

0-5 Yaş Grubu Çocukların Boğaz Kültürlerinde *Haemophilus influenzae* Sıklığı

Yusuf Önlen¹, Elvin Dinç¹, Erdoğan Ağaç¹, Gül Çetmeli¹, Nail Özgünes²

Özet: Üst solunum yolu semptomları olan 0-5 yaş grubundaki 181 çocuğun boğaz kültürlerini inceledik. 181 çocuk hastanın 112'sinde (%61.8) *Haemophilus influenzae*, 50'sinde (%27.6) *H. parainfluenzae*, 7'sinde (%3.8) diğer *Haemophilus* türleri üretilti. Çalışmamızda *H. influenzae* kapsül serotiplerinin dağılımını da araştırdık ve *H. influenzae* izolatlarının 70'inin (%62) serotip b (Hib), 10'unun (%8.9) serotip d, 8'inin (%7.1) serotip c, 6'sının (%5.3) serotip f, 5'inin (%4.4) serotip a olduğunu saptadık. Çalışmamızda serotip e'ye rastlamadık. Tüm izolatların içerisindeki *H. influenzae* tip b oranını ise % 38.6 olarak saptadık. Ampisilin direncini *H. influenzae*'de %25.9, *H. parainfluenzae*'de %34; amoksisilin-klavulanik asid direncini *H. influenzae*'de %9.8, *H. parainfluenzae*'de %8; kloramfenikol direncini *H. influenzae*'de %5.3, *H. parainfluenzae*'de %6; eritromisin direncini *H. influenzae*'de %9.8, *H. parainfluenzae*'de %14; seftriakson direncini *H. influenzae*'de %5.3, *H. parainfluenzae*'de %8 oranında bulduk.

Anahtar Sözcükler: Boğaz kültürü, *Haemophilus influenzae*, antibiyotik direnci.

Summary: Prevalence of *Haemophilus influenzae* in throat cultures of children between 0-5 age group. Throat cultures of 181 children in 0-5 age group with upper respiratory tract infection were investigated for etiological agents. Of 181 throat cultures, *H. influenzae* was isolated from 112 (61.8%), *H. parainfluenzae* from 50 (27.6%), and other *Haemophilus* spp. from 7 (3.8%) children. We investigated the capsule serotypes of 112 *H. influenzae* isolates, and 70 were serotype b (Hib) (62%), 10 were serotype d (8.9%), 8 were serotype c (7.1%), 6 were serotype f (5.3%), and 5 were serotype a (4.4%). We found no serotype e. The rate *H. influenzae* type b in all isolates was determined as 38.6%. Resistance rates were found in *H. influenzae* and *H. parainfluenzae* isolates, respectively as follows: 25.9% and 34% ampicillin-resistant, 9.8% and 8% amoxicillin-clavulanic acid-resistant, 9.8% and 14% chloramphenicol-resistant, 5.3% and 8% ceftriaxone-resistant.

Key Words: Throat culture, *Haemophilus influenzae*, antibiotic resistance.

Giriş

Haemophilus, *Actinobacillus* ve *Pasteurella* bakterileri Pasteurellaceae ailesinin birer üyesidir. Bunlar; pleomorfik, Gram-negatif, nitratları indirgeyebilen ve karbohidratları fermentatif olarak veya terminal elektron alıcısı gibi oksijenle ütilize edebilen hareketsiz basil veya kokobasillerdir. *Haemophilus influenzae*, hareketsiz, sporsuz, küçük (1x 0.3 µm boyutunda), Gram-negatif bir bakteridir. Klinik materyalden elde edilen boyanmış mikroorganizma küçük kokobasilden, uzun filamanlara kadar değişen bir morfoloji gösterir. Bu değişken morfoloji (pleomorfizm) ve boya alımındaki kararsızlık mikroorganizmanın hatalı yorumlanmasına sebep olabilir. Eritrositlerden sağlanan büyüme faktörlerine ihtiyaç duyması sebebiyle "kan seven" anlamına gelen *Haemophilus* olarak adlandırılmıştır (1-4).

H. influenzae kolonileri besiyerlerinde genellikle granüler, transparan, sirküler ve kubbe şeklindedir. Çikolatamsı agar da kolonilerin çoğu 37°C'de ilk 24 saatte 0.5-0.8 mm çapında ikon 48 saatte çapları 1.5 mm'ye ulaşır. *H. influenzae*'nin izole edilen suşları kapsüllü olabilir. Kapsüllü olanların kolonileri mukoid ve 3-4 mm boyutundadır. Kapsül oluşumu klinisyen için major bir kriterdir. Çünkü bu önem-

li bir virülans faktörüdür. Koloni morfolojisi, *H. influenzae*'nin fenotipik farklılıklarını yansıtabilmektedir. Hücre duvarlarında bulunan lipopolisakaridlerdeki yapısal değişiklik koloni morfolojisini etkilemektedir (4-6).

H. influenzae aerop ve fakültatif anaerop ürer. Aerop ürediğinde X ve V faktörlerine ihtiyaç duyar. X faktörü tek bir madde değildir. Değişik demir içeren pigmentlerle (hemin ve hematin gibi) beraber ısıya dayanıklı tetrapirrol bileşiklerinden oluşur. Bu maddeler katalaz, peroksidaz ve elektron transport sisteminin (ETS) sitokrom sentezinde kullanılır. V faktörü ise, nikotinamid-adenin dinükleotid (NAD) ve nikotinamid-dinükleotidfosfat (NADP)'tır. Koyun, sığır ve insan kanında V faktörünü inaktive eden enzim bulunduğundan *H. influenzae*'nin üremesi için bu kanlar uygun değildir. Oysa at, tavşan, kobay, fare kanı gibi kanlar V faktörünü (NAD) inaktive eden enzim içermediklerinden *H. influenzae*'nin üremesi için uygun kanlardır. Hemofil bakteriler %5 at veya tavşan kanı içeren kanlı agar da üreyebilirler. Bu iki besiyerinde bazı *Haemophilus* türleri β-hemoliz yapabilir. *H. influenzae* koyun kanlı agar da üreyememesine rağmen, *Staphylococcus aureus* gibi bazı mikroorganizmaların etrafında karışık olarak topluğne başı büyüklüğünde ince koloniler şeklinde üreyebilir (3,7).

Çocuklukta, 3 ay-3 yaş arası dönemde görülen menenjitlerin yaklaşık %50'sinden *H. influenzae* sorumludur ve bu vakaların %95'inde etken mikroorganizma *H. influenzae* tip b (Hib)'dir. Bu bakteri ayrıca epiglottit, pnömoni, selülit,

(1) SSK Okmeydanı Eğitim Hastanesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi, Okmeydanı-İstanbul

(2) SSK Göztepe Eğitim Hastanesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi, Kadıköy-İstanbul

Tablo 1. Boğaz Kültürlerinde Erkek ve Kız Çocuklarında Üreyen *Haemophilus* Türlerinin Sıklığı

	Hasta Sayısı	<i>H. influenzae</i>		<i>H. parainfluenzae</i>		Diğer <i>Haemophilus</i> Türleri		Üreme Olmayan	
		Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)	Sayı	(%)
Erkek	117	73	(62.4)	30	(25.6)	5	(4.2)	9	(7.7)
Kız	64	39	(60.9)	20	(31.2)	2	(3.1)	3	(4.7)
Toplam	818	112	(61.8)	50	(27.6)	7	(3.8)	12	(6.6)

septik artrit, osteomyelit, sepsis, perikardit gibi invaziv hastalıklara yol açmaktadır. *H. influenzae*, insanda üst solunum normal florasında bulunur. *H. influenzae*'nin boğaz florasında bulunma sıklığının %80'lere ulaştığı bildirilmiştir. Ülkemizde ise *H. influenzae* infeksiyonları genellikle çok az saptanmaktadır. Bunun en önemli nedeni de laboratuvarlarda rutin olarak kullanılan besiyerlerinde *H. influenzae*'nin kolay ürememesidir.

Yöntemler

SSK Okmeydanı Eğitim Hastanesi Çocuk Polikliniği, Çocuk-Acil ve Çocuk Hastalıkları Kliniği'ne başvuran 0-5 yaş (5 yaş dahil) grubu, antibiyotik tedavisine başlanmamış, üst solunum yolu semptomlarıyla gelen 181 hasta çocuğun boğaz kültür örnekleri alındı.

Çalışmamızda bakterileri üretmek ve idantifiye etmek için, at kanlı çikolatamsı Columbia agarı, koyun kanlı agar, koyun kanlı çikolatamsı agar, eğri jeloz besiyeri, eğri çikolatamsı besiyeri, triptik soya agar, MacConkey agar besiyerleri kullanıldı. Ayrıca bakterilerin saklanması için yağı alınmış pastörize süt, bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarını araştırmak için antibiyotik diskleri, hemofil bakterilerin idantifikasyonu için X, V, ve X+V faktörlerini içeren diskler, *H. influenzae* suşlarının serotiplendirmesi için tavşandan elde edilmiş *H. influenzae* antiserumları kullanıldı.

0-5 yaş grubu çocuk hastaların boğaz ve nazofarinkslerinden eküvyonla materyal alındıktan hemen sonra kanlı agara, koyun kanlı çikolatamsı agara, MacConkey agarına ve ml'sinde 300 µg basitrasin içeren at kanlı çikolatamsı Columbia agarına ekim yapıldı. Columbia agarı %10 CO₂'li ortamda 37°C'de 48 saat üremeye bırakıldı. Koyun kanlı agar, çikolatamsı agar ve normal atmosferde 24 saat inkübe edildi.

Bu sürenin sonunda etüvden çıkarılan materyalin üremesine bakıldı. Columbia agarında üreyen şeffaf, şebnem tanelerine benzeyen kolonilerden önce Gram boyaması yapıldı. Gram boyamasında görülen, Gram-negatif kokobasillerin *Haemophilus* olup olmadığını anlamak için daha önce hazırlanmış olan üç adet eğri jeloz ve bir adet eğri çikolatamsı agara bir koloniden ekim yapıldı 37°C'de 24 saat süreyle bekledikten sonra tüplerdeki üremelere bakıldı. *Haemophilus* türleri adi jelozda üremedikleri için 1., 2., 3. tüplerde üremeyen ve 4. tüpte, yani eğri çikolatamsı agarda üreyenler *Haemophilus* olarak değerlendirildi.

Elde edilen hemofil grubu bakteriler lam aglütinasyon yöntemiyle, *H. influenzae* polivalan antiserumu ile karşılaştırıldı. Bu antiserumla aglütinasyon veren suşlar a, b, c, d, e ve f alt grup antiserumlarıyla karşılaştırıldı. Burada aglütinasyon veren antiseruma göre serotiplendirme yapıldı. Lam aglütinasyon yönteminde bazen aynı bakterilerin birden fazla antiserumla aglütinasyon verdiği gözlemlendi. Bu durumda en hızlı ve en çok aglütinasyon veren serotip, pozitif olarak kabul edildi. *H. influenzae* polivalan antiserumu ile aglütinasyon vermeyen *H. influenzae* bakterileri ise kapsülsüz (tiplendirilmeyen) olarak değerlendirildi.

Elde edilen *Haemophilus* türlerinin antibiyotik duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle araştırıldı. Bu bakterilerin duyarlılıkları ampicilin (10 µg), amoksisilin-klavulanik asid (20 µg), eritromisin (15 µg), kloramfenikol (30 µg) ve seftriakson (30 µg)'a karşı test edildi.

Sonuçlar

181 hasta çocuktan alınan boğaz kültürlerinin 169'unda (%93.3) *Haemophilus* cinsi bakteri ürettik. Sadece 12'sinde (%6.7) *Haemophilus* cinsi bakteri üretilmedi. 181 hastanın 112'sinde (%61.8) *H. influenzae*, 50'sinde (%27.6) *H. parainfluenzae*, 7'sinde (%3.8) diğer *Haemophilus* türleri üretti (Tablo 1 ve 2).

H. influenzae üretilen 112 çocuğun 70'inde (%62) serotip b, 10'unda (%8.9) serotip d, 8'inde (%7.1) serotip c, 6'sında (%5.3) serotip f, 5'inde (%4.4) serotip a saptandı. Tiplendirilemeyen (kapsülsüz) *H. influenzae* sıklığı % 11.6 oranında saptandı. Çalışmamızda serotip e saptanmadı. Tüm olguların içerisinde serotip b sıklığını % 38.6 (70/181) oranında bulduk (Tablo 3).

Yaptığımız çalışmada *H. influenzae* ve *H. parainfluenzae*'ye karşı antibiyotik dirençlerini sırasıyla ampicilin %25.9 ve %34, amoksisilin-klavulanik asid %9.8 ve %8, kloramfenikol %5.3 ve %6, eritromisin %9.8 ve %14, seftriakson %5.3 ve %8 oranlarında bulduk (Tablo 4).

İrdeleme

Çalışmamızda üst solunum yolu infeksiyonu olan 0-5 yaş grubundaki çocukların boğaz kültürlerinde *H. influenzae*, *H. parainfluenzae* ve invazif hastalıklarında en sık etken olan Hib sıklığını araştırmayı, ayrıca *Haemophilus* türleri için 1970'li yılların başından beri sorun olmaya başlayan ve giderek artış gösteren antibiyotik dirençlerini araştırmayı amaçladık.

Çalışmamızda 0-5 yaş grubu çocuklarda *H. influenzae*

Tablo 2. *Haemophilus* Cinsi Bakterilerin Üretilme Sıklığı

	<i>Haemophilus</i> spp.		Üremeyen	
	Sayı	(%)	Sayı	(%)
Erkek	108	(92.3)	9	(7.7)
Kız	61	(95.3)	3	(4.7)
Toplam	169	(93.3)	12	(6.6)

Tablo 3. *H.influenzae* Serotiplerinin Kız ve Erkek Çocuklarına Göre Dağılımı

	Serotipler													
	a		b		c		d		e		f		Tiplendirilemeyen	
Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)	
Kız	39 (60.9)	2 (5)	25 (64)	2 (5)	4 (10)	-	4 (10)	2 (5)	4 (10)	2 (5)	2 (5)	11 (15)	13 (11.6)	
Erkek	73 (2.4)	3 (4.1)	45 (61.6)	6 (8.2)	6 (8.2)	-	2 (2.7)	11 (15)	2 (2.7)	11 (15)	11 (15)	11 (15)	11 (15)	
Toplam	112 (61.8)	5 (4.4)	70 (62)	8 (7.1)	10 (8.9)	-	6 (5.3)	13 (11.6)	6 (5.3)	13 (11.6)	13 (11.6)	13 (11.6)	13 (11.6)	

sıklığı %61.8, *H.parainfluenzae* sıklığını %27.6, Hib sıklığını %38.6 oranında bulduk. Hib'in *H.influenzae* içindeki sıklığını ise %62 oranında bulduk.

Yurt dışındaki yayınlarda *H.influenzae* üst solunum yollarında %80'e varan sıklıkta, Hib'in de %3-5 oranında saptandığını ancak, kreş gibi toplu yaşanan yerlerde bu oranın % 60'lara ulaştığı bildirilmiştir (3,4).

Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda *H.influenzae* sıklığı %9.7-%77 oranında saptanmıştır. Çalışmamızda %61.8 oranında bulduğumuz *H. influenzae* sıklığı, Akçakaya ve arkadaşları (8)'nin yuva çocuklarında bulunduğu *H.influenzae* sıklığıyla (%61.9) uygunluk gösterirken; Yücel ve arkadaşları (9)'nin bir rinit salgını sırasında bulunduğu % 97.1'lik orandan daha düşük, Mamal (10)'ın bulunduğu %9.7'lik ya da Mamal Torun ve arkadaşları (11)'nin bulunduğu % 48'lik oranlardan daha yüksektir. Çalışmamızda bulduğumuz (%61.8) *H.influenzae* sıklığı, Vahaboğlu ve arkadaşları (12) tarafından yapılan çalışmada bulunan %77'lik orandan düşük, Yarkin ve arkadaşları (13)'nin bulunduğu %36.8'lik orandan daha yüksektir.

Hib'i ise çalışmamızda % 38.6 oranında bulduk. Bu değer, Mamal Torun ve arkadaşları (11)'nin 1992'de yaptığı çalışmada bulunduğu %37'lik oranla uyumlu, oysa Mamal (10)'ın 1986'da bulunduğu %4'lik orandan yüksektir; Akçakaya ve arkadaşları (8) ve Yücel ve arkadaşları (9)'nin sırasıyla buldukları %51.8 ve % 97.1'lik oranlardan da düşüktür. Bizim çalışmamız dahil ülkemizde yapılan çalışmalarda *H.influenzae* sıklığı yurt dışında bildirilenlerle korelasyon gösterirken, Hib'in ülkemizdeki sıklığının yurt dışındaki yayınlarda belirtilenden daha yüksek olduğu görülmektedir.

Yaptığımız çalışmada *H. influenzae*'nin ampisilin direncini %25.9 oranında bulduk. Bu oranı, Kaygusuz ve arkadaşları (14) %23, Durmaz ve arkadaşları (15) %30, Yarkin ve arkadaşları (13) %9.8, Vahaboğlu ve arkadaşları (12) % 25 olarak bulmuşlardır. Yurt dışında ampisilin direnci, Avrupa'da yapılan çalışmalarda en düşüğü %1.6 ve en yükseği (İspanya'da) %60 oranında saptanmıştır (16-21).

Tablo 4. *H.influenzae* ve *H.parainfluenzae*'de Antibiyotik Direnci

Antibiyotik	<i>H.influenzae</i>	<i>H.parainfluenzae</i>
Ampisilin	%25.9	%34
Koamoksiklav	%9.8	%8
Kloramfenikol	%5.3	%6
Eritromisin	%9.8	%14
Seftriakson	%5.3	%8

H. influenzae'de kloramfenikol direncini %5.3 oranında bulduk. Ülkemizde bu oran % 0-10 arasında değişmektedir. Amerika ve Avrupa'nın birkaç ülkesinde kloramfenikol direnci %1.2 oranında iken, İspanya'da yapılan çalışmada (%24.9-65.7) çok yüksek bulunmuştur (10,16,17). *H.influenzae*'de eritromisin direncini %9.8 oranında bulduk. Eritromisin direnci, Yarkin ve arkadaşları (13)'nin yaptığı çalışmada %14.8, Mamal (10)'ın yaptığı çalışmada %10 oranında bulunmuştur. Avrupa işbirliği çalışmasında eritromisin direnci, Hollanda'da %27, Avusturya'da %1.1 oranında saptanmıştır (17). Sefriakson direncini %5.3 oranında bulduk. Vahaboğlu ve arkadaşları (12)'nin yaptığı çalışmada bu oran %8, Mamal (10)'ın çalışmasında %0 bulunmuştur.

Bu çalışmada sonuçlarına göre ülkemizde küçük çocukların boğazında *H.influenzae* tiplerine ve bu arada Hib'e seyrek olmayarak rastlanmaktadır ve belli bir oranda direnç görülmektedir. Özellikle ampisiline ve kloramfenikole artan bir direnç söz konusudur.

Kaynaklar

- Murphy TF. Haemophilus. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR, eds. *Infectious Diseases*. Philadelphia: WB Saunders, 1992:1521-31
- Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilfert CM. *Zinsser Microbiology*. 20th ed. East Norwalk, CT: Appleton & Lange, 1992:461-72
- Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott, 1992:279-301
- Moxon ER. Haemophilus influenzae. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Disease*. 4th ed. New York: Churchill Livingstone, 1995:2039-45
- Krugman S, Katz SL, Gershon AA, Wilfert CM. *Infectious Diseases of Children*. 9th ed. St. Louis: Mosby, 1992:127-42
- Weisser NJ. Relationship between colony morphology and the life cycle of Haemophilus influenzae. The contribution of lipopolysaccharide phase variation to pathogenesis. *J Infect Dis* 1993; 168:672-80
- Mamal Torun M. Haemophilus influenzae infeksiyonlarının laboratuvar tanımı. In: Anđ Ö, Mamal Torun M, eds. *Haemophilus influenzae Infeksiyonları Simpozyumu* (15 Nisan 1995, İstanbul) *Kitabı*. İstanbul: Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No. 24, 1995:76-100
- Akçakaya N, Mamal Torun M, Söylemez Y, Çokuğraş H, Pinçe O, Eşkazan G, Engin S. İstanbul'da yuva çocuklarında Haemophilus influenzae sıklığı. *Cerrahpaşa Tıp Fak Derg* 1994;25:587-90
- Yücel A, Mamal Torun M, Ergin S, Sevme R. Ana sınıf öğrencilerinde Haemophilus influenzae tip b rinit salgını. *İnfeksiyon Derg* 1993;7(1-2):27-30

10. Mamal M. İnsanda izole edilen Haemophilus cinsi bakteriler üzerinde çalışmalar. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg* 1987;17 (1-2):1
11. Mamal Torun M, Akçakaya N, Sevme R, Ergin S, Söylemez Y, Çokuğraş H, Tüysüz B. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Polikliniği'ne başvuran üst solunum yolu infeksiyonu bulunan çocuklarda Haemophilus influenzae aranması. *İnfeks Derg* 1992; 6:27-30
12. Vahaboğlu MH, Mülazımoğlu L, Yıldırım İ, Avkan V, Taşer B. Nasopharyngeal carriage rate and antimicrobial resistance of Haemophilus influenzae in İstanbul, Türkiye. *Marmara Med J* 1994; 7(2): 78-80
13. Yarkın F, Akan E, Köksal F, Aksaray N, Hikkhou H, Özkuyucu F, Gökfidan S. Bölgemizde çocukluk döneminde görülen üst solunum yolu infeksiyonları ve menenjitlerde Haemophilus influenzae'nin insidansı ve antibiyotik duyarlılıkları. *Çukurova Üniv Tıp Fak Derg* 1991;1:1005-11
14. Kaygusuz A, Özalp M, Öngen B, Gürler N, Töreci K. İstanbul'da çocuk hastalardan izole edilen Haemophilus influenzae ve Haemophilus parainfluenzae suşlarında antibiyotiklere direnç. *Ankem Derg* 1995;9: 47-53
15. Durmaz G, Koçoğlu T, Akgün Y. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen Haemophilus influenzae suşları ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *Mikrobiyol Bül* 1991;25:305-12
16. Campos J, Tarnel GS, Gairf MJ, Fabergues I. Multiply resistant Haemophilus influenzae type b causing meningitis: comparative clinical and laboratory study. *J Pediatr* 1976; 108: 897-902
17. Groot R, Danilovich DG, Vanklingreen B, Goessnes FHM, Neyens JH. Antibiotic resistance in Haemophilus influenzae: mechanisms, clinical importance and consequences for therapy. *Eur J Pediatr* 1991;150:534-46
18. Jacobs FN, Jerris CR. Haemophilus influenzae resistance in community hospital. *South Med J* 1991;84:730-2
19. Kayser HF, Moenzoni G, Santanam P. The Second European Collaborative Study on the Frequency of Antimicrobial Resistance in Haemophilus influenzae. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1990;9:810-7
20. Kessler A, Wetmore RF, Marsh RR. Childhood epiglottitis in recent years. *J Pediatr* 1993;25: 155-62
21. Weinberg GA, Spitzer ED, Murray PR, et al. Antimicrobial susceptibility patterns of Haemophilus isolates from children in eleven developing nations. *Bull WHO* 1990; 68(2):179-84