988).

Mamal M: insandan izole edilen Haemophilus cinsi bakteriler üzerine alıřmalar , Türk Mikrobiol Cem Derg 17: 1 (1987).

Mamal M: Haemophilus influenzae infeksiyonlarının epidemiyoljisi ve patojenezi , Klinik gelişim 2: 519 (1989).

Mamal M: Antibiyotik duyarlılık testlerinde sorunlar , Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Standardizasyonu Toplantısı kitabı s.23 , Türk Mikrobiyol Cem Yayın No: 33 , İstanbul (1997).

Mamal M , Alkan E , Altınkum SM , Aksın E , Kulaksız B , Yüksel P: Haemophilus influenzae'de antimikrobiklere direnç sıklığı , Türk Mikrobiol Cem Derg 28: 49 (1998).

Mamal M , Alkan E , Karatař A , Bahar H , Altınkum SM: Haemophilus influenzae'de antimikrobik maddelere direnç frekansı , 2.Haemophilus influenzae İnfeksiyonları Simpozyumu , Simpozyum kitabı , s.80 , Türk Mikrobiol . Cem Yayınları No.38 , İstanbul (2001).

Mamal M , Alkan E , Karatař A , Yıldız N: Haemophilus influenzae'de nazofarengeal taşıyıcılık , 2.Haemophilus influenzae İnfeksiyonları Simpozyumu , Simpozyum kitabı s.79 , Türk Mikrobiol Cem Yayını 38 , İstanbul (2001).

Mamal M , z S: Haemophilus influenzae serotip b biotip V'in etken olduğu bir kolesistit olgusu , İnfeksiyon Dergisi 1(4): 267 (1987).

Moller L V M , Alphen L V , Grasselier H , Dankert J: N-Acetyl-D-Glucosamine medium improves recovery of Haemophilus influenzae from sputa of patients with cystics fibrosis , J Clin Microbiol 31: 1952 (1993).

Montgomery K , Raymondo L , J R and W L Drew: Chromogenic cephalosporin spot test to detect beta-lactamase in clinically significant bacteria , J Clin Microbiol 9: 205 (1979).

Moxon ER: Haemophilus influenzae , "Mandel GL , Bennett JE , Dolin R (eds): Principles and Practice of Infectious Disease , 4.baskı" kitabında s.2039 , Churchill Livingstone , New York (1995).

Murphy TF , Sethi S: Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease , Am Rev Respir Dis 146: 1067 (1992).

National Committee for Clinical Laboratory Standards . 1990 Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests . Approved Standard M2-A4 . National Committee for Clinical Laboratory standards , Villanova , Pa (1990).

National Committee for Clinical Laboratory Standards: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 12 Informational Supplement , M100-S 12 , Wayne (2002).

NCCLS: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests , 5.baskı , Document M2-A5 ,Villanova (1993).

Needham CA: Haemophilus influenzae: Antibiotic susceptibility , Clin Microbiol Rev 1: 218 (1988).

Nicoletti G , Blandino G , Caccamo F , Friscia O , Schito AM , Speciale A , The Italian Epidemiological observatory: The Italian Epidemiological Survey 1997-1999 Antimicrobial susceptibility data of Haemophilus influenzae , Haemophilus parainfluenzae and Moraxella catarrhalis in Italy , Int J Antimicrob Agents 20: 263 (2002).

Öngen B , Kaygusuz A , Gürler N , Töreci K: Çeşitli bakteri suşlarında sefodizimin etkinliği , ANKEM Derg 12: 41 (1998).

Öngen B , Kaygusuz A , Küçükbaşmacı Ö , Gürler N , Töreci K: İstanbul'da çocuk hastalardan izole edilen Haemophilus influenzae suşlarında antibiyotik direnci , "Ö Anđ , M Mamal (eds): Haemophilus influenzae infeksiyonları simpozyumu" kitabında s.174 , Türk Mikrobiyoloji Cem Yayını No. 24 , İstanbul (1995).

Peltola H: Haemophilus influenzae aşılıları XXX Türk Pediatri ve II Ulusal Neonatoloji kongresi , pediatri'de infeksiyon Hastalıkları özet kitabı (1993).

Pennington T H: Haemophilus species and clones , Rev in Med Microbiol 4:50 (1993).

Plummer F A , Simonsen J N Cameron D W , Ndinya J O , Kreiss J K , Gakinya M N, Waiyaki P , Cheng M , Piot P , Roland A R , Ngugi E N: Cofactors in male-female sexual transmission of human immunodeficiency virus type I , J Infect Dis 163: 233 (1991).

Powell L , Williams JD: In-vitro activity of cefaclor , cephalexin and ampicillin against 2453 clinical isolates of Haemophilus influenzae , J Antimicrob Chemother 21: 27 (1988).

Powell M , Fah Y S , Seymour A , Yuan M , Williams J D: Antimicrobial resistance in Haemophilus influenzae from England and Scotland in 1991 , J Antimicrob Chemother 25: 547 (1992).

Quentin R , Musser J M , Mellouet M C , Sızaret P Y Selander R K , Goudeau A: Typing of urogenital, maternal and neonatal isolation of Haemophilus influenzae and Haemophilus parainfluenzae in correlation with clinical source of isolation and evidence for a genital specificity of H. influenzae biotyping IV , J Clin Microbiol 27: 2286 (1989).

Rennie R , Gordon T , Yaschuk Y , Tomlin P , Kibsey P and Albritton W : Laboratory and clinical evaluations of media for the primary isolation of Haemophilus species , J Clin Microbiol 30: 1917 (1992).

Sarıbaş S: Çocuklarda Haemophilus influenzae tip b ve pnömokok menenjitlerinde antibiyotik tedavisi , ANKEM Derg 4: 455 (1990).

Saydam C , Tünger A , Özinel M , Tokbaş A : Haemophilus influenzae kökenlerinin serotipleri , beta-laktamaz salgılama özellikleri ve antibiyotik duyarlılıkları , ANKEM Derg 10: 415 (1996).

Scheifele D W , Fussell S J: Frequency of ampicillin-resistant Haemophilus parainfluenzae in children , J Infect Dis 143: (1981).

Scriver SR , Low DE , Simor AE , Toye B , McGeer A , Jaeger R and Canadian Haemophilus Study Group: Broth microdilution testing of Haemophilus influenzae with Haemophilus test medium versus lysed horse blood broth , J Clin Microbiol 30 : 2284 (1992).

Scriver SR , Walmsley SL , Kau CL , Hoban DJ , Bruston J , McGeer A , Moore TC , Witwicki E , Canadian Haemophilus Study Group and Low DE: Determination of antimicrobial susceptibilities of Canadian isolates of Haemophilus influenzae and characterization of their beta-lactamases , Antimicrob Agents Chemother 38 : 1678 (1994).

Shaw E D: Clinical studies of a new latex particle agglutination test for detection of Haemophilus influenzae type b polyribose phosphate antigen in serum , cerebrospinal fluid and urine , J Clin Microbiol 15: 1153 (1982).

Stefani S , Russo G , Pellegrino M B , Mezzatesta M L , Nicoletti G: In vitro activity of sulbactam/ampicillin and other antibiotics against clinical isolates of Haemophilus species and Branhamella catarrhalis , J int med research 19 (Suppl): 9A (1991).

Sturm A W: Isolation of Haemophilus influenzae and Haemophilus parainfluenzae from genital-tract specimens with a selective culture medium , J Med Microbiol 21: 349 (1986).

Sturm A W , Mostert R , Rouing P J E , Klingeren B V , Alphen L V: Outbreak of multiresistant non-encapsulated Haemophilus influenzae infections in a pulmonary rehabilitation centre , Lancet 27: 214 (1990).

Şener B , Köseoğlu U , Özçelik U: Eight year microbiological follow up of airway disease in cystic fibrosis patients , 6th Scientific Meeting of European Society of Chemotherapy , Infections Disease , program and Abstract Book s.108 , İstanbul (1990).

Taubitz İ S , Brandis H: A comparison between methods of identification and serotyping of encapsulated strain of Haemophilus influenzae , Int J Microbiol Hyg A 270: 83 (1988).

Totten P A , Stamm W E: Clear broth and plate media for culture of Haemophilus ducreyi , J Clin Microbiol 32: 2019 (1994).

Töreci K: Muayene meddelerinden izlenilen Haemophilus cinsinden hemolitik bakterilerin çeşitli özellikleri , İst. Tıp Fak Mecm 34: 545 (1971).

Tunkel A R , Scheld W M: Pathogenesis and pathophysiology of bacterial meningitis, Clin Microbiol Rev 6: 118 (1993).

Unat E K: TIP Bakteriolojisi ve virolojisi , ikinci baskı , Emek Matbaacılık: 645 İstanbul (1986).

Ustaşçelebi Ş , Özışık A: Yeni aşilar, Mikobiol Bült 26: 82 (1992).

Vahaboğlu H , Mülazimoğlu L , Yıldırım İ , Avkan V , Taşer B , Erdem I: Nasopharyngeal carriage rate and antimicrobial resistance of Haemophilus influenzae in İstanbul –Turkey , Marmara Med J 7: 78 (1994).

Yamada T , Yokota Y , Ikeda F , Mine Y , Kitada T: Antibacterial activity of cefixime against Streptococcus pneumoniae , Streptococcus pyogenes , and Haemophilus influenzae in the presence of Moraxella (Branhamella) catarrhalis. Chemotherapy 38: 28 (1992).

Yarkın F: Bölgemizde çocukluk döneminde görülen üst solunum yolu infeksiyonları ve menenjitlerde Haemophilus İnfluenzae'nin insidansı ve antibiyotik duyarlıklarının tespiti , Uzmanlık Tezi , Çukurova Üniv. (1990).

Yıldırım N , Akgün Y , topbaş S , Başmak H , Kiraz N , Yurdakul S: Çeşitli göz enfeksiyonlarında konjonktiva kültürlerinin değerlendirilmesi , Mikrobiol Bült 24: 71 (1990).

Yıldız D , Bayraktar B , Özcan N , Öcalmaz MŞ , Seber E: Kreşe devam eden çocukların boğaz florasında Haemophilus influenzae kolonizasyon sıklığı ve direnç oranları , ANKEM Derg 17: 97 (2003).

Wallace RJ , Musher DM , Martin RR: Haemophilus influenzae pneumonia in adults , Am J Med 64 : 87 (1978).

Welch D F : Evaluation of bactogen and pahdebact for detection of Haemophilus influenzae type b antigen in cerebrospinal fluid , J Clin Microbiol 16: 905 (1982).

Wisinger D: Bacterial pneumoniae , Postgrad Med: 43 (1993).